

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor ,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir de
31/01/2020.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

DEFESA DE DOUTORADO

**EFEITO DA APLICAÇÃO INTRATESTICULAR DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS**

Patricia de Mello Papa

Botucatu-SP
Janeiro/2018



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DA APLICAÇÃO INTRATESTICULAR DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS**

Patricia de Mello Papa

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, Campus Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Animal, área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu-SP
Janeiro/2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Papa, Patricia de Mello, 1985-
P213e Efeito da aplicação intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas em equinos / Patricia de Mello
Papa. - Botucatu : [s.n.], 2018
94 f.: il., color., grafs., tabs.

Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2018
Orientador: Marco Antonio Alvarenga
Inclui bibliografia

1. Equino. 2. Célula tronco mesenquimal. 3. Degeneração testicular. 4. Terapia celular I. Alvarenga, Marco Antonio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255
"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"

Nome da autora: Patricia de Mello Papa

Titulo: EFEITO DA APLICAÇÃO INTRATESTICULAR DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS ALOGÊNICA EM EQUINOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP-
Botucatu/SP.

Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP-
Botucatu/SP.

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP-
Botucatu/SP.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrosio

Membro

Departamento de Medicina Veterinária
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos USP- Pirassununga/SP.

Prof. Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Veterinário autônomo, Botucatu/SP

Data da Defesa: 31 de Janeiro de 2018.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e meu noivo pelo apoio, incentivo e amor incondicional durante todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

À Deus, pela vida e pela força para superar os obstáculos e conquistar meus objetivos.

Ao meu pai, por toda ajuda durante este experimento, por aceitar minhas ideias, não me deixar desistir, por compartilhar seus conhecimentos, pela dedicação, por cumprir com duplo papel nesta jornada de pai e mestre. Você é meu maior exemplo de profissional.

À minha mãe por estar sempre ao meu lado, pelo carinho, pela ajuda com os pôneis, pelas palavras de consolo e incentivo por todo apoio nas minhas decisões e sonhos.

Aos meus pais minha eterna gratidão, amor e admiração com certeza essa conquista não é só minha mais de vocês também.

Aos meus irmãos Priscila por ajudar intensamente nessa fase final, pelo apoio, amizade e suporte nos momentos difíceis. Gustavo mesmo distante sempre presente incentivando em todos os momentos, por sempre torcerem por minhas vitórias.

Ao meu noivo Cássio por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e amor, pela ajuda, incentivo, paciência e compreensão, você com certeza foi muito importante e essa conquista também é sua.

À minha família (avó,tios,tias,e primos) pelas palavras de incentivo, carinho e orações .

Ao meu orientador Prof. Marco por acreditar em mim nesse experimento, por acalmar nas horas difíceis, por todo apoio, dedicação, compreensão e amizade. Muito obrigada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal por todos esses anos de convívio e ensinamentos.

À Prof.^a Fernanda pelo acolhimento em seu laboratório permitindo o desenvolvimento deste projeto.

Á Prof.^a Noeme por ajudar na interpretação das histologias.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

À Camila e o Zé pelas análises estatísticas e ajuda nesse projeto.

Ao Haras Itapuã e Dr. José Martins pelo uso dos animais, e toda ajuda prestada.

Á Cabanha Guguiná pelo empréstimo dos pôneis.

Aos colegas da pós-graduação e residentes por toda ajuda com o experimento, pela amizade e todo apoio.

À Universidade Estadual Paulista UNESP/FMVZ pelo aprendizado e por possibilitar o desenvolvimento do projeto.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Aos animais, que inocentemente e sem saber foram os mais importantes colaboradores deste trabalho.

*À todos que de alguma forma estiveram envolvidos com esse trabalho e que permitiram assim, o desenvolvimento desse projeto.
Muito obrigada a todos!*

EPÍGRAFE

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... Tornam-se seu destino”.

Mahatma Ganghi

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1 Médias e erro padrão da cinética espermática dos grupos controle e grupo (CTMs) pré e após a aplicação intratesticular.....	54
Tabela 2 Médias e erro padrão dos dos volumes testiculares, dos grupos CTMs e grupo Controle pré e após aplicação das células tronco.....	54
Tabela 3 Médias e erro padrão das mensurações dos testículos em comprimento (cm), largura (cm) e altura (cm) dos grupos CTMs e grupo controle.....	55
Tabela 4 Médias e erro padrão dos índices de resistência (IR) e pulsabilidade (IP) da perfusão testicular avaliados com doppler nos grupos CTMs e grupo controle.....	55
Tabela 5 Médias e erro padrão da temperatura superficial escrotal dos grupos CTMs e grupo Controle.....	56
Tabela 6 Médias e erro padrão da altura do epitélio seminífero e diâmetro dos túbulos seminíferos	56
Tabela 7 Médias e erro padrão dos níveis séricos de testosterona (pg/mL) nos grupos CTMs e grupo controle.....	57

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1 Desenho esquemático do testículo dos locais onde foram realizadas as aplicações.....	51
---	-----------

Capítulo 2

Figura 1 Método utilizado para induzir o estresse térmico testicular....	70
Figura 2 Desenho esquemático do testículo dos locais onde foram realizadas as aplicações.....	71
Figura 3 Esquema do delineamento experimental.....	72
Figura 4 Contagem de espermatozoides na luz do túbulo seminífero....	73
Figura 5 Gravidade da lesão da arquitetura tubular.....	74
Figura 6 Epitélio celular dos túbulos seminíferos.....	75
Figura 7 Boxplot Mediana, mínimo e máximo dos escores do grupo controle e tratado dos diferentes momentos.....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Degeneração Testicular.....	19
2.2. Estresse Térmico.....	21
2.3. Tratamento da Degeneração Testicular.....	24
2.4. Célula Tronco.....	26
2.5. Célula Tronco Mesenquimal.....	28
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. REFERÊNCIAS	34
5. CAPÍTULO 1.....	45
6. CAPÍTULO 2.....	64
7. CONCLUSÕES.....	84
8. ANEXOS	86

RESUMO

RESUMO

PAPA, P.M. EFEITO DA APLICAÇÃO INTRATESTICULAR DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM EQUINOS. Botucatu - SP. 2018, p.94 Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O presente estudo propõe avaliar a segurança da aplicação intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas obtidas da medula óssea e verificar o efeito DO tratamento com as células tronco mesenquimais (CTMs) em garanhões submetidos a degeneração testicular. Para o primeiro estudo, foram usados 24 garanhões sadios, nos quais os testículos foram mensurados, termografia, ultrassonografia doppler, cinética espermática e dosagem hormonal. Os grupos foram separados aleatoriamente em grupo controle (GC) e grupo células tronco mesenquimais (CTMs). No GC foram realizadas aplicações intratesticulares com PBS (solução tampão) e no CTMs solução contendo células. Os animais foram avaliados após a aplicação e aos 15 dias foram orquiectomizados. Os fragmentos testiculares foram destinados para histologia. Os exames clínicos não mostraram declínio na condição geral dos animais após a aplicação e não houve diferença significativa nas variáveis volume, temperatura superficial e ultrassonografia testicular, cinética espermática, análise sérica hormonal e histologia em ambos os grupos. Desta forma, conclui-se que a aplicação intratesticular de CTMs alogênicas da medula óssea é um processo seguro, pois não provocou alterações locais. Para o segundo estudo, um grupo de 10 garanhões foram divididos em dois grupos: grupo controle (CT) e grupo tratado (TT). Os animais foram submetidos ao estresse térmico escrotal, acoplado uma bolsa termica nos testículos, durante 3 horas por 3 dias consecutivos. Após uma semana da indução, os animais foram tratados com 10×10^6 CTMs suspensas em 5 ml de PBS em cada testículo. O grupo controle recebeu o mesmo volume contendo apenas PBS. Biopsias testiculares foram coletadas em quatro diferentes momentos: antes do estresse térmico (T0); depois do estresse térmico (T1); após aplicação de PBS/CTMs (T2); e após 30 dias estresse térmico (T3). O método usado para promover a degeneração testicular foi eficiente, mostrando alterações no epitélio seminífero dos dois grupos. Entretanto o grupo tratado com CTMs foi capaz de recuperar mais rápido os padrões iniciais da arquitetura testicular do que o grupo controle. Podemos concluir que a aplicação intratesticular com CTMs foi eficiente e promoveu uma recuperação rápida nos animais que sofreram degeneração testicular devido aos fatores regenerativos liberados pelas CTMs.

Palavras-chave: garanhão, degeneração testicular, aplicação intratesticular, célula tronco mesenquimal, alogênica.

ABSTRACT

PAPA, P.M. EFFECT OF INTRATESTICULAR APPLICATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN STALLION. Botucatu - SP. 2018, p. 94 Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

The present study aim to evaluate the safety of intratesticular application of allogenic mesenchymal stem cells from the bone marrow and verification through the histological examinations of the effect cells in animals induced to testicular degeneration. For the first study, a group of 24 healthy stallion, measurements of testicular volume, testicular surface temperature, Doppler ultrasonography, sperm kinetics and hormonal dosing were performed. The groups were randomly divided into a mesenchymal stem cell group (MSC) and control group (CG). In the first, an intratesticular application of CTM was performed and in the CG only a buffer solution (PBS) was used. After the application, the animals were examined again. Fifteen days later, the animals were orchietomized and histological analysis of the fragments were performed. Clinical examination showed no decline in the overall condition of the animals after application. There was no difference in the analysed variables, such as testicular volume, testicular surface temperature, ultrasonography, sperm kinetics, hormonal analysis and histology, in both groups after application. Thus, the results of the presente study support the hypothesis of the feasibility and safety of intratesticular application of allogeneic bone marrow MSC. For the second study, a group of 10 stallions submitted to scrotal thermal stress, testicular histological samples were analyzed before and after thermal insult, after intratesticular applications (PBS / MSC) and after 30 days of insult. The treated and control groups, after thermal stress, received mesenchymal stem cells and PBS respectively in their testicles. The method used to promote degeneration was efficient showing alterations in the seminiferous epithelium of both groups, however the treated group was able to recover a histological preview after 30 days of insult, while it was not observed in the control group. The characteristics that MSC has to stimulate tissue angiogenesis and proliferation, release of growth factors, eliminate free radicals, increase the capacity for renewal and cell differentiation, its immunomodulatory and immunosuppressive actions may be responsible for the outcome in the present study. It is concluded that the application of intratesticular mesenchymal stem cells is safe, in addition to promoting restoration of the initial patterns of the histological architecture of the testis in animals induced to testicular degeneration by thermal stress.

Keys-word: stallion, testicular degeneration, application of intratesticular mesenchymal stem cell, allogenic.

INTRODUÇÃO

1. Introdução

Os cavalos constituem um grupo bastante popular dentro dos animais domésticos. Sua interação com o homem é bastante diversificada, o que pode ser constatada pelas diferentes atividades equestres existentes. Os avanços da biotecnologia da reprodução de equinos proporcionaram, sem dúvida, um aumento no número de animais com evidente benefício econômico para o mercado do cavalo (RODRIGUES et al., 2017).

Além dos aspectos econômicos, o estudo da reprodução de equinos é uma importante ferramenta para conhecimento da reprodução de mamíferos em geral, constituindo-se um modelo experimental valioso, principalmente para as espécies com números reduzidos de indivíduos, ou mesmo para o homem (BORTOT, 2013).

Os distúrbios testiculares são os maiores responsáveis por problemas de fertilidade em garanhões. Esses distúrbios são definidos como a atividade alterada ou inativada dos testículos sendo caracterizada por um processo progressivo que leva a degeneração tecidual e formação tecido fibroso que prejudica a função testicular (ALVARENGA;PAPA, 2009). Normalmente essa degeneração está associada ao aumento temperatura corporal e local, devido a condições ambientais ou patológicas como infecções, traumas, neoplasias e torções testiculares (BLANCHARD et al.,1996). Quanto mais grave e mais prolongado for o fator determinante do aumento da temperatura testicular maior será o comprometimento da espermatogênese e mais demorada à recuperação da função testicular (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Não existe um tratamento comprovado para degeneração testicular. Entretanto, a terapia celular com células tronco mesenquimais tem sido recentemente utilizada como alternativa em animais de laboratório para tratamento de infertilidade, por estas estimularem a angiogênese e proliferação tecidual, regulação da função de linfócitos T (CAPLAN;DENNIS,2006) além de eliminarem os radicais livres (PENG et al.,2008) possuem capacidade de renovação e

diferenciação (WATT;DRISKELL,2010) ação imunomoduladora (Monteiro et al., 2008) e imunossupressora (CAPLAN,2009).

Na medicina equina a terapia com células tronco mesenquimais é um campo emergente, com estudos principalmente em doenças como osteoartrite, lesões tendíneas e rupturas de ligamentos. Tais estudos mostraram que essas células podem servir como auxílio na qualidade da regeneração, enquanto os tratamentos convencionais se limitam a minimizar processos inflamatórios e a dor, não reparando o tecido danificado (MAIA, 2013).

Nesse sentido, o presente estudo propõe avaliar a segurança da aplicação intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas da medula óssea e verificar através de exames histológicos o efeito dessas células em animais induzidos a degeneração testicular.

REVISÃO DE LITERATURA

2. Degeneração Testicular

A degeneração testicular (DT) é a principal causa de subfertilidade e infertilidade em garanhões. É uma afecção de origem multifatorial, que pode ser uni ou bilateral, temporária ou permanente. Manifesta-se de forma discreta a severa sob o ponto de vista patológico, variando somente quanto ao grau de intensidade (BLANCHARD ;VARNER, 1993; CAMP, 1997; TURNER, 2007).

A DT é definida como um conjunto de alterações do parênquima testicular que causa disfunções bioquímicas e variações estruturais nas células da linhagem germinativa, levando o tecido normal a um estado funcional menos ativo (TURNER,2007).

Uma grande variedade de fatores etiológicos pode induzir a degeneração testicular: elevadas temperaturas, infecções, intoxicações, distúrbios endócrinos, tratamentos com drogas, especialmente esteróides anabolizantes, idade entre outros (JOHSON et al.,1997; WATSON et al., 1994). Porém, na maioria dos casos a etiologia não é estabelecida, fato que leva à existência de uma grande lacuna nos diagnósticos de degeneração testicular. Alguns casos podem ser atribuídos à genética, como no(s) testículo(s) retido(s) no criptorquidismo (MARCUS et al., 1997) ou nas alterações gonadais associadas à hipoplasia testicular (SETTERGREN; MCENTEE, 1992). No entanto, em machos jovens, a distinção entre a degeneração testicular e a hipoplasia é difícil quando se utilizam apenas características morfológicas (FOSTER, 2009). No outro espectro, o diagnóstico em animais senis ou meia idade, que apresentam problemas circulatórios locais e falha na termorregulação, pode ser atribuído a chamada degeneração idiopática (TURNER, ZANG, 2012).

O diagnóstico da DT deve ser baseado no exame físico, incluindo a inspeção e palpação testicular, avaliação seminal, além de especial atenção ao histórico clínico geral e reprodutivo do animal (BEARD, 2011). Apesar dos inúmeros estímulos e causas diferentes, quase sempre a resposta tecidual se manifesta clinicamente igual, pela alteração da anatomia da gônada, da

arquitetura histológica e da produção anormal de espermatozoides (JOHNSON et al.,1997).

As mensurações testiculares também podem identificar processos de degeneração, visto que estas devem ser realizadas rotineiramente de forma a serem parâmetros em casos de suspeita de diminuição dos testículos (BLANCHARD; VARNER, 1997).

Com relação à consistência do testículo no início do processo de degeneração, esta apresenta-se flácida ou discretamente flácida. Após a fase aguda, o testículo torna-se atrofiado, com tamanhos reduzidos e/ou com consistência firme a palpação (MCGAVIN, 2009).

A ultrassonografia é a técnica que pode ser utilizada em casos de distúrbios subclínicos, pois o resultado do exame clínico, aliado a análise do sêmen, geralmente são insuficientes para a obtenção de um diagnóstico conciso. A visualização de alterações no exame ultrassonográfico é de fundamental importância na escolha de um tratamento efetivo (CARDILLI et al., 2010). Estudo demonstra que algumas alterações observadas no ultrassom são indicativas de lesões em nível histológico, todavia alterações menores podem não serem observadas pela ultrassonografia, assim como na análise do sêmen (TEIXEIRA et al., 2011).

Os achados ultrassonográficos num processo degenerativo podem ser descritos como: aumento generalizado da ecogenicidade, redução do tamanho e da circulação do parênquima testicular, difícil visualização da veia central (LOVE; VARNER, 1998). Quando se utiliza o Doppler para realizar o exame observa-se que os índices de pulsatilidade e resistividade aumentam nos casos de processos isquêmicos ou degenerativos, assim como em testículos atrofiados, e nas condições inflamatórias devido à hiperemia (EKERHOVD; WESTLANDER, 2002).

A biópsia e a citologia por agulha fina podem ser utilizadas como exames que auxiliam na avaliação dos testículos e da espermatogênese (LEME; PAPA,

2002). Histologicamente, nota-se nos túbulos seminíferos diminuição da espermatogênese devido a morte das células germinativa. Alguns túbulos podem mostrar ausência do epitélio seminífero, membrana basal espessa e hialinizada. Nos casos mais avançados, observa-se a proliferação de tecido conjuntivo fibroso para o interior destas estruturas (GARCIA,2017). Na fase final da degeneração testicular, as células de Sertoli são as únicas células de revestimento remanescentes, porém, com o decorrer do processo, estas também desaparecem, restando apenas a membrana basal. A mineralização pode envolver os debris celulares, a membrana basal tubular e/ou o interstício (MCGAVIN, 2009).

Um problema em relação à degeneração testicular, além da falta de precisão no estabelecimento de sua causa, é a incerteza da recuperação da fertilidade do animal. Se não identificada a tempo ou mesmo eliminada, a persistência da causa pode ser crucial para o não restabelecimento da espermatogênese normal (ALVARENGA; PAPA, 2009).

2.1 Estresse Térmico

Todos os tecidos são susceptíveis a danos causados pelo calor, no entanto, os testículos não suportam mesmo as temperaturas encontradas no abdômen. Em mamíferos, a espermatogênese depende da manutenção ideal da temperatura escrotal, que deve ser mantida entre 2 a 6°C abaixo da temperatura corporal. Para isso, diversos mecanismos fisiológicos atuam visando manter a termorregulação testicular (GABALDI; WOLF, 2002).

O mecanismo de termorregulação ocorre fundamentalmente pela ação do plexo pampiniforme, que resfria o sangue que adentra o parênquima testicular, mantendo este a uma temperatura abaixo da temperatura corporal. Por mais que seja eficiente, em situações onde ocorram picos da temperatura testicular, ocorre um aumento do metabolismo celular com conseqüente aumento da necessidade tecidual de oxigênio. Como o suporte sanguíneo ao testículo é deficitário, em não havendo oxigênio disponível, ocorre morte celular e se instala o processo de degeneração testicular. Quanto mais grave e mais prolongado for o fator

determinante do aumento da temperatura testicular maior será o comprometimento da espermatogênese e mais demorada a recuperação da função testicular. (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Apesar de existir vários estudos envolvendo degeneração testicular e estresse térmico, não se sabe o exato mecanismo do efeito nocivo do calor sobre os testículos (GARCIA, 2017). Por outro lado, estudos sobre as consequências do estresse gerador da DT são melhor elucidados nas diferentes espécies (FERNANDES et al.,2008; HAMILTON, 2016; KASTELIC,1997).

Leves períodos de estresse térmico podem causar somente uma leve e transitória diminuição da qualidade do semen. Por outro lado, um estresse térmico grave, com prolongadas exposições ao calor e alta umidade, pode provocar grande queda na qualidade do sêmen e intensa diminuição espermática, levando a uma recuperação mais lenta (CAMP, 1997).

Os efeitos da temperatura testicular elevada têm sido extensivamente estudados através da insulação testicular. Esse tornou-se método escolha para simular os efeitos do estresse térmico ambiental sobre as células da espermatogênese em condições controladas (BARTH; BOWMAN, 1994).

A técnica para se obter tal efeito consiste em bloquear ou reduzir a capacidade termorregulatória dos testículos por meio do acoplamento de uma bolsa térmica ao escroto. Esta técnica isola os testículos em uma bolsa plástica isolante térmica, internamente forrada com lã (RAO, 1967), náilon (VOGLER et al., 1993) ou tecido de algodão (JANUSKAUSKAS et al., 1995), cuja função é minimizar as trocas de calor entre os testículos e o meio ambiente.

A exposição do calor induz a formação anormal de espermatozoides produzindo gametas que não fertilizam corretamente (GABALDI; WOLF, 2002). Alterações observadas nas atividades enzimáticas, no metabolismo tecidual e nas modificações da síntese de andrógenos e gonadotrofinas também estão descritos

como fatores que podem estar envolvidos no mecanismo de degeneração testicular induzida pelo calor (BLANCHARD et al., 1996).

Estudos realizados por Ramires-Neto et al (2013) observaram que gananhões com temperaturas testiculares elevadas tendem a ter maior ocorrência de alterações morfológicas no espermatozoide. Em geral, como consequência da elevação da temperatura testicular, as amostras de semen apresentam queda na motilidade, diminuição da concentração espermática e do número total de espermatozoides (TURNER, 2007). Quando a temperatura ambiental excede 40°C, a temperatura escrotal aumenta para valores encontrados no abdômen (SETCHELL; MIEUSSET, 1996). Lue (1997) verificou que o aquecimento testicular por 15 minutos a 43°C foi suficiente para prejudicar os estágios iniciais e finais da espermatogênese.

Friedman et al. (1991) acreditam que a primeira divisão meiótica é a fase mais susceptível ao calor, entre espermátócito primário e secundário, e que as alterações ocorridas nesta fase são as principais responsáveis pelo aumento de defeitos morfológicos de espermatozoides em gananhões. As espermátides em diferentes espécies foram consideradas bastante sensíveis ao calor, sendo as primeiras células germinativas a evidenciarem os danos que o aquecimento testicular provoca a espermatogênese, tanto em cortes histológicos, quanto em alterações morfológicas apresentadas pelos espermatozoides (CARSEL et al 2003). Lee (1974), conclui que as membranas plasmáticas das espermátides apresentam uma falha na permeabilidade a 37°C e os lisossomos de todas as células germinativas, incubadas a essa temperatura, liberam rapidamente suas enzimas hidrolíticas.

Alguns autores acreditam que os espermatozoides, durante a passagem pelo epidídimo, estão mais protegidos dos efeitos do calor do que as células dentro do testículo (FRIEDMAN 1991).

Blanchard et al. (1996) descrevem que imediatamente após o aquecimento dos testículos de dois gananhões, houve uma diminuição das concentrações

sélicas de testosterona. Estudos realizados por Cattelan (2002) acreditam que as células de Leydig e Sertoli são mais resistentes ao estresse térmico, sendo afetadas em casos muito severos de degeneração e com isso as concentrações hormonais não são alteradas após o insulto térmico.

Um estudo realizado por Friedman et al (1991) observou um efeito agudo da insulação escrotal em garanhões sobre os níveis hormonais nos primeiros cinco dias pós insulto, nos quais a concentração de inibina, estradiol e estrógeno diminuíram, enquanto os níveis de testosterona se elevaram. Estudos mais recentes desenvolvidos por Alves et al (2016) observaram, em carneiros submetidos ao estresse térmico escrotal por 90 dias, redução nos níveis séricos de testosterona. Os níveis séricos hormonais são frequentemente úteis nos diagnósticos de degeneração testicular em garanhões e, os valores encontrados nesses casos, são aumento de FSH e LH e diminuição nos níveis de inibina e estradiol (ROSER, 1995).

2.2 Tratamentos da Degeneração Testicular

Não existe nenhum tratamento comprovado descrito na literatura para degeneração testicular, entretanto alguns autores (ALVARENGA; PAPA, 2009; BLANCHAR; VARNER, 1993) descrevem que com a retirada do agente causador haverá uma melhora gradativa neste processo. Entretanto o período e o prognóstico podem variar conforme o grau da degeneração e a resposta individual do animal (TURNER, 2007).

As substâncias antioxidantes são recomendadas (BRINSKO et al., 2005; HSU et al., 1998) por auxiliarem o retorno da função das espermatogonias, células de Leydig e Sertoli. Alvarenga e Papa (2009) descrevem a vitamina E e o selênio como substâncias que ajudam na recuperação pós degeneração.

Estudos realizados com ratos induzidos experimentalmente a criptorquidismo observaram diminuição da peroxidação lipídica e maior taxa da espermatogênese em animais suplementados com vitamina E (VIGUEIRAS-

VILLASENOR, 2011). Ainda em ratos suplementados com selênio que sofreram degeneração testicular, observa-se menor peroxidação lipídica, melhora no aspecto histológico e aumento da concentração sérica de testosterona e LH.

Apesar dos agentes antioxidantes possuírem papel importante e reconhecido frente à degeneração testicular, os resultados variam muito, as doses de administração ainda não estão bem estabelecidas. Porém, sabe-se que o tratamento com estas substâncias deve ser preventivo, ou seja, o fornecimento dos antioxidantes deve ser feito na dieta de reprodutores saudáveis (ALVARENGA; PAPA, 2009).

Devido à ausência de tratamentos comprovados para degeneração testicular, algumas pesquisas estão sendo realizadas em diversas espécies, em especial em ratos, visando a utilização de células tronco para reparar os tecidos lesionados. Dentre essas pesquisas, pode-se citar as que induziram a degeneração testicular em ratos e após comprovado o insulto, ou seja, todos os animais apresentaram-se azoospermicos, foi iniciado o tratamento com células tronco mesenquimais. Alguns dias após esta terapia, os animais foram castrados e observou-se, histologicamente, naqueles em que foi realizado o tratamento, a presença de células germinativas, o que não ocorreu nos controles (COKICI et al., 2013; MALIHEZAMAN et al., 2013; MEHRABANI et al., 2015; RAHMANIFAR et al., 2016; TRAMADON et al., 2015; VEHDATI et al., 2017).

2.3 Célula Tronco

O conceito das células tronco (CT) se iniciou no século XX, com os pesquisadores alemães Hans Spemann e Jacques Loeb, que começaram a decifrar os segredos destas células através de experimentos com células de embriões.

Através desta descoberta, uma gama de evidências surgiu sugerindo que essas células-tronco embrionárias seriam capazes de transformarem-se em quase todas as células especializadas do corpo e, portanto, teriam o potencial de gerar células de reposição para uma ampla variedade de tecidos e órgãos (TAYLOR,2007).

A deficiência celular e a incapacidade de substituir células que não desempenham sua função perfeitamente são as causas primárias de muitas doenças que diminuem o tempo e a qualidade de vida dos seres humanos e dos animais. A possibilidade de produzir números significativos de um mesmo tipo celular é fundamental para que se iniciem terapias de substituição ou reparação tecidual (PARK et al, 2008).

As Células-tronco são um tipo de célula indiferenciada, sem função específica nos tecidos, capaz de multiplicarem-se mantendo-se indiferenciadas por longos períodos, mas que mediante estímulos específicos, podem diferenciar-se em células maduras e funcionais nos tecidos. Elas têm a propriedade fundamental de divisão assimétrica, ou seja, ao mesmo tempo em que originam células precursoras com capacidade de diferenciação restrita a um determinado tecido, produzem células indiferenciadas que repõem a população de células-tronco (REYES, et al., 2001).

Suas principais características são: (a) autorrenovação, capacidade de proliferar extensivamente; (b) clonicidade, capacidade de produzir células-filhas idênticas à célula parental (geralmente originando de uma única célula) e (c)

potencialidade, capacidade de diferenciar-se em diferentes tipos celulares (GARGETT, 2004; KOLIOS; MOODLEY, 2012).

Estas células podem ser classificadas segundo sua potencialidade (habilidade para diferenciação) em totipotente (capacidade de criar um organismo inteiro inclusive placenta), pluripotente (capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas: mesoderma, endoderma e ectoderma, mas não em alguns tecidos placentários), multipotente (capacidade de diferenciação a um número limitado de linhagens) e unipotentes, podendo gerando apenas um tipo de célula (SCHWINDT et al., 2005; KOCH et al., 2008).

Podem ser classificadas de acordo com sua origem em embrionárias (encontradas nos embriões) ou adultas (extraídas dos diversos tecidos já diferenciados, tais como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical) (SCHWINDT et al., 2005; DAHLGREN, 2009). As células-tronco embrionárias exibem ilimitada capacidade de renovação e pluripotência *in vitro*, porém a predisposição destas células em formar teratomas dificulta sua possível aplicação clínica (NÖTH et al., 2010; GATTEGNO-HO et al., 2012). Por outro lado, as células-tronco adultas, encontradas em tecidos adultos e responsáveis pela manutenção tecidual normal, tem sua utilização menos controversa, pois não envolvem a clonagem e são menos susceptíveis a formação tumores (pelo seu potencial de diferenciação limitado - multipotentes) (LEUNG et al., 2006; GATTEGNO-HO et al., 2012).

Atualmente, estas células apresentam enorme potencial como fonte provedora, *in vitro*, dos mais variados tipos celulares para a realização de terapia celular, testes de novas drogas, além do estudo de sua toxicidade, bioengenharia genética e compreensão completa do processo de embriogênese (MUÑOZ et al., 2008).

2.4 Células Tronco Mesenquimais

Na década de 1960, pesquisadores descobriram que a medula óssea era composta por dois tipos de CT: as hematopoiéticas, responsáveis por originar e repor todos os tipos de células sanguíneas (linfócitos, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, hemácias e plaquetas) e as estromais ou células-tronco mesenquimais (CTM), uma população multipotente, progenitora de diversas linhagens celulares (DEL CARLO, 2005).

As CTM são precursoras multipotentes de tecidos conectivos tais como músculo, gordura, tendões, ligamentos, osso e cartilagem. Sua habilidade para auto-renovação e para diferenciação nos respectivos tecidos de interesse oferece um grande potencial para a medicina regenerativa em diversas espécies animais, incluindo a equina (Taylor, et al 2007). O isolamento de células tronco mesenquimais já foi relatado em diferentes tecidos como medula óssea (SMITH et al., 2005), tecido adiposo (VIDAL et al., 2007), cordão umbilical (KOCK et al., 2007) e sangue periférico (KOERNER et al., 2006). As Células-Tronco adultas provenientes de medula-óssea têm recebido grande atenção por apresentarem alto potencial de desenvolvimento in vitro, além de seu fácil isolamento e grande adesão. (MAYHALL et al., 2004).

Um sistema de regulação complexo é necessário para que estas células mantenham um estado indiferenciado, se proliferem em um grau adequado às necessidades do organismo e mantenham um estado intrínseco de auto-renovação. Este sistema regulatório, espacialmente organizado é denominado de “nicho”. Os nichos promovem localização física, mediado pelo contato entre células, e fatores de crescimento para que se mantenha a população de CT e controle de sua atividade proliferativa (STEWART e STEWART, 2011).

Apesar de se originarem da medula óssea, as CTM são circulantes, passando por órgãos e tecidos quando estes necessitam de reparos. Isso ocorre através de um processo fisiológico estreitamente regulado por uma complexa interação, após a mobilização das células da medula óssea. Além disso, a grande

variedade de quimiocinas secretadas pelos tecidos adjacentes pode induzi-las a diferenciarem-se em linhagens celulares distintas e específicas do nicho onde se encontram (TAKAHASHI, et al 2007). Alguns experimentos têm mostrado que CTMs circulantes tem alta capacidade de diferenciação em células do tecido hematopoiético, células do trato intestinal e ainda melhoram a função do sistema cardíaco. (SATO et al., 2004; MANGI et al., 2003).

De acordo com Chen et al. (2008) as CTMs secretam diferentes citocinas e quimiocinas, tais como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-a), fator de crescimento ligado a insulina, (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de queratinócito (KGF), fator derivado de estroma-1, angiopoietina-1, proteína inflamatória alfa e beta-1 de macrófagos e eritropoietina em quantidades maiores do que os fibroblastos da derme. Adicionalmente, foi evidenciado que a secreção desses fatores pelas CTMs recruta macrófagos e células da linhagem endotelial, aumentando assim a cicatrização da ferida.

Existem evidências de que as CTMs secretam fatores que promovem a angiogênese, protegem contra a apoptose de células locais comprometidas e recrutam e estimulam células tronco residentes, ao mesmo tempo em que inibem a inflamação e reduzem formação de fibrose (STEWART e STEWART, 2011). Além disso, estudos recentes demonstraram a função antioxidante que as CTMs possuem, fundamental para a prevenção do dano celular induzido por radicais livres (MAIA et al., 2017)

O tempo ideal para o tratamento, a dose de células a ser administrada e a via de administração permanecem ainda em discussão, seja para as diversas espécie animais, como nos diversos tipos de lesão (KOCH et al., 2009).

O uso de marcadores de superfície tem sido um método aceito para a diferenciação de linhagens de células-tronco somáticas (FORTIER, 2005). CTM carregam proteínas de superfície que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e, portanto podem ser utilizados na caracterização dessas células. CTM de humanos e ratos expressam CD105, CD73, CD44, mas não expressam

CD45 e CD31. Em adição a isso, é consenso que as CTMs cultivadas e expandidas *in vitro* são negativas para CD34. O CD34 tem sido muito utilizado como marcador para a linhagem hematopoiética (COPLAND et al, 2008).

No entanto, a imunofenotipagem em equinos é dificultada pela falta de marcadores específicos e disponibilidade limitada de anticorpos monoclonais anti-cavalo (BURK et al., 2013).

O fato das CTMs poderem se diferenciar em diferentes tipos celulares *in vitro*, sua relativa facilidade de expansão em cultura, características imunológicas, secreção de citocinas que modulam a resposta inflamatória, reestabelecem o suprimento vascular e reparam o tecido lesionado, fazem das CTMs uma fonte promissora de CT para a terapia celular (CHAMBERLAIN et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Específicos

Capítulo 1- Verificar a segurança e viabilidade das CTMs aplicadas intratesticular em ganhões clinicamente sadios.

Hipótese- A aplicação intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas obtidas da medula óssea, não causam efeitos negativos locais ou sistêmicos.

Capítulo 2- Avaliar o efeito do tratamento de CTMs sobre a histologia de ganhões submetidos ao estresse térmico escrotal.

Hipótese- As CTMs podem recuperar a arquitetura histológica dos testículos degenerados pelo estresse térmico.

REFERÊNCIAS

4. Refêrencias

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal Suplemento**, v.6, p.204-09, 2009.

ALVES, M.B.R.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P.; BATISSACO, L.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A.; OLIVEIRA, B.M.M.; TORRES, M.A.; LANÇONI, R.; RAVAGNANI, G.M.; PRADO-FILHO, R.R.; VELLONE, V.S.V.; LOSANO, J.D.A.; FRANCI, C.R.; NICHI, M.; CELEGHINI, E.C. Recovery of normal testicular temperature after scrotal heat stress in rams assessed by infrared thermography and its effects on seminal characteristics and testosterone blood serum concentration. **Theriogenology**, v.86, p.795–805, 2016.

BARTH, A.D.; BOWMAN, P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.93-102, 1994.

BEARD, W. Abnormalities of the Testicles. In: **Equine Reproduction**. MCKINNON A.O.; SQUIRES E.L.; VAALA W.E.; VARNER D.D. Ames: Wiley-Blackwell; p.1161-1165, 2011.

BLANCHARD, T.L.; JORGENSEN, J.B.; VARNER, D.D.; FORREST, D.W.; EVANS, J.W. Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.16, n.5, p. 195-201, 1996.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Testicular Degeneration. In: **Equine Reproduction**. MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Philadelphia: Lea & Febiger; p.855-60, 1993.

BORTOT, D.C.; ZAPPA, V. Aspectos da reprodução equina: inseminação artificial e transferência de embrião: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. v.21, p.1-23, 2013.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; DAY, B. C.; WILSON, M. E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v.63, p.1519-1527, 2005.

BURK, J.; BADYLAK, S.F.; KELLY, J.; BREHM, W. Equine cellular therapy – from stall to bench to bedside? **Cytometry**, v.83, p.103-113, 2013.

CAKICI, C.; BUYRUKCU, B.; DURUKSU, G.; HALILOGLU, A. H.; AKSOY, A., ISIK, A.; ULUDAG, O.; USTUN, H.; SUBASJ, C.; KARAOZ, E. Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation. **BioMed Research International**, v 3, p.1-18, 2013.

CAPLAN, A. I., Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. **STEM CELLS Translational Medicine**, v.6, p.1445–1451,2017.

CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J. Pathol**, v.217 p.318–324,2009.

CAPLAN, A.I, DENNIS, J.E. Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators. **Journal of Cellular of Biochemistry**, v.98, p.1076-1084, 2006.

CARDILLI, D.J.; TONIOLO, G.H.; PASTORE, A.A.; CANOLA, J.C.; MERCADANTE, M.E.Z.; OLIVEIRA, J.A. Padrão ultrassonográfico do parênquima, mediastino e túnicas testiculares em bovinos jovens da raça nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.899-905, 2010.

CARLSEN, E.; ANDERSSON, A.M.; PETERSEN, J.H.; SKAKKEBAEK, N.E. History of febrile illness and variation in semen quality. **Human Reproduction**, v.18, p.2089-92, 2003.

CATTELAN, J.W. Aspectos de casuística, morfométricos, morfológicos e de testosterona sérica no criptorquismo em cavalos. 2002. 64f. Tese (Livre-Docência em Clínica Cirúrgica de Grandes Animais) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

CHAMBERLAIN, G.; FOX J.; ASHTON B.; MIDDLETON J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v.25, n.11, p.2739-2749, 2007.

CHEN, Y.; SHAO, J.Z.; XIANG, L.X.; DONG, X.J.; ZHANG, G.R. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.815–820, 2008.

COPLAND, I.; SHARMA, K.; LEJEUNE, L.; ELIOPOULOS, N.; STEWART, D.; LIU, P.; LACHAPPELLE, K.; GALIPEAU, J. CD34 expression on murine marrow-derived mesenchymal stromal cells: impact on neovascularization. **Experimental Hematology**, v.36, p.93-103, 2008.

DAHLGREN, L. A. Stem Cell Therapy. In: **Current Therapy in Equine Medicine**. ROBINSON, N. E.; SPRAYBERRY, K. A. 6. ed. St. Louis: Saunders, 199, p.908-911, 2009.

DEL CARLO, R.J. Células-tronco: células da esperança. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasil, v.1, p.60-68, 2015.

EKERHOVD, E.; WESTLANDER, G. Testicular sonography in men with klinefelter syndrome shows irregular echogenicity and blood flow of high resistance. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.19, n.11, p.517-522, 2002.

FERNANDES, C. E.; DODE, M. A. N.; PEREIRA, D.; SILVA, A. E. D. F. Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. **Theriogenology**, v.70, p.1560-1568, 2008.

FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v.34, p.415-423, 2005.

FRIEDMAN R.; BULLARD J.F.; JOHNSON L.E. The effects of increased testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.127-134, 1991.

GARGETT, C. E. Stem cells in gynaecology. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.44, n.5, p.380-386, 2004.

GATTEGNO-HO, D.; ARGYLE, S. A.; ARGYLE, D. J. Stem cells and veterinary medicine: Tools to understand diseases and enable tissue regeneration and drug discovery. **The Veterinary Journal**, v.191, p.19-27, 2012.

GHASEMZADEH-HASANKOLAEI, M.; BATAVANI, R.; ESLAMINEJAD, M.B.; SAYAHPOUR, F. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells into the testes of infertile male rats and new germ cell formation. **International Journal of Stem Cells**, v.9, n.2, p.250-263, 2016.

HAMILTON, T.R.S.; MENDES, C.M.; DE CASTRO, L.S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A.F.P.; DELGADO, J.C.; GOISSIS, M.D.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A. ASSUMPÇÃO, M.E.O.D. Evaluation of lasting effects of heat stress on sperm profile and oxidative status of ram semen and epididymal sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v, p.1-12, 2016.

HSU, P.C.; LIU, M.Y.; HSU, C.C.; CHEN, L.Y.; GUO, Y.L. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. **Toxicology**, v.128, p.169-179,1998.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H.; SÖDERQUIST, L.; LUNDEHEIM, N. Effects of a brief elevation of scrotal temperature on the post-thaw viability of bull semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.30, p.271–277,1995.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v. 48, p. 1199, 1997.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Scrotal/testicular thermoregulation and the effects of increased testicular temperature in the bull. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n.2, p.271-282, 1997a.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. **Canadian Veterinary Journal**. v.49, p.1009-1017, 2008.

KOCH, T.G.; BERG, L.C.; BETTS, D.H. Current and future regenerative medicine-Principles, concepts and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.155-165, 2009.

KOCH, T.G.; HEERKENS, T.; THOMNSEN, P.D.; BETTS, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. **BMC Biotechnology**, v.7, p.26, 2007.

KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J.D.; BREHM, W.; MAINIL-VARLET, P.; GROGAN. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.24, p.1613-1619, 2006.

KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. **Respiration**, v.5, p.3-10, 2012.

LEE, L.P.K. Temperature effect on the permeability of plasma membranes of advanced germinal cells of the rat testis. **Canadian Journal of Biochemistry**, v.52, p.586-593, 1974.

LEME, D.P.; PAPA, F.O. Testicular fine needle aspiration cytology from a stallion with testicular degeneration after external genitalia trauma. **Journal of Equine Veterinary Science** v.22, n.3, p.121-24. 2002.

LEUNG, V.Y.L; CHAN, D.; CHEUNG, K.M.C. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction. **European Spine Journal**. v.15, n.3, p.406-413, 2006.

LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Ultrasonography of the scrotal contents and penis of the stallion, In: **Equine Diagnostic Ultrasonography**. RANTANEN, N.W.; MCKINNON, A.O. Williams & Wilkins, Philadelphia; p.253–269, 1998.

LUE, Y., HIKIM, A. P. S., WANG, C., BONAVERA, J. J., BARAVARIAN, S., LEUNG, A. and SWERDLOFF, R. S. Early Effects of Vasectomy on Testicular Structure and on Germ Cell and Macrophage Apoptosis in the Hamster. **Journal of Andrology**, v.18, p.166–173,1997.

MAIA, L., DE MORAES C.N., DIAS M.C., MARTINEZ J.B., CABALLOL A.O., TESTONI G., DE QUEIROZ C.M., Penã, R.D., Landim-Alvarenga, F.C., DE OLIVEIRA, E. A proteomic study of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord. **Theriogenology**, v.100, p.8-15, 2017.

MAIA, L., LANDIM-ALVARENGA, F. C., DA MOTA, L. S. L. S., DE ASSIS GOLIM, M., LAUFER-AMORIM, R., DE VITA, B., BARBERINI, D. J., LISTONI, A. J., DE MORAES, C. N., HECKLER, M. C. T. AND AMORIM, R. M., Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural, and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. **Microscopy Research Technique**, v.76, p.618–624,2013.

MANGI, A.A.; NOISEUX, N.; KONG, D.; HE, H.; REZVANI, M.; INGWALL, J.S.; DZAU, V.J. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. **Nature Medicine**, v.9, p.1195–1201, 2003.

MARCUS, S.; SHORE, L.S.; PERL, S.; BAR-EL, M.; SHEMESH, M. Infertility in a cryptorchid bull: A case report. **Theriogenology**, v.48, n.3, p.341-352, 1997.

MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. **Current Opinion Cell Biology**, v.16, p.713–720, 2004.

MEHRABANI, D.; HASSANSHAHI, M.A.; TAMADON, A.; ZARE, S.; KESHAVARZ, S.; RAHMANIFAR, F.; DIANATPOUR, M.; KHODABANDEH, Z.; JAHROMI, I.; TANIDEH, N.; RAMZI, M.; AQABABA, H.; KUHI-HOSEINABADI, O. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous

tubules of busulfan-induced azoospermic rats. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v.8, n.2, p.103-110, 2015.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.M.; DEL CARLO, R.J. Terapia celular em reparação óssea - aplicação clínica de células-tronco mesenquimais. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.11, s2, p. 95-100, 2008.

MONTEIRO, B.S. Tratamento de defeitos críticos em calvária de camundongos com células-tronco mesenquimais associadas ou não ao plasma rico em plaquetas. 2009. 109 f. Tese (Doutorado Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG.

MONSEFI, M.; FEREDOUNI, B.; ROHANI, L.; TALAEI, T. Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, v.11, n.7, p.537–544, 2013.

MUÑOZ, M.; DÍEZ, C.; CAAMAÑO, J.; JOUNEAU, A.; HUE, I.; GÓMEZ, E. Embryonic stem cells in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.32–37, 2008.

NÖTH, U.; RACKWITZ, L.; STEINERT, A.F.; TUAN, R.S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, p.765–783, 2010.

PARK, I.H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M.W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K.; DALEY, G. Q. Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. **Cell**, v.134, n.5, p.877–886, 2008.

PENG, L., JIA, Z., YIN, X., ZHANG, X., LIU, Y., MA, K., ZHOU, C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. **Stem Cells Development**, v.17, p.761-773,2008.

RAHMANIFAR, F.; TAMADON, A.; MEHRABANI, D.; ZARE, S.; ABASI, S.; KESHAVARZ, S.; DIANATPOUR, M.; KHODABANDEH, Z. JAHROMI, I.R.G KOOHI-HOSEINABADI, O.). Histomorphometric evaluation of treatment of rat azoospermic seminiferous tubules by allotransplantation of bone marrow-derived

mesenchymal stem cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v.19, n.6, p.653–661,2016.

RAMIRES-NETO, C.; MONTEIRO, G.A.; DELFIOL, D.J.Z.; FARRAS, M.C.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. **Livestock Science**, v.157, p.358-363, 2013.

RAO, V. D. N.; RAO, A. R. Influence of heat induced testicular degeneration on semen characteristics and testicular histology in rams. **Indian Veterinary Journal**, v.6, p.719-726,1977.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C.M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v.98, n.9, p.2615-2625, 2001.

SATOH, H.; KISHI, K.; TANAKA, T.; KUBOTA, Y.; NAKAJIMA, T.; AKASAKA, Y.; ISHII, T. Transplanted mesenchymal stem cells are effective for skin regeneration in acute cutaneous wounds. **Cell Transplant**, v.13, p.405–412, 2004.

SCHWINDT, T.T.; BARNABÉ, G.F.; MELLO, L.E.A.M. Proliferar ou diferenciar?: Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v.16, n.1, p.13-19, 2005.

SETCHELL, B.P.; MIEUSSET, R. Testis thermoregulation. In: **Male Gametes Production and Quality**. HAMAMAH, S.; MIEUSSET, R. p.65–88,1996.

SETTERGREN, I.; MCENTEE, K. Germ cell weakness as a cause of testicular hypoplasia in bulls. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.33, n.4, p.273-282, 1992.

SMITH, R.K.W.; WEBBON, P.M. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? **British Journal of Sports Medicine**, v.39, n.9, p.582-584, 2005.

STEWART, M.C.; STEWART, A.A. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.27, p.243-261, 2011.

TAKASHIMA, Y.; ERA, T.; NAKAO, K.; KONDO, S.; KASUGA, M.; SMITH, A.G.; NISHIKAWA, S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. **Cell**, v.129, p.1377-1388, 2007.

TAMADON, A.; MEHRABANI, D.; RAHMANIFAR, F.; JAHROMI, A. R.; PANAHI, M.; ZARE, S.; KHODABANDEH, Z.; JAHROMI, I.R.; TANIDEH, N.; DIANATPOUR, M.; RAMZI, M.; KOOHI-HOSEINABADI, O. Induction of spermatogenesis by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermia in hamster. **International Journal of Stem Cells**, v.8, n.2, p.134–145, 2015.

TAYLOR, S.E.; SMITH, M.R.W.; CLEGG, W.R. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine Veterinary Journal**, v.39, p.172-180, 2007.

TEIXEIRA, P.P.M.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; D'AMATA, C.C.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.R. Avaliação ultrassonográfica da ecogenicidade do parênquima testicular como exame complementar no andrológicode carneiros. **Nucleus Animalium**, v.3, n.1, p.31-36, 2011.

TURNER, R.M. Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.278-284, 2007.

TURNER, R.M.; ZENG, W. The emerging pathophysiology of age-related testicular degeneration with a focus on the stallion and an update on potential therapies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 178-186, 2012.

VAHDATI, A.; FATHI, A.; HAJIHOSEINI, M.; ALIBORZI, G.; HOSSEINI, E. The regenerative effect of bone marrow-derived stem cells in spermatogenesis of infertile hamster. **World Journal of Plastic Surgery**, v.6, n.1, p.18–25, 2017.

VIDAL, M.; KILROY, G.E.; LOPEZ, M.; JOHNSON, J.R.; MOORE, R.M.; GIMBLE, J.M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v.7, p.613- 622, 2007.

VIGUERAS-VILLASEÑOR, R.M.; ROJAS-CASTAÑEDA, J.C.; CHÁVEZ-SALDAÑA, M.; GUTIÉRREZ-PÉREZ, O.; GARCÍA-CRUZ, M.E.; CUEVAS-ALPUCHE, O.; REYES-ROMERO, M.M.; ZAMBRANO, E.. Alterations in the spermatogenic function generated by obesity in rats. **Acta Histochemica**, v.113, p.214-220, 2011.

VOGLER, C. J.; BAME, J. H.; DeJARNETE, J. M., McGILLIARD, M. L., SAACKE, R. G. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. **Theriogenology**. v.40, n.6, p. 1207–1219, 1993.

WATT, F.M., DRISKELL, R. The therapeutic potential of stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*,v.365, p.155-163. 2010

WATSON, E.D.; CLARKE, C.J.; ELSE, R.W.; DIXON, P.M. Testicular degeneration in 3 stallions. **Equine Veterinary Journal**, v.26, p.507-10, 1994.

CAPÍTULO 1

Artigo redigido segundo normas da Theriogenology, <http://www.theriojournal.com/content/authorinfo> ISSN 0093-691X, fator de impacto 1.838, ranqueada como A2 pelo QUALIS- CAPES de 2017.

Segurança e Viabilidade da aplicação intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas da medula óssea em garanhões

Resumo

A terapia com células tronco mesenquimais tem se mostrado promissora para o tratamento de doenças complexas em tecidos com dificuldade de regeneração. Entretanto, poucas são as pesquisas envolvendo tratamento de equinos, principalmente na área reprodutiva, em especial no aparelho reprodutor masculino. Este trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade e segurança da aplicação intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas obtidas da medula óssea, em garanhões sadios. Vinte e quatro animais sadios, foram avaliados quanto ao volume, temperatura superficial e ultrassonografia doppler testicular, cinética espermática e dosagem hormonal. Os animais foram separados em 2 grupos aleatoriamente, sendo grupo células tronco mesenquimais (CTMs) e grupo controle (GC). No CTMs foi realizada aplicação intratesticular de solução contendo células tronco mesenquimais alogênicas obtidas da medula óssea e no GC solução tampão (PBS). Após a aplicação (24 e 48h), as variáveis foram novamente analisadas e 15 dias posteriormente, os animais foram orquiectomizados e procedeu-se a análise histológica de fragmentos testiculares. Os exames clínicos não mostraram declínio da condição geral dos animais após a aplicação. Não houve diferença estatística entre os grupos após a aplicação nas variáveis volume, temperatura superficial e ultrassonografia testicular, cinética espermática e análise sérica de testosterona. A histologia não mostrou diferenças anatômicas estruturais entre os grupos. Desta forma, conclui-se que a aplicação intratesticular de CTMs alogênicas de medula óssea é um processo seguro, pois não provocou alterações locais ou sistêmicas, podendo ser realizado em procedimentos futuros, com animais com desordens testiculares.

Palavra- chave: terapia celular, equino, testículos

1.Introdução

Estudos recentes demonstraram numerosas propriedades biológicas das células tronco mesenquimais (CTMs), principalmente sua aplicação como terapia de suporte para tratar doenças complexas ou lesões em tecidos com dificuldade de regeneração. Essa terapia é uma alternativa promissora devido a alta capacidade de auto regeneração e baixa imunogenicidade das CTMs [1]. De acordo com Chen et al [2], as células tronco mesenquimais são capazes de produzir e secretar um grande número de fatores, incluindo fatores de crescimento, angiogênicos, antifibróticos, antiinflamatórios, imunomoduladores e imunossupressores, compostos responsáveis pela homeostase da matriz extracelular, e antioxidantes, além de moléculas anti-apoptóticas que desempenham papéis importantes no processo regenerativo. Todas essas propriedades estimulam o uso desta terapia para o tratamento de doenças que afetam tanto animais, assim como seres humanos, porém ainda são necessários ensaios pré-clínicos e clínicos que fortaleçam a base científica que comprova a ação destas células [3].

Os ganhões são comumente afetados por distúrbios testiculares, principais responsáveis por problemas de fertilidade nestes animais. Esses distúrbios, definidos como a atividade alterada ou inativada dos testículos, são caracterizados por um processo progressivo que leva a degeneração tecidual, prejudicando a função testicular [4].

Terapias com CTMs em cavalos se concentraram principalmente em lesões osteoarticulares e tendões [5-6], com poucos relatos de seu uso em outros tecidos, como o sistema reprodutor, em especial nos testículos. A realização de estudos pré-clínicos que avaliem a segurança do transplante da CTM por outras vias, como a intratesticular, faltam na medicina equina. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade e segurança do transplante intratesticular de células-tronco mesenquimais de medula óssea alogênica em ganhões.

2. Material e Métodos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética, de uso de animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ)- Campus de Botucatu, São Paulo, sob protocolo CEAU 28/2016.

2.1 Animais

Foram selecionados 24 equinos com idade entre 3 e 4 anos da raça Brasileiro de Hipismo, um desses animais foi selecionado aleatoriamente como doador de medula óssea. Os animais foram mantidos em piquetes e receberam feno e tiveram acesso a água e sal mineral *ad libitum*.

2.2 Punção aspirativa da medula óssea, isolamento, cultivo celular e análise imunofenotípica das CTMS por citometria de fluxo

2.2.1 Obtenção de medula óssea

A aspiração de medula óssea foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Maia et al [1]. Para isso, os animais foram mantidos em posição quadrúpede, fisicamente retidos e sedados. Em seguida, foi realizada tricotomia da área de 5 x 20 cm relacionada ao esterno de cada cavalo. Após a identificação da quinta esternobra, realizou-se antissepsia e bloqueio anestésico local (Xylestesin® 2% Cristália, BRA). Uma vez fixada, a agulha na medula óssea, modelo Komiyashiki, dentro do esterno, o mandril foi removido e procedeu à aspiração da medula óssea com a ajuda de duas seringas de 20 mL contendo 2 mL de heparina (Hemofol, Cristália, BRA) e 2 mL de PBS (PBS 1 x, LCG Biotechnology, BRA). Após a coleta, as amostras foram identificadas e enviadas ao laboratório para processamento.

2.2.2 Isolamento e cultivo de CTMs-MO

O isolamento e o cultivo das CTMs foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Maia et al [1]. A fração mononuclear das amostras da medula óssea foi isolada em gradiente Ficoll-paque após centrifugação a 350 g por 30 minutos e cultivada em meio de manutenção contendo DMEM/f12; soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina e anfotericina B a 37,5° C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. A cada 2 ou 3 dias o meio foi trocado até atingir um mínimo de 80% de confluência celular.

2.2.3 Criopreservação celular

Para a criopreservação, as CTMs foram usadas na segunda passagem (P2), os sedimentos foram ressuspensos em meio de criopreservação contendo soro fetal bovino, DMSO (Sigma), penicilina, estreptomicina e anfotericina B. Posteriormente, as CTMs foram distribuídos em criotubos e armazenados em um dispositivo de congelamento (Sigma®, Nalgene, Mr Frosty) e mantidos em um congelador de -80° C durante 24 horas e depois armazenados em um botijão de nitrogênio líquido até descongelar. Para cada criotubo, utilizou-se a concentração de células 1x10⁶.

2.2.3 Viabilidade e análise imunofenotípica das CTMs

Após a confluência as células foram recuperadas por tripsinização para viabilidade. Utilizando uma preparação do corante Azul de Tripán foi realizada a contagem de células observadas em microscópio e câmara de Neubauer. Uma outra amostra foi destinada a citometria para realização da viabilidade.

A análise imunofenotípica das CTMs foi realizada nas células primárias cultivadas, usando um citômetro LSR FORTESSA (Becton Dickinson and Company, EUA) com *mouse anti-rat* CD90 (clone OX7, 1: 100, Caltag Laboratories, EUA), *mouse anti-human* CD34 (clone 581 / CD34, 1:50, Becton Dickinson e Company, EUA) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *mouse anti-horse* CD44 (clone CVS18, 1: 100, AbD Serotec, EUA) e *mouse anti-horse* MHCII (abD Serotec,USA). A viabilidade foi realizada com associações de

anexina V-FITC (556547; BD Bioscience Pharmingen), IP (iodeto de propídio, P-4170, Sigma-Aldrich) e Hoechst 33342 (H-1399, molecular Probes Inc.) Durante a análise, foram registrados 10.000 eventos.

2.2.4 Análise citogenética

De forma complementar, algumas amostras de 3ª e 4ª passagem foram submetidas à análise do cariótipo usando a técnica de sincronização do ciclo celular pelo método do metotrexato (MTX) / timidina (Tdi). Para preparação das lâminas, as células foram tripsinizadas a 37.0°C, fixadas, coradas com Giemsa a 5% e posteriormente analisadas em microscopia de luz. Em cada amostra 12 metáfases foram analisadas.

2.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais. O grupo CTMs, o qual recebeu células tronco mesenquimais alogênicas da medula óssea e o grupo controle (GC) com 12 animais.

No grupo CTMs ambos os testículos receberam uma injeção intratesticular de células tronco mesenquimais alogênicas da medula óssea diluída em PBS (solução tampão fosfato). E no grupo GC ambos os testículos receberam uma injeção intratesticular de PBS. Todos os animais foram monitorados previamente a aplicação intratesticular e 24 e 48 horas após a aplicação. Aos 15 dias todos os animais foram orquiectomizados.

Todos os animais foram examinados: condição geral, temperatura corporal, exame testicular, morfometria, ultrassonografia, termografia, histologia e perfil sérico de testosterona.

2.4 Coleta e processamento do sêmen

A coleta do sêmen foi realizada 3 dias antes e 24 horas após as aplicações intratesticulares, utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil).

A amostra de sêmen obtida foi filtrada em filtro de nylon (Minitube do Brasil, Porto Alegre, RS, Brasil) para eliminar a fração gel. A concentração espermática foi realizada em câmara de Neubauer, e parte da amostra seminal foi diluída em meio a base de leite desnatado (Botu-Special, Botupharma Ltda., Botucatu, SP, Brasil). A seguir a cinética espermática foi avaliada pelo método computadorizado CASA (Hamilton Thorne Research- HTM IVOS 10, Beverly, MA, USA) quanto aos parâmetros porcentagem de espermatozoides com motilidade Total (MT), motilidade Progressiva (MP) e espermatozoides com movimento rápido (RAP).

2.5 Morfometria testicular

A mensuração dos testículos foi realizada pré e pós-procedimento, em todos os animais, utilizando um paquímetro, com o qual se obteve os valores de comprimento, altura e largura de cada testículo, conforme descrito por Love et al [7]. Baseado nas mensurações, foi realizado o cálculo individual do volume testicular (VT) a partir da fórmula descrita por Chenier [8]. $VT=0,053 \times \text{comprimento} \times \text{largura} \times \text{altura}$

2.6 Ultrassonografia doppler testicular

A avaliação por ultrassonografia Doppler (modelo MyLabTMFive ,ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, Itália) foi feita pré e pós realização de procedimento, conforme descrição de Pozor & McDonnel [9]. O parênquima testicular foi avaliado por Color-Doppler quanto ao número de pixels coloridos e o modo Doppler-espectral do plexo pampinorme foi utilizado para avaliar o índice de resistividade (RI) e índice de pulsatilidade (PI) em três diferentes pontos.

2.7 Avaliação da superfície escrotal por termografia

A avaliação termográfica da superfície testicular foi realizada pré e 24 e 48h após as aplicações intratesticulares utilizando termógrafo (Infra CamTM, FLIR Systems Inc.), conforme descrito por Ramires-Neto et al. [10]. As imagens foram armazenadas e analisadas (software ReportTM ThermoCAMQuick).

2.8 Transplante intratesticular das CTMs

O grupo CTMs recebeu 10×10^6 células suspensas em 5 ml de PBS intratesticular utilizando uma agulha hipodérmica 12,7 x 0,3mm. Esta aplicação foi dividida em 5 pontos, contendo 1,0 ml (2×10^6) cada ponto, nas regiões mediais da curvatura testicular, entre a cabeça e cauda do epididimo, com auxílio de ultrassonografia, mediante antisepsia prévia conforme descrito na Figura 1. O grupo controle recebeu o mesmo volume, administrado pela mesma via, nos mesmos pontos, contendo apenas PBS.

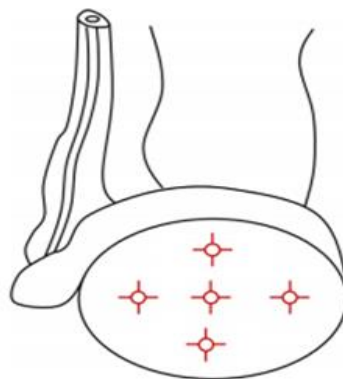


Fig.1 Desenho esquemático do testículo dos locais onde foram realizadas as aplicações.

2.9 Orquiectomia bilateral

O procedimento cirúrgico foi realizado 15 dias após as aplicações, com os animais contidos em estação, sedados com cloridrato de xilazina na dose de 1 mg/kg por via intravenosa (Sedomin®, Köning, ARG) e 40 mg/kg de cloridrato de detomidina via intravenosa (Dormiun V, Agener União, BRA). Após a administração dos sedativos, foi realizada a antisepsia da região escrotal com iodo povidine. A anestesia local da bolsa testicular foi realizada com 5 mL de

lidocaína contendo vasoconstritor (Xylestesin® 2%, Cristália, BRA). Foram realizadas duas incisões de aproximadamente 8 cm, paralelas à rafe mediana escrotal. Os testículos foram expostos pela incisão da túnica dartos e da túnica vaginal parietal, tracionados e em seguida foi efetuada uma incisão e hemostasia do funículo com o auxílio de um emasculador. Após a retirada dos testículos foi aplicado em cada incisão 10 mL de tintura de iodo 10%, administrados 40.000 UI/kg de penicilina benzatina por via intramuscular(Pentabiotico, Zoetis,BRA) e aplicados 5.000 UI de soro antitetânico via intramuscular (Vencosat, Vencofarma, BRA) como medida profilática.

2.10 Avaliação histológica

Após a retirada, os testículos foram fixados em formal tamponado a 10% e posteriormente inclusos em parafina. Os blocos de tecidos incluídos em parafina foram cortados em micrótomo na espessura de 5 µm, os fragmentos foram colocados sobre lâmina e corados por hematoxilina e eosina. Os cortes foram submetidos às análises histopatológicas de tecidos e morfometria dos túbulos seminíferos. A morfometria linear dos túbulos seminíferos foi realizada pela mensuração do diâmetro tubular (medida considerada da lâmina basal até a outra lâmina basal no sentido oposto), espessura epitelial e diâmetro luminal, observados na magnitude de 400X [11]. A análise histomorfométrica foi realizada em um sistema de análise digital de imagem (Sony Cyber-Shot 3.2 MP, modelo DSC-P71).

2.11 Avaliação dos níveis sérico de testosterona

O sangue periférico foi colhido por venopunção da veia jugular externa, em tubos comerciais estéreis sem anticoagulante, antes, 24 e 48 horas após o procedimento, no mesmo período do dia. O perfil sérico hormonal foi realizado conforme metodologia descrita por Roser [12], na qual se utilizou radioimunoensaio, para mensuração da testosterona.

2.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS 9.1.3. As variáveis foram descritas pelas médias e erro padrão, e avaliados quanto a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Para dados paramétricos foi utilizado ANOVA para medidas repetidas seguido do teste de Tukey ou teste t para comparações entre os grupos nos diferentes momentos. Os dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido por Dunn ou Mann Whitney. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Viabilidade e caracterização das CTMs.

As células provenientes da fração mononuclear da medula óssea apresentaram aderência ao plástico entre 24 e 48 horas e começaram a adquirir morfologia fibroblastóide com 4 dias de cultivo. No período compreendido entre 15 a 20 dias de cultivo, foi alcançada a confluência celular de 80%, sendo a partir deste momento conduzida a análise imunofenotípica para os marcadores CD90 (91,7%), CD44 (97,4%), CD34 (2,1%), MHCII (2,8%) e viabilidade celular (88%).

3.2 Avaliação clínica

Os exames clínicos não revelaram declínio na condição geral nem diferenças da temperatura corporal após as aplicações intratesticulares em todos os ganhões. Nenhum sinal de inflamação (como aquecimento local, dor ou edema) pode ser detectado por inspeção e palpação do escroto após cada tratamento.

3.3 Cinética espermática

Não foi observada variações na cinética espermática entre o grupo controle e grupo tratado antes e 24 horas após a aplicação intratesticular ($P > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e erro padrão da cinética espermática dos grupos controle e grupo (CTMs) pré e após a aplicação intratesticular.

	GC 0h	CTMs 0h	GC24h	CTMs 24h
MT	65,33±9,12	78,22±3,96	70,78±8,53	75,0±5,77
MP	30,33±5,19	31,33±3,19	38,44±5,24	35,33±5,11
RAP	56,0±8,75	68,67±4,53	63,33±8,71	65,56±7,23

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; GC: grupo controle; CTMs grupo celular tronco mesenquimal; GC 0h pré aplicação intratesticular PBS; GC 24h após a aplicação intratesticular PBS; CTMs 0h pré aplicação intratesticular célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 24h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea. ($p>0,05$)

3.4 Morfometria dos testículos

As mensurações e o volume testicular foram realizadas pré e após as aplicações intratesticulares dos grupos GC e CTMs os ganhos não revelaram variações significativas ($P>0,05$).

Tabela 2. Médias e erro padrão dos volumes testiculares, dos grupos CTMs e grupo GC pré e após aplicação das células tronco.

	GC 0h	GC 24h	GC 48h	CTMs 0h	CTMs 24h	CTMs 48h
TE	135,3±8,39	140,3±19,96	137,5±10,20	155,6±24,79	148,5±10,16	147,8±12,72
TD	138,9±6,60	145,9±13,62	144,4±11,10	153,1±25,13	147,7±14,46	149,4±18,64

TE: testículo esquerdo; TD testículo direito; GC: grupo controle; CTMs grupo celular tronco mesenquimal; GC 0h pré aplicação intratesticular PBS; GC 24h após a aplicação intratesticular PBS; GC 48h após a aplicação intratesticular; CTMs 0h pré aplicação intratesticular célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 24h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 48h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea. ($p>0,05$)

Tabela 3. Médias e erro padrão das mensurações dos testículos em comprimento (cm), largura (cm) e altura (cm) dos grupos CTMs e grupo controle.

	Comprimento	Largura	Altura
GC 0h	9,58±0,43	5,30±0,14	5,60±0,09
GC 24h	9,50±0,35	5,16±0,08	5,20±0,14
GC 48h	9,47±0,38	5,35±0,10	5,80±0,16
CTMs 0h	9,50±0,35	5,16±0,08	5,20±0,14
CTMs 24h	9,58±0,25	5,23±0,13	5,48±0,22
CTMs 48h	9,67±0,22	5,32±0,27	5,39±0,34

GC: grupo controle; CTMs grupo celular tronco mesenquimal; GC 0h pré aplicação intratesticular PBS; GC 24h após a aplicação intratesticular PBS; GC 48h após a aplicação intratesticular; CTMs 0h pré aplicação intratesticular célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 24h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 48h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea. (p>0,05)

3.5 Ultrassonografia e termografia

Não observou-se alteração na ecogenicidade do parênquima testicular e no fluxo sanguíneo na ultrassonografia (Tabela 4). A temperatura superficial dos testículos se manteve constante após as aplicações intratesticulares nos diferentes grupos experimentais (P>0.05) (Tabela 5).

Tabela 4. Médias e erro padrão dos índices de resistência (IR) e pulsabilidade (IP) da perfusão testicular avaliados com doppler nos grupos CTMs e grupo controle.

	0h	24h	48h
CTMs IP	1,52±0,09	1,54±0,09	1,44±0,06
GC IP	1,49±0,14	1,45±0,11	1,47±0,18
CTMs IR	0,68±0,01	0,73±0,02	0,67±0,01
GC IR	0,61±0,03	0,67±0,03	0,62±0,04

GC: grupo controle; CTMs grupo celular tronco mesenquimal; GC 0h pré aplicação intratesticular PBS; GC 24h após a aplicação intratesticular PBS; GC 48h após a aplicação intratesticular; CTMs 0h pré aplicação intratesticular célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 24h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 48h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea. (p>0,05)

Tabela 5. Médias e erro padrão da temperatura superficial escrotal dos grupos CTMs e grupo Controle.

	GC	CTMs
0h	29,82±0,2	29,29±0,13
24h	29,44±0,2	29,58±0,18
48h	29,61±0,2	29,32±0,13

GC: grupo controle; CTMs grupo celular tronco mesenquimal; GC 0h pré aplicação intratesticular PBS; GC 24h após a aplicação intratesticular PBS; GC 48h após a aplicação intratesticular; CTMs 0h pré aplicação intratesticular célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 24h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea; CTMs 48h pós aplicação intratesticular de célula tronco mesenquimal de medula óssea. ($p>0,05$)

3.6 Histologia

A inspeção macroscópica de todos os testículos, após a remoção cirúrgica, não revelou adesão da pele escrotal ou da túnica vaginal. O parênquima testicular após uma seção longitudinal através dos testículos não revelou sinais visíveis de hemorragia, fibrose ou infiltrados inflamatórios.

O exame histológico das amostras testiculares não revelou sinais de dano tecidual, como fibrose, atrofia, hemorragia ou inflamação no parênquima testicular. Os túbulos seminíferos exibiram morfologia normal, sem alterações na altura do epitélio e no diâmetro dos tubulos seminíferos.(Tabela 6)

Tabela 6. Médias e erro padrão da altura do epitélio seminífero e diâmetro dos túbulos seminíferos

	Altura Epitélio	Diâmetro Túbulo Seminífero
TE CTMs	61,39±1,01	168,9±2,78
TD CTMs	63,31±1,1	168,3±3,03
TE GC	62,64±1,30	167,8±2,96
TD GC	61,03±1,65	162,3±2,42

TE: testículo esquerdo; TD: testículo direito; CTMs: grupo célula tronco mesenquimal de medula óssea; GC grupo controle ($p>0,05$)

3.7 Análise sérica de testosterona

A concentração sérica de testosterona não apresentou alterações significativas entre os grupos estudados.

Tabela 7. Médias e erro padrão dos níveis séricos de testosterona (pg/mL) nos grupos CTMs e GC.

	0h	24h	48h
GC	1660±2,33	1627±3,55	1655±3,23
CTMs	1694±3,21	1705±3,55	1723±3,48

CTMs: grupo célula tronco mesenquimal de medula óssea; GC: grupo controle (p>0,05)

4. Discussão

Os resultados do presente trabalho demonstraram, de forma inédita, a segurança do transplante intratesticular de células tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas da medula óssea. Concordando com outros trabalhos que aplicaram célula tronco mesenquimal intrarticular [13-14], intratendinea [15], intravenoso [16], intratecal [1] e endometrial [17]. Vale ressaltar que nenhum estudo similar foi encontrado na literatura pesquisada, fato este que impediu de realizar comparações e discussões diretas com experimentos similares.

As CTMs utilizadas no presente estudo, demonstraram as características de adesão ao plástico, morfologia fibroblastoide, alta expressão dos marcadores CD 90 (91,7 %), CD 44 (97,9%) e CD 29 (99,6%), e baixa expressão do marcador CD 34 (2,1% de células hematopoiéticas) o que concorda com outros estudos [18-19]. Da mesma forma, houve pouca expressão de MHCII (2,8%) corroborando com os estudos de Guest et al. [15].

Após a aplicação das CTMs alogênicas intratesticular não foram evidenciadas alterações clínicas no local da aplicação ou sistêmicas, assim como em outros estudos [1,13,14,16,17].

Não houve diferença no padrão ultrassonográfico do estroma testicular tanto dos animais que receberam as células como no grupo controle, mantendo o mesmo padrão de normalidade conforme Monteiro et al [3]. Com relação ao Doppler, os índices de pulsatilidade e resistividade permaneceram sem alterações quando comparados pré e pós aplicação intratesticular, assim como entre os grupos CTMs e o controle. Uma vez que alteração nos valores de perfusão testicular são indicativos de degeneração [20], e que a aplicação de CTMs neste estudo não desencadeou o processo de degradação testicular.

Os animais que receberam a aplicação intratesticular de CTMs nesse estudo não apresentaram variações nos padrões de temperatura da superfície escrotal em nenhum dos exames realizados. Em estudo realizado em bovinos submetidos a castração química com cloreto de sódio 20%, observou aumento da temperatura escrotal 48h após a aplicação, conseqüente a reação inflamatória [21]. Ramires-Neto et al [10] também demonstraram que alterações na temperatura da superfície testicular observadas na termografia apresentam correlação com qualidade do seminal.

Os resultados encontrados na morfometria testicular pré e pós-aplicação intratesticular não mostraram diferença significativa. Lima et al [22] mostraram haver alteração no volume testicular após aplicação intratesticular de papaina. Blanchard; Varner [23] afirmaram a importância de mensurar os testículos rotineiramente a fim de estabelecer parâmetros individuais de normalidade que podem ser úteis em casos de suspeita de degeneração testicular.

Os achados histológicos não apresentaram indícios de perda ou redução da espermatogênese, como tecido conjuntivo denso, comprometimento vascular, ondulações da membrana basal e espessamento hialino do interstício fatores esses decorrentes de injúria, conforme descrito por Turner [24]. Os valores

encontrados na altura do epitélio seminífero estão de acordo com o intervalo sugerido por França [25] para a maioria dos animais domésticos. Os diâmetros dos túbulos seminíferos apresentaram similaridades aos encontrados por Swinestra [26] para garanhões de diferentes raças.

Os níveis séricos de testosterona não variaram ao longo do experimento ao contrário do que foi observado no trabalho de Lima [22] no qual aplicou solução de papaina e ácido láctico intratesticular em ratos promovendo degeneração química e constatou que, 48h após, os índices séricos de testosterona baixaram para menos de 1 ng/mL. Da mesma forma, Blanchard [27] após insular os testículos de garanhões mostrou que 36 horas após o insulto, houve redução dos índices séricos de testosterona e aumento de LH.

A ausência de alterações clínicas ou sistêmicas após as injeções intratesticulares de CTMs alogênicas da medula óssea mostrou ser um procedimento seguro, pois não provocou alterações locais, podendo ser realizado com segurança para o tratamento em animais com desordens testiculares.

5. Referência

[1] Maia L., da Cruz Landim- Alvarenga F, Taffarel MO, de Moraes CN, Machado GF, Melo GD, Amorim RM. **Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses.** BMC Veterinary Research, 2015,11, 63.

[2] Chen JCJ, Goldhamer, D.J. Skeletal muscle stem cell. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 2008; 1, 1-7.

[3] Monteiro BS, Argolo Neto N, Del Carlo RJ. **Células-tronco mesenquimais.** Ciência Rural, 2010, 40,238-245.

[4] Alvarenga MA, Papa FO. **Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil.** In: Anais - Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009,6,204-209.

[5] Crovace A, Lacitignola L, De Siena R, Rossi G, Francioso E. **Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study.** Vet Res Commun.2007;31:281-3.

- [6] McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werpy NM, Kawcak CE, Steadman JR. **Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects.** *Arthroscopic.* 2011;27:1552–61.
- 7] Love CC, Garcia MC, Riera FR, Kenney RM. **Evaluation of measures taken by ultrasonography and calliper to estimate testicular volume and predict daily sperm production and output.** *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1991, 44: 99-105.
- [8] Chenier TS. **The Normal Male Reproductive System.** In.: Samper, J. C., Pycock, J. F., Mckinnon, A. O. (eds). *Current Therapy in Equine reproduction.* Saunders, USA, 2007,167-170.
- [9] Pozor MA, McDonnell SM. **Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions.** *Theriogenology* 2009,61:799-810.
- [10] Ramires-Neto C, Monteiro GA, Delfiol DJZ, Farras MC, Dell'aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA. **The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions.** *Livestock Science,* 2013,157,358-63.
- [11] Gebauer MR, Pickett BW, Swierstra EE. Reproductive physiology of the stallion. II. Daily production and output of sperm. *Journal of Animal Science* 1974,39,4. 732-736.
- [12] Roser JF. **Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems.** *Animal Reproduction Science,* 2008, 107, 179– 196.
- [13] Ferris DJ, Frisbie DD, Kisiday JD, McIlwraith CW, Hague BA, Major MD, Schneider RK, Zubrod CJ, Kawcak CE, Goodrich LR. **Clinical Outcome After Intra-Articular Administration of Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in 33 Horses With Stifle Injury.** *Veterinary Surgery,* 2014, 43: 255–265.
- [14] Carrade DD, Owens SD, Galuppo LD, Vidal MA, Ferraro GL, Librach F, Buerchler S, Friedman MS, Walker NJ, Borjesson DL. **Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses.** *Cytotherapy* 2011;13:419–30.
- [15] Guest DJ, Ousey JC, Smith MR. **Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells.** *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications,*2008, 1, 1–9.
- [16] Kol A, Wood JA, Carrade Holt DD, Gillette JA, Bohannon-Worsley LK., Puchalski SM, Walker NJ, Clark KC, Watson JL, Borjesson DL. **Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not**

induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. Stem Cell Res. Ther. 2015,6, 73.

[17] Alvarenga MA, Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L, Landim-Alvarenga FC. **Feasibility and safety of endometrial injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in mares.** J Equine Vet S,2016, 42, 12-18.

[18] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement.** Cytotherapy, 2006, 8, 315–317.

[19] Taylor SE, Smith RKW, Clegg PD. **Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?** Equine Vet. J.,2007,39, p.172-180.

[20] Pozor M, Morrissey H, Albanese V, Khouzam N, Deriberprey A, Macpherson ML, Audrey A, Kelleman AA. **Relationship between echotextural and histomorphometric characteristics of stallion testes,** Theriogenology 2017,99,134-145.

[21] Andrade Neto O, Gasperin BG, Rovani MT, Ilha GF, Nobrega JE, Mondadori RG, Gonçalves PBD, Antoniazzi AQ. **Intratesticular hypertonic sodium chloride solution treatment as a method of chemical castration in cattle.**Theriogenology. 2014,15; 82(7): 1007–1011.

[22] De Lima,D. CASTRAÇÃO DE MACHOS BOVINOS EM DIFERENTES IDADES, UTILIZANDO ÁCIDO LÁTICO E PAPAÍNA, Viçosa. 2014.59f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

[23] Blanchard TL, Varner DD. **Evaluating breeding soundness in stallions: predicting potential fertility.**Vet. Med. 1997,92:815–818.

[24] Turner RM. **Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions.** Clin Tech Equine Pract, 2007,6, 278-284.

[25] França LR, Russel LD. **The testis of domestic animals.** In: Regadera, J. e Martinez-Garcia (eds.) Male Reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, 1998,197-219.

[26] Swiesrstra EE, Gebauer MR, Pickett BW.. **Reproductive physiology of the stallion I.Spermatogenesis and testis composition.** J. Reprod. Fertil. 1974,40,113-123.

[27] Blanchard KT, Allard EK, Boekelheide K. **Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. I. Apoptosis is the mechanism of germ cell death** Toxicol. Appl. Pharmacol., 1996,137,141-148.

CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo normas da Theriogenology, <http://www.theriojournal.com/content/authorinfo> ISSN 0093-691X, fator de impacto 1.838, ranqueada como A2 pelo QUALIS- CAPES de 2017.

Estudo da histologia testicular de garanhões tratados com células tronco mesenquimais alogênicas da medula óssea após a indução do estresse térmico.

Resumo

O presente estudo propõe avaliar o efeito do tratamento de células tronco mesenquimais (CTMs) sobre a histologia de garanhões submetidos ao estresse térmico escrotal. Para isso, 10 garanhões foram divididos em dois grupos: grupo controle (CT) e grupo tratado com células tronco mesenquimais (TT). O estresse térmico escrotal foi induzido com uma manta térmica (42 a 45 °C), ajustada para que ambos os testículos estivessem em contato com o calor, por três horas, durante 3 dias. Uma semana da indução, os animais do grupo tratado receberam intratesticular aproximadamente 10×10^6 CTMs diluídas em 5 mL de PBS, em cada testículo. O grupo controle recebeu o mesmo volume contendo apenas PBS. Biópsias testiculares foram coletadas em quatro diferentes momentos: T0 antes do experimento, T1 após o estresse térmico, T2 após a aplicação do PBS/CTMs e T3 30 dias após da insulação testicular. O método utilizado para promover a degeneração testicular induziu alterações no epitélio germinativo nos dois grupos, entretanto o grupo tratado com células tronco mesenquimais conseguiu recuperar as características histológica avaliadas. Os mesmos resultados não foram observados no grupo controle até o momento T3. As propriedades que as CTMs possuem para estimular a angiogênese e proliferação tecidual de fatores de crescimento, eliminar os radicais livres, aumentar a capacidade de renovação e diferenciação celular, suas ações imunomoduladora e imunossupressora podem ser os responsáveis pelos resultados encontrados 30 dias após o insulto térmico neste estudo, desta forma este artigo descreve, pela primeira vez, a viabilidade da utilização de CTMs para o tratamento de DT.

Palavra-chave: degeneração testicular, insulação térmica, garanhão, células tronco mesenquimal.

1. Introdução

A degeneração testicular em garanhões é uma importante patologia na medicina clínica reprodutiva tendo um impacto significativo na da criação de equídeos. A redução na produção espermática e conseqüente diminuição da fertilidade decorrentes da degeneração testicular são os principais fatores que levam a falha na reprodução [1]. A D é caracterizada por um processo degenerativo e necrótico das células germinativas, que perdem a capacidade de produzir espermatozoides normais [2]. É uma afecção de origem multifatorial, podendo ser temporária ou permanente e variar de discreta a severa sob o ponto de vista histológico [3].

A eficiência da espermatogênese é diretamente associada à capacidade de células germinativas se multiplicarem e diferenciarem. Fatores como o aumento da temperatura acima dos níveis fisiológicos são responsáveis por afetar a estrutura do epitélio seminífero, levando a perda do potencial reprodutivo [4]. Normalmente essa degeneração está associada ao aumento temperatura corporal e local, devido a condições ambientais ou patológicas como infecções, traumas, neiolisis e torções testiculares [5]. O aumento da temperatura testicular, por interferir no mecanismo de termorregulação, aumenta o metabolismo e a demanda de oxigênio, diminuindo o fluxo sanguíneo nos testículos, causando morte celular [6]. Quanto mais grave e mais prolongado for o fator determinante do aumento da temperatura testicular maior será o comprometimento da espermatogênese e mais demorada à recuperação da função testicular [7].

Para estudar a degeneração testicular de forma controlada, se faz necessária a sua indução por meios conhecidos, e esta é descrita na literatura como transtornos na termorregulação testicular [8,9]. O calor experimental sobre os testículos pode causar um processo degenerativo e tem fornecido novas informações sobre os mecanismos desencadeadores dos danos à espermatogênese e de tratamentos que podem prevenir os danos testiculares,

levando ao bloqueio da apoptose [10]. A indução da degeneração testicular por insulação escrotal é o modelo que mais mimetiza o aumento de temperatura acima dos níveis fisiológicos ou ambientais [11].

Não há um tratamento comprovado para degeneração testicular, entretanto, a terapia celular com células tronco mesenquimais tem sido recentemente utilizada como alternativa em animais de laboratório para o tratamento da infertilidade. As células tronco mesenquimais estimulam a angiogênese e proliferação tecidual, proteção das células T de processos inflamatórios crônicos [12], eliminação dos radicais livres [13], possuem capacidade de renovação e diferenciação [14], e ação imunomoduladora [15] e imunossupressora [16]. Ratos submetidos a degeneração testicular retomaram a atividade espermatogênica após a aplicação local de células tronco mesenquimais [17]. Essa terapia consiste na reparação do tecido ou órgão com a substituição das células perdidas pelas células tronco mesenquimais [18].

Estudos envolvendo a terapia de CTMs em cavalos se concentraram principalmente em lesões osteoarticulares e tendões, com raros estudos de seu uso em outros tecidos, como o sistema reprodutor, em especial nos testículos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a arquitetura histológica de testículos de garanhões tratados com células tronco mesenquimais alogênicas de medula óssea após a indução do estresse térmico testicular.

2. Material e Método

Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia (FMVZ)- Unesp de Botucatu, sob protocolo CEUA 28/2016.

2.1 Animais

Foram utilizados 10 garanhões com idade entre 3 e 4 anos da raça Minihorse. Os animais foram examinados por biopsia testicular para comprovar a capacidade e padrão reprodutivo individual.

2.2 Punção aspirativa da medula óssea, isolamento, cultivo celular e Análise imunofenotípica das CTMS por citometria de fluxo

2.2.1 Obtenção de medula óssea

A aspiração de medula óssea foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Maia et al [1]. Para isso, os animais foram mantidos em posição quadrúpede, fisicamente retidos e sedados. Em seguida, foi realizada tricotomia da área de 5 x 20 cm relacionada ao esterno de cada cavalo. Após a identificação da quinta esternebra, realizou-se antissepsia e bloqueio anestésico local (Xylestesin® 2% Cristália, BRA). Uma vez fixada, a agulha na medula óssea, modelo Komiyashiki, dentro do esterno, o mandril foi removido e procedeu à aspiração da medula óssea com a ajuda de duas seringas de 20 mL contendo 2 mL de heparina (Hemofol, Cristália, BRA) e 2 mL de PBS (PBS 1 x, LCG Biotechnology, BRA). Após a coleta, as amostras foram identificadas e enviadas ao laboratório para processamento.

2.2.2 Isolamento e cultivo de CTMs-MO

O isolamento e o cultivo das CTMs foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Maia et al [1]. A fração mononuclear das amostras da medula óssea foi isolada em gradiente Ficoll-paque após centrifugação a 350 g por 30 minutos e cultivada em meio de manutenção contendo DMEM/f12; soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina e anfotericina B a 37,5° C, numa atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. A cada 2 ou 3 dias o meio foi trocado até atingir um mínimo de 80% de confluência celular.

2.2.3 Criopreservação celular

Para a criopreservação, as CTMs foram usadas na segunda passagem (P2), os sedimentos foram ressuspensos em meio de criopreservação contendo soro fetal bovino, DMSO (Sigma), penicilina, estreptomicina e anfotericina B. Posteriormente, as CTMs foram distribuídos em criotubos e armazenados em um

dispositivo de congelamento (Sigma®, Nalgene, Mr Frosty) e mantidos em um congelador de -80° C durante 24 horas e depois armazenados em um botijão de nitrogênio líquido até descongelar . Para cada criotubo, utilizou-se a concentração de células 1×10^6 .

2.2.3 Viabilidade e análise imunofenotípica das CTMs

Após a confluência as células foram recuperadas por tripsinização para viabilidade. Utilizando uma preparação do corante Azul de Tripán foi realizada a contagem de células observadas em microscópio e câmara de Neubauer. Uma outra amostra foi destinada a citometria para realização da viabilidade.

A análise imunofenotípica das CTMs foi realizada nas células primárias cultivadas, usando um citômetro LSR FORTESSA (Becton Dickinson and Company, EUA) com *mouse anti-rat* CD90 (clone OX7, 1: 100, Caltag Laboratories, EUA), *mouse anti-human* CD34 (clone 581 / CD34, 1:50, Becton Dickinson e Company, EUA) marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e *mouse anti-horse* CD44 (clone CVS18, 1: 100, AbD Serotec, EUA) e *mouse anti-horse* MHCII (abD Serotec,USA). A viabilidade foi realizada com associações de anexina V-FITC (556547; BD Bioscience Pharmingen), IP (iodeto de propídio, P-4170, Sigma-Aldrich) e Hoechst 33342 (H-1399, molecular Probes Inc.) Durante a análise, foram registrados 10.000 eventos.

2.2.4 Análise citogenética

De forma complementar, algumas amostras de 3ª e 4ª passagem foram submetidas à análise do cariótipo usando a técnica de sincronização do ciclo celular pelo método do metotrexato (MTX) / timidina (Tdi). Para preparação das lâminas, as células foram tripsinizadas a 37.0°C, fixadas, coradas com Giemsa a 5% e posteriormente analisadas em microscopia de luz. Em cada amostra 12 metáfases foram analisadas.

2.3 Grupos Experimentais

Os garanhões foram divididos em dois grupos experimentais aleatoriamente: grupo controle (CT, n= 5) os animais foram expostos ao estresse térmico testicular e posteriormente receberam PBS (solução tampão fosfato) intratesticular; grupo tratado com célula tronco mesenquimal (TT, n= 5) os animais foram expostos ao estresse térmico testicular e posteriormente receberam células tronco mesenquimais intratesticular.

2.4 Indução do estresse térmico testicular

A indução da degeneração foi realizada conforme descrito por Leme [19] com modificações (Figura 1). Utilizando um suporte suspensório acoplado a uma manta térmica (42 a 45° C) ajustada para que ambos os testículos estivessem em contato com o calor, por três horas, durante 3 dias para os 10 animais.



Fig.1 Método utilizado para induzir o estresse térmico testicular.

2.5 Terapia com células tronco mesenquimal alogênicas intratesticular

Sete dias após o insulto térmico, o grupo TT recebeu por via intratesticular 10×10^6 CTMs em 5 mL de PBS, em cada testículo, utilizando uma agulha hipodérmica $12,7 \times 0,3$ mm. A aplicação foi dividida em 5 pontos, sendo 1,0 mL (2×10^6) em cada ponto, nas regiões mediais da curvatura testicular, entre a cabeça e cauda do epidídimo (Figura 2), com auxílio de ultrassonografia, mediante antissepsia. O grupo controle (CT) recebeu o mesmo volume, administrado pela mesma via, nos mesmos pontos, contendo apenas PBS.

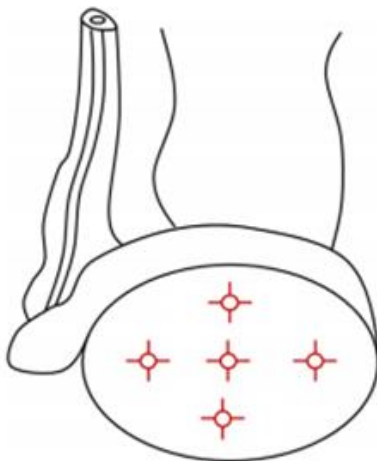


Fig. 2 Desenho esquemático do testículo dos locais onde foram realizadas as aplicações.

2.5 Avaliação histopatológica

A biopsia testicular foi realizada nos três momentos, com os animais contidos em estação, sedados com cloridrato de xilazina na dose de 1 mg/kg por via intravenosa (Sedomin®, Köning, Argentina), associado a 40 mg/kg de cloridrato de detomidina (Dormiun V, Agener União, Brasil). Após a administração dos sedativos, foi realizada a anti-sepsia da região escrotal com iodo povidini tópico. A anestesia local da bolsa testicular foi realizada com 5 mL lidocaína contendo vasoconstritor (Xylestesin® 2%, Cristália, Brasil), e a biopsia realizada, utilizando uma agulha TRU-CUT (Gallini, Itália) de 16 gauge, conforme descrito por Faber [20]. Foram coletadas amostras teciduais destinadas a histologia. Os fragmentos foram fixados em formol salina 10%, incorporados em parafina e seccionados em espessura de 5 µm e posteriormente corados com hematoxilina-eosina (HE).

As coletas das amostras para os exames foram realizadas nos momentos (T0) antes do início do experimento, uma semana após o estresse térmico (T1), uma semana após a aplicação intratesticular PBS/CTMs (T2) e 30 dias após o estresse térmico (T3).

As amostras dos momentos T0/T1/T2 foram coletadas com agulha TRU-CUT e do momento T3 foi coletada após a orquiectomia bilateral.

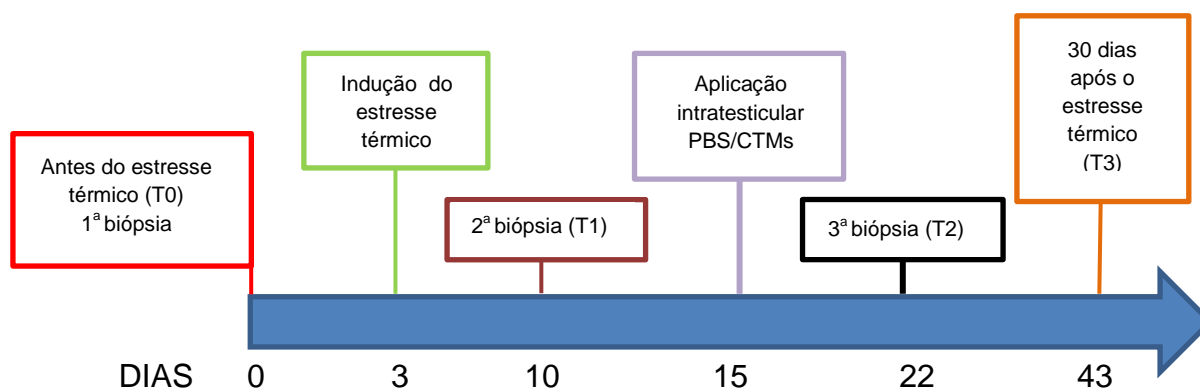


Fig. 3 Esquema do delineamento experimental.

Biópsia testicular

As avaliações histológicas foram realizadas de forma quantitativa por microscópio de luz sob aumento de 400x (Primo Star, Zeiss, Germany).

Contagem de espermatozoides na luz do túbulo seminífero: 0- ausência de espermatozoides, 1- 1 até 20 espermatozoides, 2- 21 a 50 espermatozoides, 3- 51 a 100 espermatozoides, 4- >101 espermatozoides.

Gravidade da lesão da arquitetura tubular foi avaliada por escores: 0-ausente, 1- leve, 2-moderada 3- moderado/grave, 4- grave.

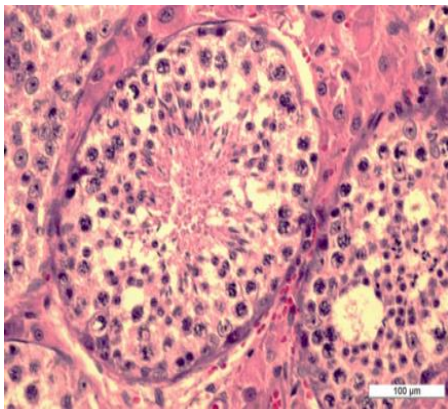
Epitélio celular do túbulo seminífero: 0 ausência de camadas celulares, 1- somente células de Sertoli 2- até duas camadas celulares, 3- até quatro camadas celulares, 4- > quatro camadas celulares.



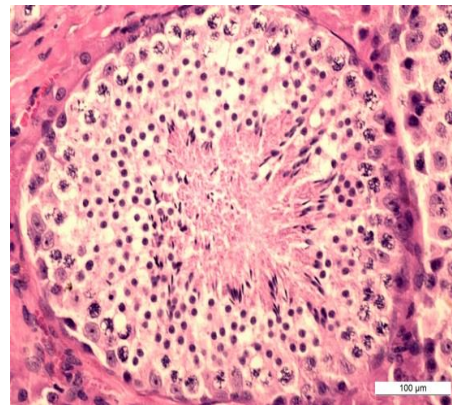
Ausência de espermatozoides



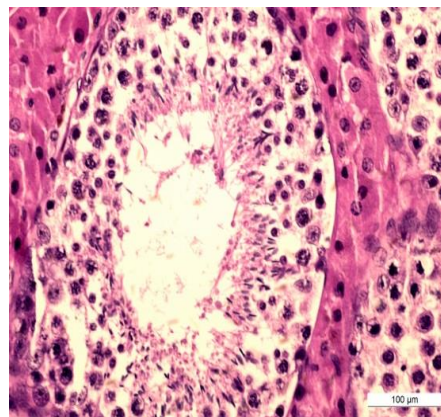
1-20 espermatozoides



21-50 espermatozoides

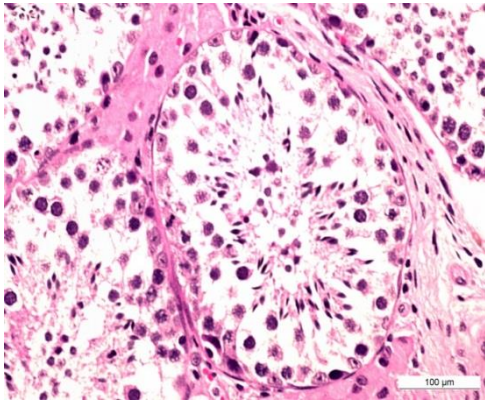


51-100 espermatozoides

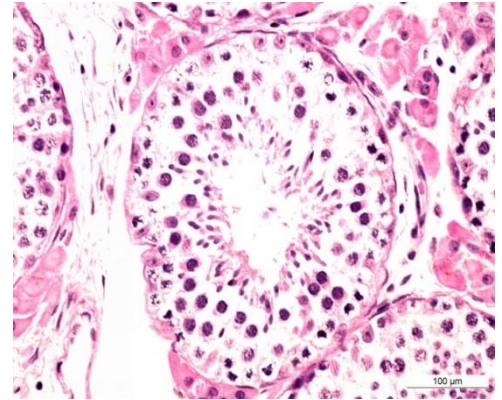


> 101 espermatozoides

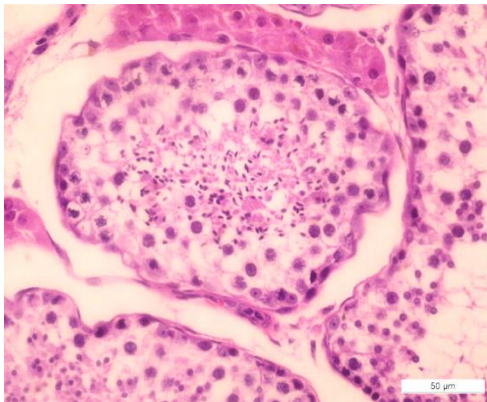
Fig. 4 Contagem de espermatozoides na luz do túbulo seminífero



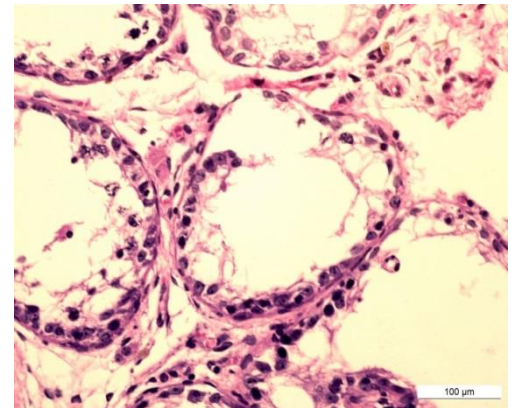
ausente lesão



ausente lesão

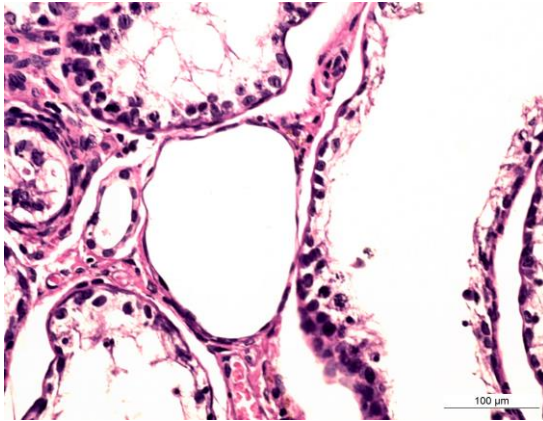


lesão moderada

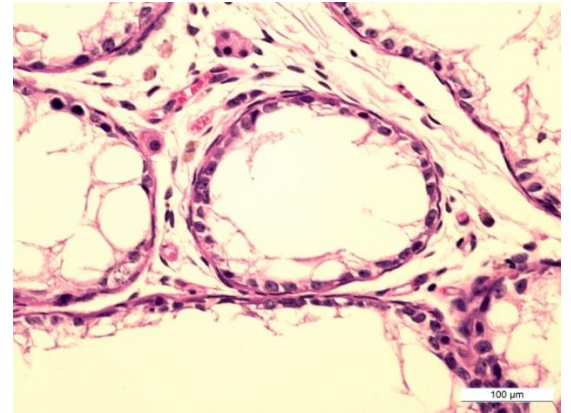


lesão grave

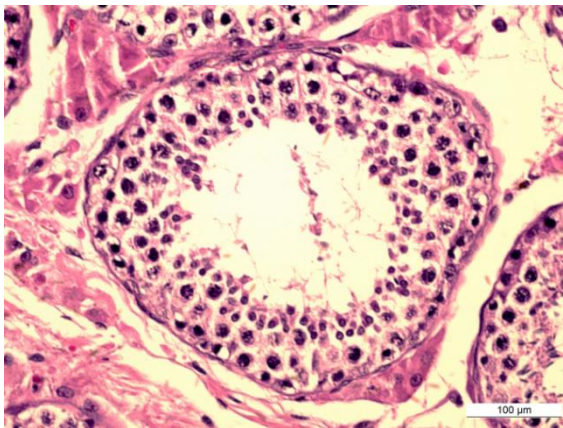
Fig. 5 Gravidade da lesão da arquitetura tubular



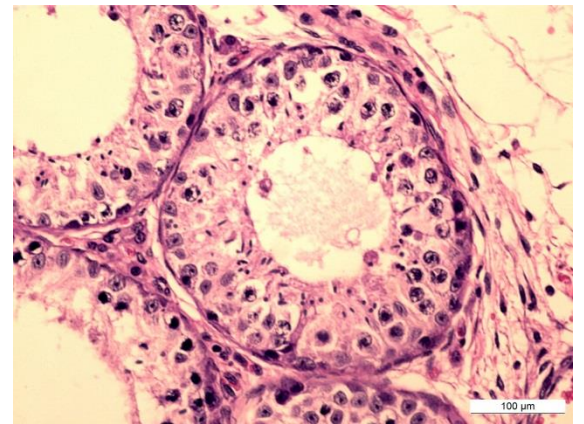
ausência de camadas celulares



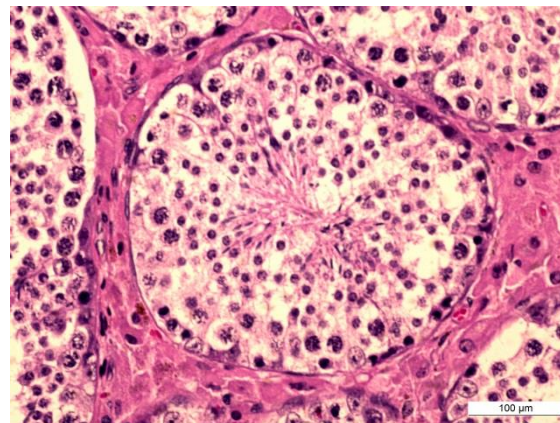
somente células Sertoli



até duas camadas celulares



até quatro camadas celulares



> quatro camadas celulares

Fig. 6 Epitélio celular dos túbulos seminíferos

2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico SAS 9.1.3. Os escores das avaliações histológicas foram realizados com a análise não paramétrica utilizando o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de Dunn e Mann Whitney. Diferenças significativas foram consideradas quando $P < 0,05$.

3. Resultados

As alterações histopatológicas do parênquima testicular nos grupos controle e tratado estão descritos na Fig. 7.

As figuras A e B mostram diferença estatística ($P < 0,05$) com relação ao escore de espermatozoides na luz do túbulo seminífero e epitélio do túbulo seminífero quando comparou-se o grupo controle do grupo tratado apenas no momento T3. Comparando-se os diferentes momentos no mesmo grupo, o grupo controle apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) entre o momento T0 e os demais momentos, enquanto que no grupo tratado os escores tiveram uma diminuição nos momentos T1 e T2 ($P < 0,05$) com relação ao T0. O escore do momento T3 aumentou em comparação com os momentos T1 e T2 e retornou ao escore do momento T0 ($P < 0,05$).

A figura C da arquitetura dos túbulos seminíferos apresentou diferença estatística quando comparou-se o grupo controle do grupo tratado no momento T2 e T3 ($P < 0,05$). Comparando-se os diferentes momentos no mesmo grupo, no grupo tratado os scores tiveram uma diminuição nos momentos T1 em relação ao T3 ($P < 0,05$). O grupo controle não apresentou diferenças nos diferentes momentos ($P > 0,05$).

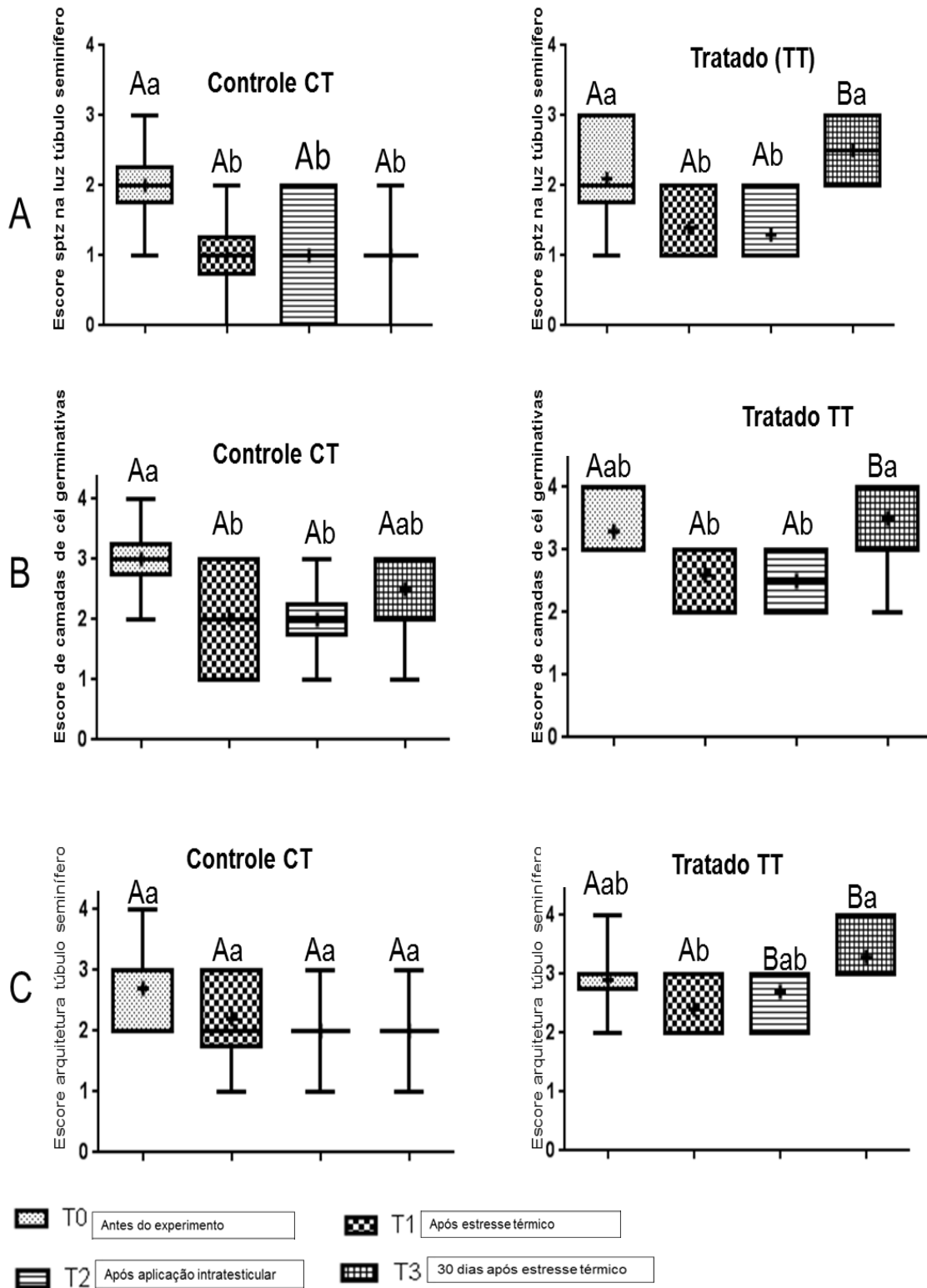


Fig. 7 Boxplot Mediana, mínimo e máximo dos escores do grupo controle e tratado dos diferentes momentos. **AB** Letras maiúscula diferem entre si entre CT e TT no mesmo momento **ab** Letras minúsculas diferem entre si entre os tempos do mesmo grupo

4. Discussão

O resultado do presente estudo demonstrou que o modelo de indução do estresse térmico proposto utilizando uma manta térmica promoveu danos à espermatogênese. A indução da degeneração testicular por insulação escrotal é o modelo que mais mimetiza o aumento de temperatura acima dos níveis fisiológicos ou ambientais [11].

A insulação provocada neste experimento mostrou que o tempo de três horas de exposição dos testículos a temperaturas entre 42 e 45°C, durante três dias, foi eficiente para promover danos à espermatogênese. A elevação da temperatura pode aumentar a demanda metabólica, e conseqüentemente levar a um quadro de hipóxia, constituindo outro fator prejudicial a espermatogênese [7]. Estudos realizados por Blanchard [5] e Friedman [21], também observaram diferenças significativas nos parâmetros espermáticos após a insulação por 24 a 48hs.

Assim como nos trabalhos de Turner [1], Aupperle [22], sobre degeneração testicular, este estudo também encontrou alterações na quantidade de espermatozoides na luz do túbulo seminífero, nas camadas de células germinativas e arquitetura dos túbulos seminíferos após o estresse térmico. A avaliação histológica demonstra ser uma ferramenta útil para quantificar e qualificar a espermatogênese, pois através dessa técnica foi possível observar as mudanças estruturais nas células e tecidos, assim como descrito por MICKLEM; SANDERSONS [23].

Avaliando-se o grupo controle, observa-se que o número de espermatozoides na luz do túbulo seminífero apresentou diminuição significativa quando comparados os momentos T0 e T1 (antes e após insulto de temperatura), além de não retornarem aos padrões iniciais no momento T3. Blanchard [24] relata que em ganhões com degeneração testicular, os túbulos seminíferos contêm quase que exclusivamente células de Sertoli e ausência de espermatozoides no lume tubular, o que também foi constatado em alguns animais deste estudo. Entwistle et al, [25] descrevem que a degeneração testicular altera as células da

linhagem espermatogênica, ocorrendo picnoses nucleares e perdas na meiose, levando ao aumento do número de espermátides prematuras no lume após o estresse térmico, corroborando com os achados deste estudo.

Tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com células tronco observaram-se as alterações decorrentes do insulto térmico, porém, no grupo tratado com células tronco, houve retorno dos padrões iniciais de escores de espermatozoides na luz do túbulo seminífero; epitélio de células germinativas e arquitetura dos túbulos seminíferos após 30 dias do insulto, o que não aconteceu com o grupo controle.

O estresse térmico pode causar morte das células espermatogênicas e gerar espécies reativas de oxigênio [26]. No presente trabalho, a utilização das células tronco mesenquimais no grupo tratado demonstra uma melhora dos parâmetros histológicos significativa quando comparado com grupo controle e isto pode estar relacionado à ação antioxidante e anti-inflamatória dessas células como citado anteriormente. Além destes, a regulação da angiogênese, o processo no qual novos vasos sanguíneos são formados por brotamento de uma vasculatura pré-existente [27], o que pode ter auxiliado no processo de regeneração.

Outro fator importante observado no grupo tratado é o retorno da normalidade da arquitetura do túbulo seminífero, uma vez que nos quadros de degeneração testicular ocorrem um espessamento da lamina basal dos túbulos seminíferos, fibrose da túnica e do tecido conjuntivo intertubular. Acredita-se que essa melhora significativa pode ter ocorrido devido aos fatores quimiotáticos que modulam o processo inflamatório [28].

Há também o efeito antiapoptótico exercido por essas células, que restauram o microambiente das células, funcionando como uma fábrica de mediadores locais, estimulando a proliferação e sobrevivência celular em determinados tecidos [29].

Em concordância com esse trabalho, Mohamed et al [17] avaliaram o efeito do tratamento com células tronco mesenquimais após indução da degeneração com

gentamicina em ratos e observaram que os animais tratados recuperaram a arquitetura dos túbulos seminíferos e retornaram a atividade espermatogênica. Monsefi [30] induziu a azoospermia em ratos com busulfan e posteriormente tratou com células tronco mesenquimais produzindo nova formação de células germinativas testiculares.

Entretanto a discordância entre autores sobre o mecanismo como essas células conseguem reparar ou repopular o ambiente testicular ainda é grande. Alguns autores acreditam que essas células, através dos fatores de crescimento, fatores angiogênicos e reparação tecidual conseguem retornar as atividades dos túbulos seminíferos [31], enquanto outros acreditam que as células tronco mesenquimais podem se diferenciar em células da linhagem germinativa e repopular os túbulos danificados [32].

Os resultados do presente estudo mostraram que as células tronco mesenquimais foram eficientes e promoveram a recuperação da histologia após o estresse térmico, provavelmente devido aos fatores regenerativos que essas células possuem, contribuindo assim para tratamento de degeneração testicular das diferentes espécies.

5. Refêrencias

- [1] Turner RM. **Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions**. Clin Tech Equine Pract, 2007,6, 278-284.
- [2] Vogler CJ, Bame JH, Dejarnette JM, Mcgilliard ML, Saacke RG. **Effects Of Elevated Testicular Temperature On Morphology Characteristics Of Ejaculated Spermatozoa In The Bovine**. Theriogenology,1993, V.40, P.1207-1219.
- [3] Camp SDV..**Common Causes of infertility in the bull**. Veterinary Clinics of North America, 1997,13(2):203-31.
- [4] Foster RA.; Ladds, PW. **Male genital system**, In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. (Eds.). Pathology of domestic animals. St. Louis, MO:Elsevier Limited, 2007,p.590.

- [5] Blanchard KT, Allard EK, Boekelheide K. **Fate of germ cells in 2,5-hexanedione-induced testicular injury. I. Apoptosis is the mechanism of germ cell death** Toxicol. Appl. Pharmacol., 1996,137,141-148.
- [6] Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. **Testicular vascular cone development and its association with scrotal temperature, semen quality, and sperm production in beef bulls.** Animal Reproduction Science, 2012,134:135-140.
- [7] Alvarenga MA, Papa FO. **Principais distúrbios reprodutivos observados em garanhões no Brasil.** In: Anais - Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2019,6,204-209.
- [8] Setchell BP. **The effects of heat on the testes of mammals.** Animal Reproduction, 2006,v.3, n.2, p.81-91.
- [9] Arteaga AA, Barth AD, Brito LFC. **Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls.** Theriogenology, 2005.v. 64, n. 2, p. 408-415.
- [10] Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D, Silva AEDF. **Effects of scrotal insulation in Nellore bulls on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability.** Theriogenology, 2008, v. 70, n. 9, p. 1560- 1568.
- [11] Souza LWO. **Efeitos da somatotropina recombinante bovina sobre as características espermáticas, concentrações de testosterona e IGF-I no plasma seminal de touros (Bos taurus taurus) submetidos à degeneração testicular.** 2004. 183 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- [12] Caplan AI, Dennis JE. **Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators.** Journal of Cellular Biochemistry, 2006,v.98, p.1076-1084.
- [13] Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Ma K, Zhou C. **Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue.** Stem Cells Dev 2008,17: 761-773.
- [14] Watt FM, Driskell R. **The therapeutic potential of stem cells.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2010,365: 155-163.

- [15] Monteiro BS. et al. **Terapia celular em reparação óssea - aplicação clínica de células-tronco mesenquimais**. Ciência Veterinária nos Trópicos, 2008,v.11, s2, p. 95-100.
- [16] Caplan A. **Why are MSCs therapeutic? New data: new insight**. J. Pathol.,2009, 217: 318–324.
- [17] Mohamed SM, ElHawary NM, Mohamed SF, Hashim NI, Saleh SY, Bakeer MR, Sawiress FA. **Effect of Stem Cell Therapy on Gentamicin Induced Testicular Dysfunction in Rats**. J Health Med Informat,2017 8: 263.
- [18] De Vita B, Campos LL, Listoni AJ, Maia L, Sudano M.J, Curcio BR, Landim-Alvarenga FC, Prestes NC. **Isolamento, caracterização e diferenciação de células-tronco mesenquimais do líquido amniótico equino obtido em diferentes idades gestacionais**. Pesquisa Veterinária Brasileira, 2013,33(4), 535-542
- [19] Faber NF, Roser JF. **Testicular biopsy in stallions: diagnostic potential and effects on prospective fertility**. Journal of Reproduction Fertility Supply, v. 56, p. 31-42, 2000.
- [20] Leme, D.P. Características seminais, citológicas e histológicas antes e depois do estresse calórico testicular, em garanhões. Botucatu, 1998,dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- [21] Friedman R, Daels PF, Scott M, Roser JF, Mohammed H, Hughes JP. **Endocrine profiles of stallions with impaired testicular function due to increased testicular temperature**. Society for the Study of Reproduction ,1995,1,641-646.
- [22] Aupperle H, Gerlach K, Bartmann CP, Et Al. **Histopathological Findings In The Cryptorchid Testes Of Stallions**. Pferdeheilkunde, V.15, P.515-522, 1999.
- [23] Micklem K, Sanderson J. **Digital imaging in pathology**. Current Diagnostic Patology, v. 7, p. 131- 140, 2001.
- [24] Blanchard TL, Varner DD. **Testicular Degeneration**. In Equine Reproduction. McKinnon AO, Voss JL. Philadelphia: Lea & Febiger; p. 855-60, 1993.
- [25] Entwistle K. **A brief update on male reproductive physiology**. In: HOLROYD, R.G., ed. Bull fertility: proceedings of a workshop. Queensland: Department of Primary Industries, 1993. p.1-6.

- [26] Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. **Factors affecting spermatogenesis in the stallion.** Theriogenology, v. 48, p. 1199-216, 1997.
- [27] Paquet J, Deschepper M, Moya A, Logeart-Avramoglou D, Boisson-Vidal C, Petite H. **Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions.** Stem Cells Translational Medicine. 2015;4(7):809-821.
- [28] Weiss DJ, Kolls JK, Ortiz LA, Panoskaltsis-Mortari A, Prockop DJ. **Stem cells and therapies in lung biology and lung diseases.** Proc. Am.Thorac. Soc., 2008, v. 5, p. 637-667,.
- [29] Caplan A.I, Correa D.**The Msc: An Injury Drugstore.** Cell stem cell. 2011;9(1):11-15.
- [30] Monsefi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T. **Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats.** Iranian Journal of Reproductive Medicine, v.11, n.7, p.537–544, 2013.
- [31] Lassalle B, Mouthon MA, Riou L, Barroca V, Coureuil M, Boussin F, Testart J, Allemand I, Fouchet P. **Bone marrow-derived stem cells do not reconstitute spermatogenesis in vivo.** Stem Cells 2008,26: 1385-1386.
- [32] Hua J, Qiu P, Zhu H, Cao H, Wang F, Li W. **Multipotent mesenchymal stem cells (MSCs) from human umbilical cord: potential differentiation of germ cells.** Afr J Biochem Res 2011,5: 113-123.

CONCLUSÕES

Artigo 1

A ausência de alterações clínicas ou sistêmicas após as injeções intratesticulares de CTMs alogênicas da medula óssea mostrou ser um procedimento seguro, pois não provocou alterações locais, podendo ser realizado com segurança para o tratamento em animais com desordens testiculares.

Artigo 2

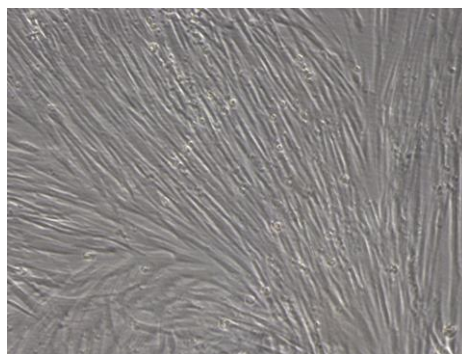
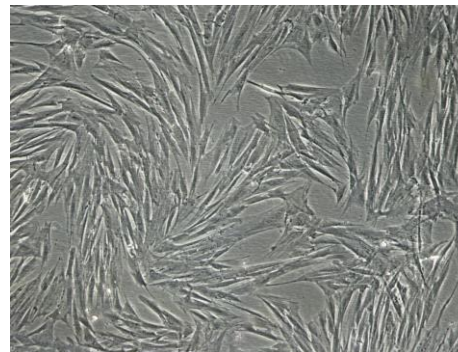
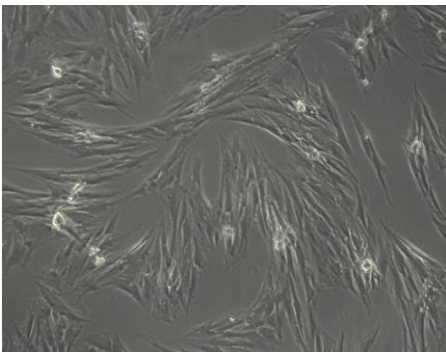
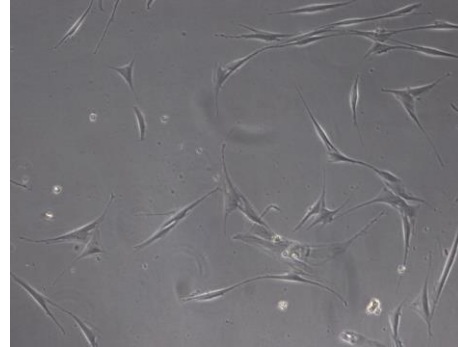
Os resultados do presente estudo mostraram que as células tronco mesenquimais foram eficientes e promoveram a recuperação da histologia após o estresse térmico, provavelmente devido aos fatores regenerativos que essas células possuem, contribuindo assim para tratamento de degeneração testicular das diferentes espécies.

ANEXOS

Anexo I- Aspiração da medula óssea



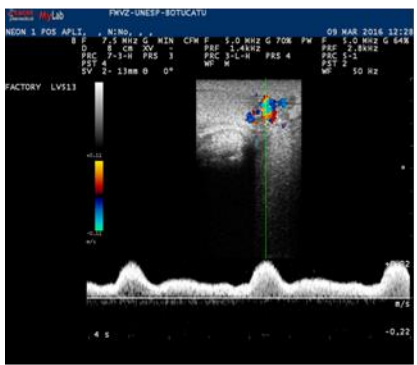
Anexo II - Cultivo das células tronco mesenquimais obtidas da medula óssea



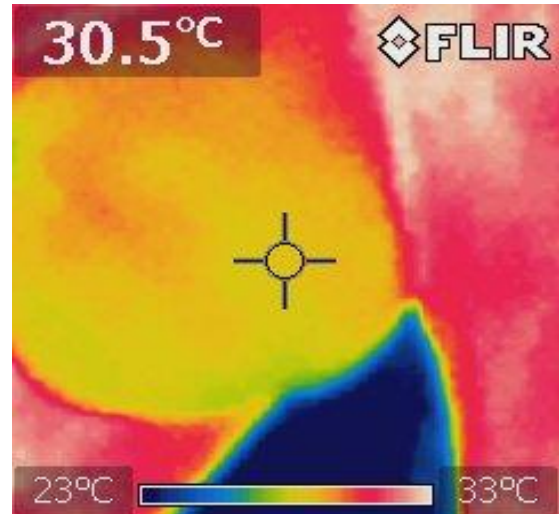
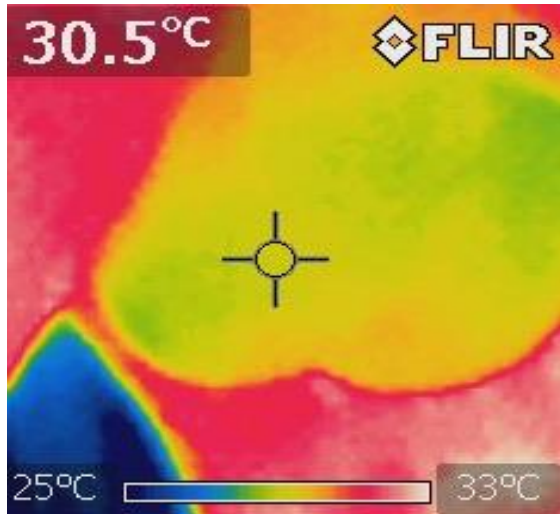
Anexo III- Mensurações Testiculares

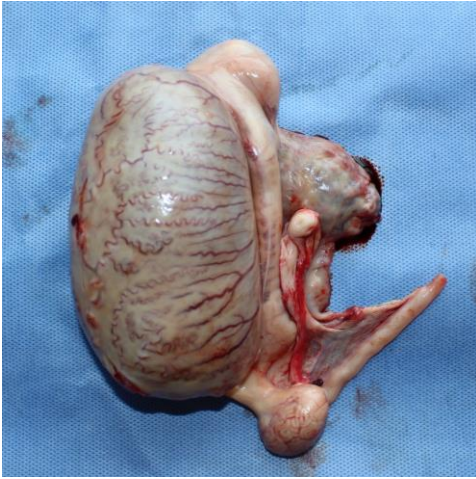


Anexo IV- Ultrassonografia doppler dos testículos



Anexo V- Termografia superficial dos testículos



Anexo VI- Testículos após castração

Anexo VII- Aplicação intratesticular de CTMs/PBS



Anexo VIII- Biopsias Testiculares

