

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA  
REGIÃO CENTRO-OESTE

JULIANO RODRIGUES OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFERTILIDADE CAUSADA POR  
QUIMIOTERAPIA**

Campo Grande, MS.  
2019

JULIANO RODRIGUES OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFERTILIDADE CAUSADA POR  
QUIMIOTERAPIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Campo Grande, MS.  
2019

JULIANO RODRIGUES OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS  
EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFERTILIDADE CAUSADA POR  
QUIMIOTERAPIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul como requisito para obtenção do título de Doutor.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Andréia Conceição Brochado Antonioli-Silva  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Dr. Marco Antônio Gonçalves  
Hospital Regional de Mato Grosso do Sul

---

Profa. Dra. Larissa Correa Hermeto  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

---

Dr. João Alexandre Queiroz Juveniz  
Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP/EBSERH

---

Prof. Dr. Roberto Antonioli da Silva  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Campo Grande, MS.  
2019

## DEDICATÓRIA

## AGRADECIMENTOS

## RESUMO

### **Oliveira, J. R. AVALIAÇÃO DO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS EM MODELO EXPERIMENTAL DE INFERTILIDADE CAUSADA POR QUIMIOTERAPIA**

[Tese de doutorado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2019.

O câncer é uma doença que acomete um grande número de pessoas e essas, em geral, são submetidas à quimioterapia. Um dos efeitos adversos dessa terapêutica são as lesões testiculares com a redução a fertilidade e uma das alternativas para o tratamento desses casos é a terapia celular. Assim, a presente pesquisa avaliou um protocolo de explante de células tronco mesenquimais do tecido adiposo bem como os avaliou os efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, sob o epitélio germinativos de camundongos Swiss tratados com ciclofosfamida. Os grupos experimentais foram: (I) Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Os resultados indicaram que o transplante das CTM não altera a frequência de micronúcleos no sangue periférico. Mas, melhora a qualidade do epitélio germinativo sendo o escore de qualidade do grupo CP + CTM igualado ao do grupo CN. Frente ao exposto considera-se que a maior contribuição desse artigo foi apresentar um protocolo de explante de células tronco mesenquimais de fragmento de tecido adiposo viável para ser transladado para pesquisas clínicas devido ao seu baixo custo e simplicidade, e comprovar, histologicamente, que a terapia celular melhora a qualidade do epitélio germinativo em modelo pré-clínico.

## ABSTRACT

Oliveira, J. R. **EVALUATION OF TRANSPLANTATION OF MESENQUIMIAL STEM CELLS IN EXPERIMENTAL MODEL OF INFERTILITY CAUSED BY CHEMOTHERAPY**. [Doctoral thesis]. Campo Grande: Federal University of Mato Grosso do Sul; 2019.

Cancer is a disease that affects a large number of people and these are usually undergoing chemotherapy. One of the adverse effects of this therapy is testicular lesions with reduced fertility and one of the alternatives for the treatment of these cases is cell therapy. Thus, the present study evaluated a protocol for explant of mesenchymal stem cells from adipose tissue as well as evaluated the effects of cell therapy with mesenchymal stem cells from adipose tissue under the germinal epithelium of *Swiss* mice treated with cyclophosphamide. The experimental groups were: (I) Negative Control (NC) - the animals were treated with injection water; Positive Control (PC) - animals were treated with cyclophosphamide at a dose of 150 mg / kg; and positive control + mesenchymal stem cells (PC + MSC) - the animals were treated with cyclophosphamide at the dose of 150 mg / kg and transplanted with  $1.0 \times 10^6$  mesenchymal stem cells. The results indicated that transplantation of MSC does not alter the frequency of micronuclei in the peripheral blood. However, it improves the quality of the germinal epithelium and the quality score of the PC + MSC group is equal to that of the NC group. In view of the above, it is considered that the greatest contribution of this article was to present a protocol of explant of mesenchymal stem cells of a viable adipose tissue fragment to be translated for clinical researches due to its low cost and simplicity, and to prove histologically that the therapy enhances the quality of the germinal epithelium in a preclinical model.

## SUMÁRIO

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                             | 9  |
| 2. OBJETIVOS .....                                              | 14 |
| 2.1. Objetivo Geral .....                                       | 14 |
| 2.2. Objetivos Específicos .....                                | 14 |
| 3. Material e Métodos .....                                     | 15 |
| 3.1. Animais.....                                               | 15 |
| 3.2. Delineamento Experimental .....                            | 15 |
| 3.3. Explante e cultivo das Células Tronco Mesenquimais .....   | 16 |
| 3.4. Diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica..... | 17 |
| 3.5. Preparação e transplante das CTM.....                      | 18 |
| 3.6. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico.....            | 18 |
| 3.7. Histologia.....                                            | 19 |
| 3.8. Análise Estatística .....                                  | 20 |
| 4. Resultados .....                                             | 20 |
| 4.1. Expansão das Células Tronco Mesenquimais.....              | 20 |
| 4.3. Parâmetros biométricos.....                                | 22 |
| 4.4. Avaliação da integridade do material genético .....        | 24 |
| 4.5. Avaliação histológica.....                                 | 25 |
| 5. Discussão.....                                               | 27 |

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2018) são esperados 600 mil novos casos de câncer para cada um dos anos de 2018 e 2019; e fazendo-se a correção do cálculo global do sub-registro (Mathers et al., 2003) a incidência pode chegar a 640 mil novos casos (INCA, 2018).

O aumento da incidência de câncer é acompanhando pelo aumento do número de pessoas que são submetidas à quimioterapia, à radioterapia e à cirurgia como formas de tratamento dessa doença (Carvalho, 2010; Oliveira; Oselame; Neves, 2014) aumentando a possibilidade de cura. Além disso, várias pesquisas visam o desenvolvimento de novos produtos para o tratamento e/ou a prevenção do câncer e dessa forma procura-se por produtos cada mais específicos e com menor número de efeitos colaterais (Vairoletti, 2010; Navarro et al., 2014; Oliveira; Oselame; Neves, 2014; Navarro et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Magosso et al., 2016; Martelo et al., 2016; Schneider et al., 2016; Araújo et al., 2017; Limeiras et al., 2017a; Limeiras et al., 2017b; Oliveira et al., 2017; Oliveira et al., 2018); e busca-se também maior longevidade após o tratamento e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (Costa et al., 2005).

As estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer envolvem um correto diagnóstico e o estadiamento tumoral (Pankau et al., 2015; Moura et al., 2016; INCA, 2016; INCA, 2017). Os tratamentos do câncer podem envolver um ou mais recursos terapêuticos (Rekhadevi et al., 2007; Connor et al., 2010) dentre os quais destacam-se: (I) a cirurgia, ou seja, a remoção cirúrgica do tumor (Maireles et al., 2006; Bernardo; Nunes, 2010; Connor et al., 2010; Alvarenga et al., 2012) e de uma margem de segurança (tecido não tumoral) (Tiezzi, 2007; Kurachi; Moriyama; Bagnato, 2010; Terzian et al., 2010); (II) a radioterapia que se utiliza de radiação ionizante focada em uma área específica do corpo (Woodruff; Snyder, 2007; Howell; Santos et al., 2010); e a quimioterapia que consiste de um tratamento sistêmico utilizando diferentes tipos de drogas orais ou intravenosas (Costa et al., 2015; Rajmohan, 2015; Moura et al., 2016).

A quimioterapia faz uso de um (monoquimioterapia) ou mais agentes quimioterápicos combinados (poliquimioterapia) (Del Gaudio; Mendonna-Quinn,

1998; Ohta et al., 2001; Sawada et al., 2009) administrados em intervalos regulares e que variam de acordo com protocolos que possuem uso internacional (Rajmoha, 2015). A quimioterapia pode ser neoadjuvante (precedente ou citorrredutora) que está indicada para tumores irresecáveis na tentativa de torná-los cirurgicamente removíveis e melhorar o prognóstico da doença. A quimioterapia adjuvante (profilática) é comum após o tratamento cirúrgico quando o paciente não apresenta tumores detectáveis em exame físico e complementares. Já a quimioterapia curativa tem a finalidade de curar o paciente e pode ou não estar associada à cirurgia e à radioterapia (Rakhadevi et al., 2007; Bernardo: Nunes, 2010). A quimioterapia ainda pode ser indicada para o controle da doença de tumores sólidos, avançados ou recidivados, e para neoplasias hematopoiéticas crônicas. Nesses casos não há possibilidade de cura e, por isso, são conhecidas como quimioterapias de controle e, portanto, podem aumentar a sobrevida dos pacientes. Destaca-se ainda a quimioterapia paliativa que é indicada para a paliação de sintomas e sinais que comprometem as funções do paciente e que tendem a evoluir a óbito independentemente do terapêutica aplicada (Moura et al., 2016). Ainda estão disponíveis como terapêuticas em quimioterapia o uso de hormonioterapia e anticorpos monoclonais (Moura et al., 2016; INCA, 2017). A hormonioterapia trata-se do uso de medicamentos semelhantes a hormônios (bioidênticos ou sintéticos) ou inibidores de hormônios. Já os anticorpos monoclonais tratam-se do uso de proteínas sintetizadas em laboratórios com antígenos específicos e que são usados em tratamentos, principalmente, de linfomas agressivos, isolados ou em associação com outros quimioterápicos (Hong et al., 2014; Moura et al., 2016; INCA, 2017).

Ainda sobre a quimioterapia salienta-se que é necessário compreender o ciclo celular para que se possa fazer a prescrição e o uso adequado de agentes anticânceres (Bruce et al., 2006). Muitos quimioterápicos são agentes citotóxicos (Bruce et al., 2006) e atuam causando lesões genômicas ou genéticas (Bruce et al., 2006; Oliveira et al., 2013; Navarro et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Carvalho et al., 2015; Navarro et al., 2015; Oliveira et al., 2015; Rocha et al., 2015; Magosso et al., 2016; Martelo et al., 2016; Schneider et al., 2016; Araújo et al., 2017; Limeiras et al., 2017a; Limeiras et al., 2017b; Oliveira et al., 2017; Oliveira et al., 2018). Logo, a maioria dos quimioterápicos agem

causando lesões na molécula do DNA, lesões nos cromossomos ou ainda alterando a formação do fuso mitótico. Por meio desses mecanismos de ação, os quimioterápicos agem, principalmente, sobre as células tumorais que exibem uma elevada taxa de divisão celular. No entanto, de forma semelhante, também as células dos tecidos normais, que estão em divisão, em especial dos tecidos de rápida proliferação celular (medula óssea, folículos pilosos, epitélio intestinal, por exemplo), sofrem danos no material genético e pode ocorrer morte celular caso não haja parada do ciclo celular e correção dos danos genômicos e/ou genéticos (Littley, 1991; Morita, 2000; Laser, 2004; Bruce et al., 2006; Maltaris, 2009). Esse fato, em especial, limita a utilização de agentes quimioterápicos (Bruce et al., 2006). Destaca-se ainda que a utilização desses quimioterápicos podem causar infertilidade (ECR, 2005; Castellotti; Cambiaghi; 2008; Ferreira; Soares-Junior; Motta, 2011; Alvarenga et al., 2012; Oliveira; Oselame; Neves, 2014) e, portanto, afetam diretamente as funções gonadais, causando danos irreversíveis aos ovários e testículos, e ao eixo hipotálamo-hipófise (Sklar, 1999; Zivanovic, 2009; Maltaris, 2009).

A infertilidade é definida como a incapacidade de conceber um filho após um ano de tentativas com relações sexuais sem a utilização de proteção (Lee et al., 2006; Oliveira; Oselame; Neves, 2014) e atinge cerca de 1 em cada 10 casais (Tsuji et al., 2009; Perreira et al., 2010), normalmente.

O teste de espermograma é um exame complementar e que pode avaliar a qualidade do sêmen antes e após um intervenção quimioterápica. Esse exame avalia características micro e macroscópicas do sêmen e é utilizado como um biomarcador do potencial de fertilidade masculino (Galamera, 1992; Santos et al., 2013). O sêmen é constituído de espermatozóides e secreções da próstata, vesículas seminal e da glândula bulbouretral (WHO, 2010). Em geral, esse exame deve ser repetido pelo menos duas a três vezes já que existe uma variabilidade intra-individual (Castilla et al., 2016). Durante o exame avalia-se o volume, a viscosidade, o tempo de liquefação e o pH do sêmen por meio de avaliação direta (observação). Já os parâmetros microscópicos envolvem a contagem da concentração total e por mililitros de espermatozóides além da avaliação da vitalidade, motilidade e morfologia espermática. Podem ainda ser avaliados a presença de anticorpos

anti-espermatozóides e a quantidade de leucócitos na amostra seminal (WHO, 1999; WHO, 2010).

Reunindo a díade, quimioterapia x infertilidade, é sabido que quimioterápicos possuem efeitos variáveis na função testicular (Woodruff; Snyder, 2007), e ainda associado ao tipo do agente anticâncer, à dose administrada e à idade do paciente, causam riscos à fertilidade (Waxman, 1983; Rossoni et al., 2010; Avarenga et al., 2012; Oliveira; Oselame; Neves, 2014). Por isso, a literatura documenta uma má qualidade do sêmen e elevado índice de azoospermia transitória ou irreversível após o tratamento oncológico (Petersen et al., 2002; Gandini et al., 2003; Schmidt et al., 2004).

Em geral, a quimioterapia causa disfunções endócrinas como redução dos níveis de testosterona que refletem, mais tardiamente, na redução da produção de espermatozóides e até mesmo azoospermia. As alterações no epitélio germinativo ocorrem de acordo com o tipo de agente anticâncer usado que levam a dano direto no DNA e RNA e, por consequência à apoptose. Os agentes alquilantes (ciclofosfamida, por exemplo) são relatadas como os principais quimioterápicos que depletam a produção de espermatozoides e, portanto, causam infertilidade (Waxman et al., 1983; Alvarenga et al., 2012).

A ciclofosfamida é usada no tratamento de diversos tumores, de doenças auto-imunes (lúpus eritomatose sistêmico e artrite reumatóide) e para imunossupressão no caso de transplantes de órgãos e assim evitar rejeição (Perin et al., 2007; Tripathi; Jena, 2009).

Esse medicamento é um pró-fármaco que necessita de ativação no fígado por meio do citocromo P450 (Sladek, 1971; Ludeman, 1999; Wang; Wang, 2012). Os metabólitos gerados são a mostarda fosforamida e a acroleína que são responsáveis pelo efeito antineoplásico, por meio do efeito citotóxico sobre as células tumorais através da alquilação do DNA, e efeitos adversos gerados em especial pelas espécies reativas e estresse oxidativo, respectivamente (Kern; Kehrer, 2002; Kumar et al., 2006; Korkmaz; Topal; Obter, 2007).

A quimioterapia com ciclofosfamida causa lesões nos tecidos normais levando à toxicidade orgânica múltipla (Fraiser et al., 1991; Bukowski, 1999) afetando o coração, o fígado, os rins e os testículos (Mythili et al., 2004; Selvakumar et al., 2004; Selvakumar et al., 2005a; Selvakumar et al., 2005b;

Mythili et al., 2006; Selvakumar et al., 2006; Senthilkumar et al., 2006a; Senthilkumar et al., 2006b; Mythili et al., 2007; Sugumar; Abraham, 2007), por exemplo.

A toxicidade urológica, evidenciada pela cistite hemorrágica, é um importante fator limitante para o uso da ciclofosfamida (Levine; Riche, 1989). No entanto, outra preocupação é toxicidade reprodutiva que pode levar à infertilidade. Em homens registra-se oligo e azoospermia e distúrbios na produção de gonadotrofinas associado com redução de testosterona sérica (Kenney et al., 2001; Hoorweg-Nijman et al., 1992). Já em mulheres cita-se a falência ovariana prematura associada à destruição dos folículos ovarianos devido à redução dos níveis de glutathione (Dirven; van Ommen; van Bladeren, 1994; Howell; Shalet, 1998)

Devido a esses danos reprodutivos, é de grande importância, em função da quimioterapia, que pacientes oncológicos sejam orientados quanto à preservação da fertilidade (Castellotti; Cambiaghi, 2008; Forman; Anders; Behera, 2010; Ferreira; Soares-Junior; Motta, 2011; Alvarenga et al., 2012; Leena; Laurie; Richard, 2012; Bhartiya; Anand; Parte, 2015). Com alternativas para a preservação da fertilidade masculina citam-se, em especial, a criopreservação do sêmen e/ou do tecido testicular (Chapman; Sutcliffe; Malpas; 1981; Vigersky et al., 1982; Castellotti; Cambiaghi, 2008; Alvarenga et al., 2012; Oliveira; Oselame; Neves, 2014).

Outra estratégia que tem ganhado forças nos últimos anos é a utilização de células tronco mesenquimais (CTM) para a recuperação da fertilidade masculina em pacientes oncológicos expostos à quimioterapia e em modelos experimentais que simulam essa realidade (Schatt; Neischlaq; 2001; Zhang et al., 2014; Yang et al., 2014; Ghasemzadeh-Hasankolaei et al., 2016).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos da terapia celular com células tronco mesenquimais em modelo de infertilidade causada por medicamentos quimioterápicos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

Padronizar o modelo de infertilidade induzida por ciclofosfamida.

Padronizar a obtenção, o cultivo e a diferenciação de células tronco mesenquimais do tecido adiposo mesentérico e inguinal de camundongos *Swiss*.

Avaliar os efeitos das células tronco mesenquimais na infertilidade induzida por ciclofosfamida em modelos experimentais por meio de estudos bioquímicos e histológicos.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Animais

Utilizou-se 40 camundongos *Mus musculus* da variedade Swiss, com peso médio de 30 g, em idade reprodutiva cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais passaram por um de adaptação de 7 dias antes de iniciar os experimentos.

Os animais foram mantidos isolados em caixas de polipropileno forradas com cepilho sob condições padronizadas de climatização (com temperatura mantendo-se em torno de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $55 \pm 10\%$ ) em rack ventilada Alesco®. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*.

O estudo foi realizado de acordo com as Diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Cômite de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o protocolo #920/2017.

#### 3.2. Delineamento Experimental

Os animais foram distribuídos em dois lotes: (I) composto por 10 fêmeas doadoras do tecido adiposo para a obtenção das CTM e, (II) composto por 30 machos distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10): Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção, na proporção de 0,1mL/10g de peso corporal (p.c.) por via intraperitoneal (i.p.), durante 30 dias, com intervalos de cinco dias entre as administrações; e, duas administrações de solução tampão fosfato (PBS), livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  com pH 7,4, por via intravenosa (i.v.), com intervalo de 10 dias entre elas, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida (Genuxal - Baxter®, CAS 2638B5063, Lote 6/138) na dose de 150 mg/kg (p.c.;i.p) durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as administrações (Drumond et al., 2011) e, duas administrações de PBS (i.v.), com intervalo de 10 dias, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico; e Controle Positivo + Células-Tronco Mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg (p.c.;i.p) durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as

administrações e, realizou-se dois transplantes de  $1 \times 10^6$  CTM (i.v.), de acordo com Cakici et al. (2013), com modificações, com intervalo de 10 dias e, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico.

Após 60 dias de experimentação, submeteu-se os machos à pesagem, eutanásia por deslocamento cervical e retirada dos órgãos (coração, pulmões, fígado, baço, rins e testículos).

### 3.3. Explante e cultivo das Células Tronco Mesenquimais

As CTM foram explantadas segundo o protocolo de Hermeto et al. (2016), com modificações. As amostras de tecido adiposo foram obtidas da região abdominal/inguinal de camundongos fêmeas adultas após eutanásia por deslocamento cervical. Sucintamente, acrescentou-se meio DMEM *Low Glucose* (DMEMLG) (Sigma-Aldrich®, lote SLBS0097V, número de catálogo D5523), na proporção de 2 mL de meio para cada grama de tecido adiposo. Suplementou-se o meio com Colagenase tipo A1 (Gibco®, lote 1879368, número de catálogo 17100017) na proporção de 2 mg de colagenase para cada mL do meio DMEMLG. Manteve-se o material biológico em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> *overnight*. A inativação da atividade enzimática, na manhã seguinte, deu-se pela adição de meio de cultivo DMEMLG suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich®, lote SPBB2353V, número de catálogo F2561), na mesma quantidade de meio utilizado com colagenase anteriormente citado. Em seguida, centrifugou-se o material a 300 g durante 10 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* de células e, prontamente plaqueou-se o material em garrafas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> com meio DMEMLG suplementado com 10% de SFB. Manteve-se as CTM em cultivo em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> até que essas atingissem cerca de 80% de confluência, quando realizou-se a tripsinização com solução a 0,025% de tripsina (Tripsina-EDTA, 0,025%; LCG Biotecnologia, lote 11014AB, número de catálogo BR30042-01). Posteriormente, fez-se a contagem do número de células em câmara de Neubauer e o replaqueamento em frascos de 75 cm<sup>2</sup> de área de cultura. Esse procedimento de cultivo repetiu-se até a 4ª passagem celular, quando realizou-se o transplante das CTM na proporção de  $1,0 \times 10^6$  células/animal (Cakici et al., 2013).

### 3.4. Diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica

Os frascos destinados aos experimentos de diferenciação, quando atingiram a confluência de 80%, foram novamente tripsinizados e as CTM foram semeadas em 6 frascos de 25 cm<sup>2</sup>, na concentração de  $2 \times 10^5$  células/frasco (Urt-Filho et al., 2016). Três frascos de 25cm<sup>2</sup>, utilizados como controles, foram mantidos em meio DMEMLG suplementado com 10% SBF. Para a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, as células foram mantidas por 24 horas em meio com 10% SBF suplementado. Em seguida, esse foi substituído por meio de cultura *STEMPRO Adipogenic, Osteogenesis e Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen®) e mantidas em cultura por 14 dias para a diferenciação adipogênica e por 21 dias para a culturas osteogênicas e condrogênicas, com trocas duas vezes por semana (Urt-Filho et al., 2016).

Para a confirmação da diferenciação adipogênica, após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 60 minutos, em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e, posteriormente, incubadas com *Oil Red O* (Sigma®) por 20 minutos em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação foi confirmada pelo acúmulo de lipídeos intracelulares no 14º dia (Pesarini et al., 2017; Schweich et al., 2017; Pesarini et al., 2018).

Para a diferenciação osteogênica, após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 10 min., em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Alizarin Red* (Sigma®) por 5 min. em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação osteogênica foi comprovada pela visualização de depósitos de cálcio no 21º dia (Pesarini et al., 2017; Schweich et al., 2017; Pesarini et al., 2018).

Durante o processo de cultivo celular da diferenciação condrogênica as células se agruparam formando um esferoide. Ao final do processo esse foi coletado por aspiração com uma pipeta Pasteur. O esferoide foi fixado em formalina tamponada 10% à temperatura ambiente e, posteriormente,

submetido à rotina histológica no processador de tecidos automatizado TP09 TS Lupetec® conforme instruções do fabricante. Posteriormente, o esferoide foi cortado em micrótomo Leica® RM2235 em cortes com espessura 3 µm. As lâminas foram coradas com *Azul de Alcian* usando o kit EasyPath conforme as especificações do fabricante. A diferenciação foi confirmada pela presença de matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos no 21º dia (Pesarini et al., 2017; Schweich et al., 2017; Pesarini et al., 2018).

### 3.5. Preparação e transplante das CTM

Na 4ª passagem as CTM foram tripsinizadas, em seguida, lavou-se as CTM com PBS a exaustão (homogeneização em 5 mL de PBS seguido de centrifugação a 300 g por 10 min, até que o *pellet* ficasse completamente limpo e o sobrenadante transparente) para o transplante.

Os animais do grupo CTM foram submetidos à anestesia inalatória (Isoflurano - BioChimico®, Brasil, CAS/401. 4238-3, Lote/007070). Em seguida, transplantou-se  $1 \times 10^6$  CTM preparadas em solução de PBS (pH 7,4) por i.v., num volume máximo 100 µL, com auxílio de cateter intravenoso 24 G (Solidor®, Brasil, Lote/011606G). Repetiu-se esse procedimento por mais uma vez, com intervalo de 10 dias entre as duas aplicações (Cakici et al., 2013).

### 3.6. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

Coletou-se 20µL de sangue periférico por meio da punção da veia caudal e depositou-se a amostra em uma lâmina previamente corada com 20 µL Alaranjado de Acridina (1 mg/mL). Em seguida a amostra foi coberta por uma lamínula. As coletas de sangue ocorreram 24 horas após a aplicação de Célula Tronco Mesenquimais. Armazenou-se o material em freezer (-20°C) por um período mínimo de quinze dias. Avaliou-se a presença de micronúcleos no interior de eritrócitos por meio de microscópio de fluorescência no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Analisou-se 2000 células/animal (Hayashi et al., 1990; Oliveira et al., 2009).

### 3.7. Histologia

Os testículos foram fixados em solução de Bouin (75,0 mL de Ácido Pícrico, 25,0 mL de formaldeído 40% e 5,0 mL de ácido acético) por 24h e posteriormente preservados em álcool etílico 70%. Os órgãos foram seccionados e incluídos em parafina e cortados em micrótomo com 5 µm de espessura e corados em hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada segundo Johnsen (1970) bem como o cálculo dos scores totais (pode chegar a 1.000 pontos). Assim, todos os túbulos seminíferos das lâminas histológicas foram avaliados sistematicamente e cada um deles recebeu uma pontuação de 1 a 10 de acordo com os seguintes critérios: (I) Score 1 - sem células em seção tubular; (II) Score 2 - sem células germinativas, mas as células de Sertoli estão presentes; (III) Score 3 - as espermatogônias são as únicas células germinativas presentes; (IV) Score 4 - apenas poucos espermatócitos (<5) e sem espermatídes ou espermatozóides presentes; (V) Score 5 - sem espermatozóides, sem espermatídes, mas com vários ou muitos espermatócitos presentes; (VI) Score 6 - sem espermatozóides e apenas poucas espermatídes (<5-10) presentes; (VII) Score 7 - sem espermatozóides, mas muitas espermatídes presentes; (VIII) Score 8 - apenas alguns espermatozóides (<5-10) presentes na seção; (IX) Score 9 - muitos espermatozóides presentes, mas epitélio germinativo desorganizado com descamação marmoreada ou obliteração do lúmen; (X) Score 10 - espermatogênese completa com muitos espermatozóides (os espermatozóides são aqui definidos como células que atingiram a forma da cabeça pequena do espermatozóide) e o epitélio germinativo organizado em uma espessura regular, deixando um lúmen aberto). Para calcular uma pontuação média, o número de tubulus registrados em cada pontuação é multiplicado pela pontuação e a soma de todas as 10 multiplicações é dividida pelo número total de tubulus registrados. Por uma questão de clareza, os números de tubulus encontrados em cada etapa são mostrados neste artigo em percentagem do número de tubulis. Isso não é feito no trabalho de rotina. Para algum propósito, as percentagens cumulativas (10 + 9, 10 + 9 + 8 etc.) são formadas e estas podem ser multiplicadas pelo volume total dos testículos para produzir números para espermatogênese em termos absolutos (Figura 6).

Para calcular a pontuação média (PM), o número de tubulus registrados em cada pontuação foi multiplicado de 1 a 10 e a soma de todas as 10 multiplicações foi dividida pelo número total de tubulus registrados. Por uma questão de clareza, os números de tubulus encontrados em cada etapa são mostrados neste artigo em percentagem do número de tubulis. Isso não é feito no trabalho de rotina. Para algum propósito, as percentagens cumulativas (10 + 9, 10 + 9 + 8 etc.) são formadas e estas podem ser multiplicadas pelo volume total dos testículos para produzir números para espermatogênese em termos absolutos (Johnsen, 1970).

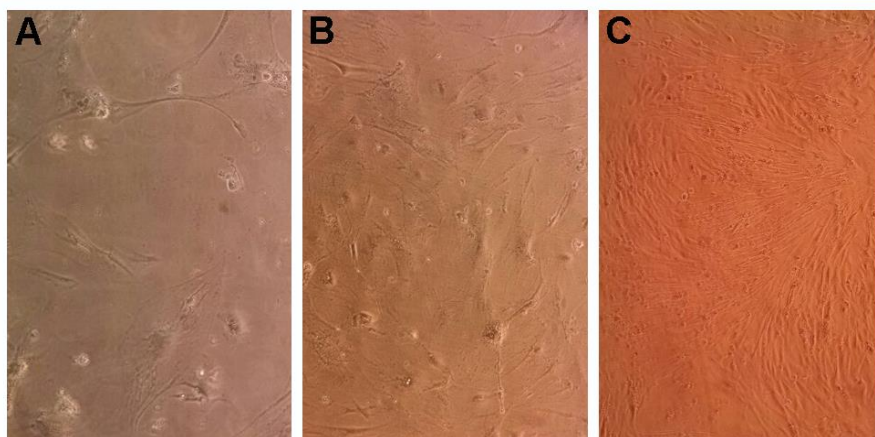
### **3.8. Análise Estatística**

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média. A análise estatística foi realizada de acordo a distribuição dos dados. Para dados com distribuição paramétrica utilizou-se o teste ANOVA/Tukey e para dados de distribuição não paramétrica utilizou-se o teste Kruskal-Wallis/Dunn. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## **4. Resultados**

### **4.1. Expansão das Células Tronco Mesenquimais**

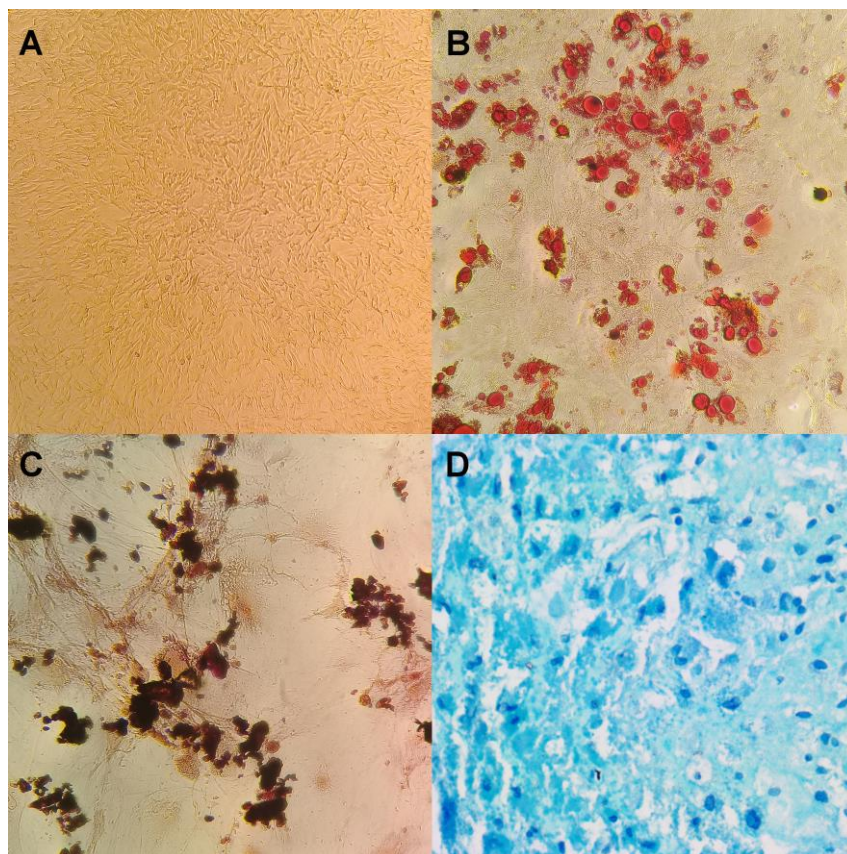
Após a extração e o isolamento das CTM essas foram expandidas em frascos de cultura com sucessivos repiques. Em todas as passagens a viabilidade foi superior a 95%. Na figura 1 podem ser observados os aspectos das culturas de CTM (Figura 1).



**Figura 1.** Aspectos das culturas em expansão: A – Cultivo em fase inicial (20 dias), aumento 400x; B – Cultura com confluência próximo a 60% (7 dias após a primeira passagem – 1 repique), aumento de 400x; C – Cultura em confluência superior a 90%, aumento de 100x.

#### **4.2. As Células Tronco Mesenquimais Diferenciam-se em Células Osteogênicas, Adipogênicas e Condrogênicas *in vitro***

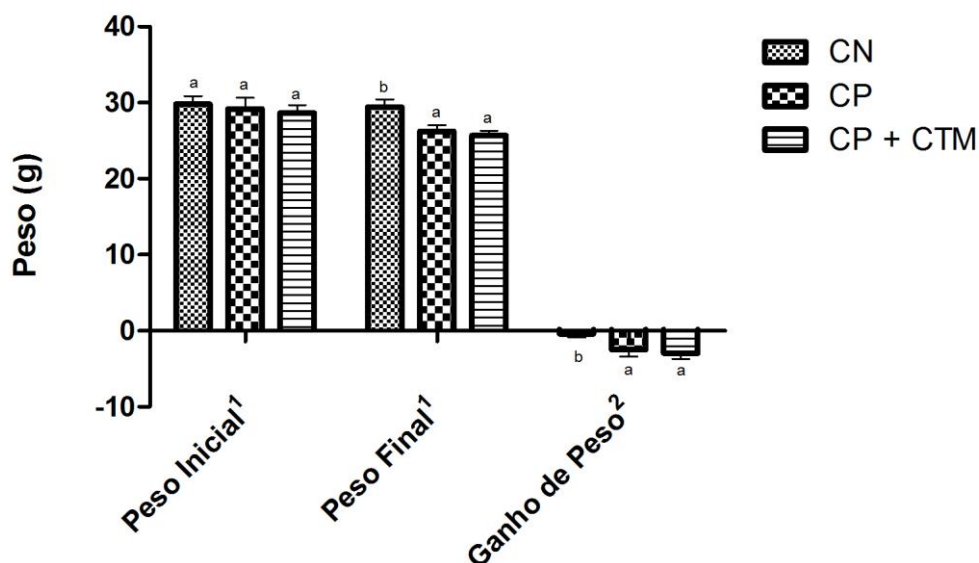
A confirmação que as células em cultivo realmente se tratavam de CTM se deu por meio das diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica onde foi possível identificar o acúmulo de lipídeos corados com *Oil red O*, os depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red* e a matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos corados com Azul de Alcian, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Fotomicrografia das células tronco mesenquimais e das células tronco mesenquimais em diferenciação: (A) cultura indiferenciada, (B) cultura em diferenciação adipogênica com vacúolos lipídicos corados por *Oil red O*, (C) cultura em diferenciação osteogênica com depósitos de cálcio corados por *Alizarin Red*, (D) Cultura em diferenciação condrogênica com matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos corada por Azul de Alcian. Aumento de 400x.

#### 4.3. Parâmetros biométricos

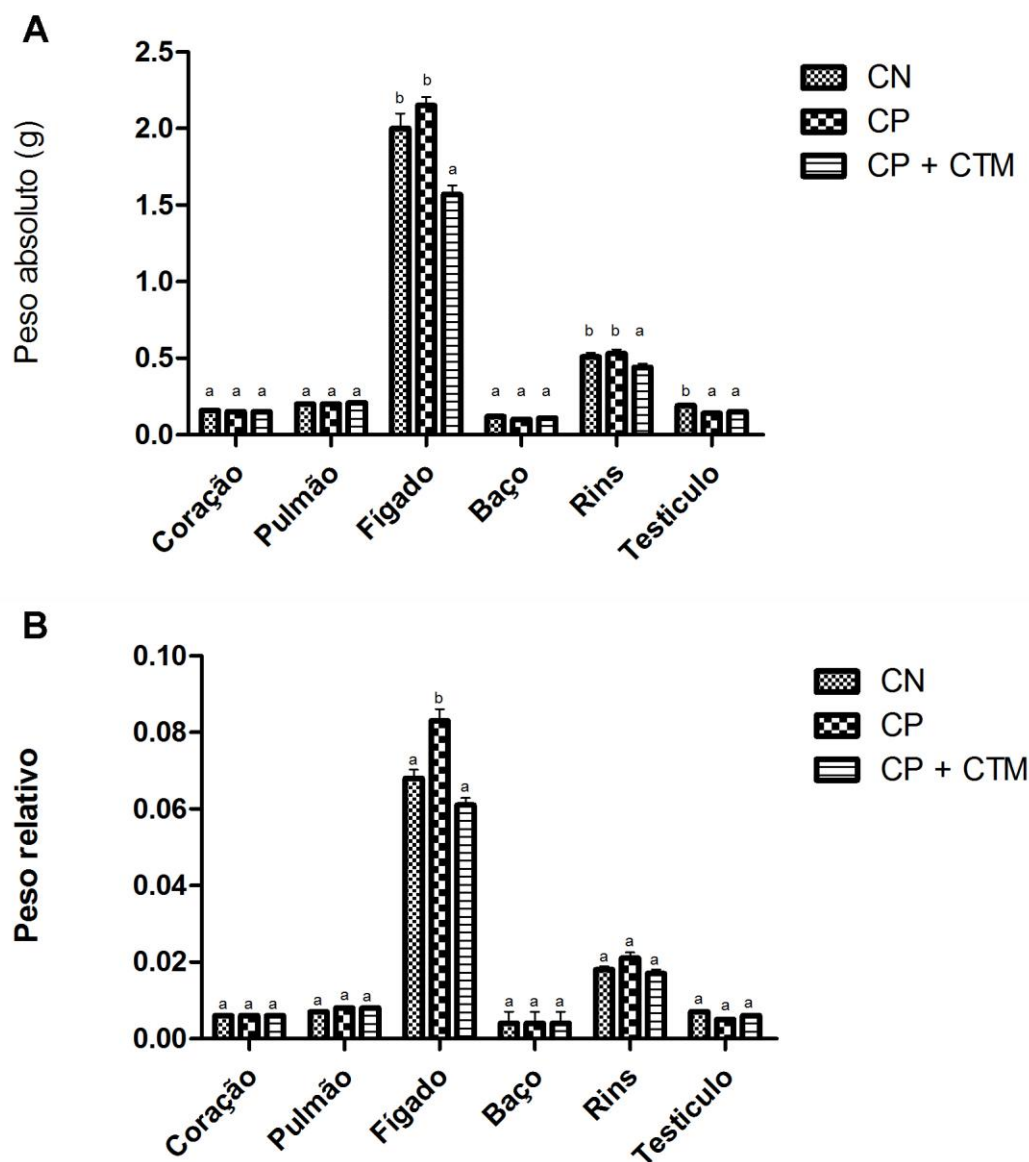
O peso inicial dos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Entretanto, os animais do grupo CN apresentaram maior peso final e menor perda de peso quando comparado aos animais dos grupos CP e CP + CTM ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Parâmetros biométricos de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais. Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: <sup>1</sup>ANOVA/Tukey; <sup>2</sup>Kruskal-Wallis/Dunn,  $p < 0,05$ ).

Os pesos absolutos do coração, pulmão e baço não demonstraram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Já os pesos do fígado e rins dos animais do grupo CP + CTM foram inferiores ( $p < 0,05$ ) aos dos grupos CN e CP. O peso absoluto dos testículos dos camundongos do grupo CN foi superior ( $p < 0,05$ ) aos dos demais grupos experimentais (CP e CP + CTM) (Figura 4 A).

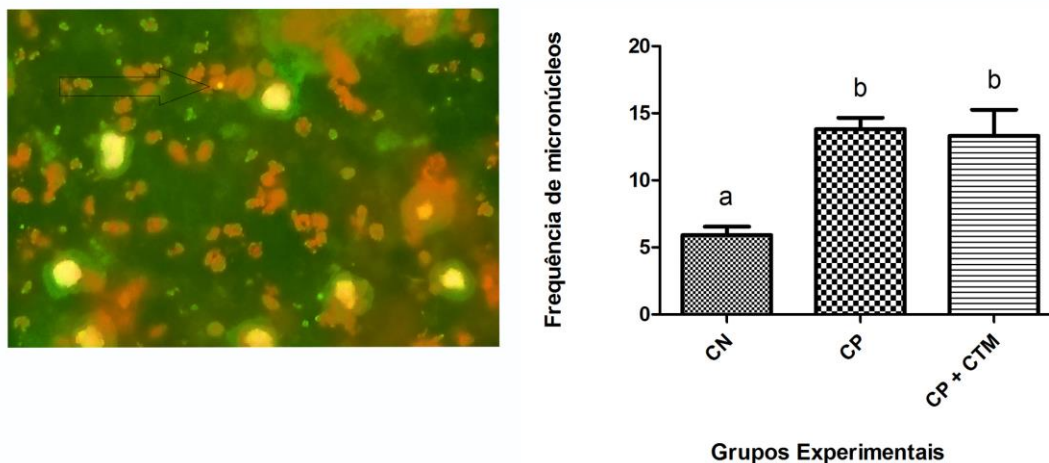
Os pesos relativos dos órgãos coração, pulmão, rins, baço e testículos não apresentaram diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Já o peso do fígado aumentou ( $p < 0,05$ ) no grupo CP em relação aos demais (Figura 4B).



**Figura 4.** Parâmetros biométricos de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais. Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Avaliação da integridade do material genético

A frequência de micronúcleos do sangue periférico foi maior ( $p>0,05$ ) nos grupos CP e CP + CTM, ambos tratados com ciclofosfamida, em relação ao grupo CN (Figura 5).



**Figura 5.** Frequência de micronúcleo de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais. Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ANOVA/Tukey;  $p<0,05$ ).

#### 4.5. Avaliação histológica

A análise histopatológica demonstrou que a administração da ciclofosfamida reduziu ( $p<0,05$ ) o escore de qualidade dos túbulos seminíferos de  $981,73 \pm 3,84$  no CN para  $831,90 \pm 50,22$  no CP. Isso demonstra uma perda 15,26 pontos percentuais na qualidade do epitélio germinativo. Quando junto à ciclofosfamida foi transplantadas as CTM o escore subiu de  $831,90 \pm 50,22$  no CP para  $953,33 \pm 11,34$  no grupo CP + CTM. Isso demonstra uma melhora de 14,60 pontos percentuais e assim CN e CP + CTM são estatisticamente semelhantes.

**Tabela 1.** Escore de qualidade testicular de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais.

| Grupos Experimentais | Escore de lesão testicular |
|----------------------|----------------------------|
| CN                   | 981,73±3,84 <sup>a</sup>   |
| CP                   | 831,90±50,22 <sup>b</sup>  |
| CP + CTM             | 953,33±11,34 <sup>a</sup>  |

Legenda: Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ).

Na figura 6 é possível observar túbulos seminíferos dos animais dos grupos experimentais. Nos grupos CN e CP + CTM observa-se túbulos seminíferos normais e a presença de espermatídes secundárias (Figuras A, D e C, F). Já no grupo tratado apenas com ciclofosfamida os túbulos seminíferos estão alterados e não observa-se espermatozóides (Figura B). Na figura E nota-se presença de espermatócitos primário e secundários, porém não observa-se espermatozóides (Figura E).

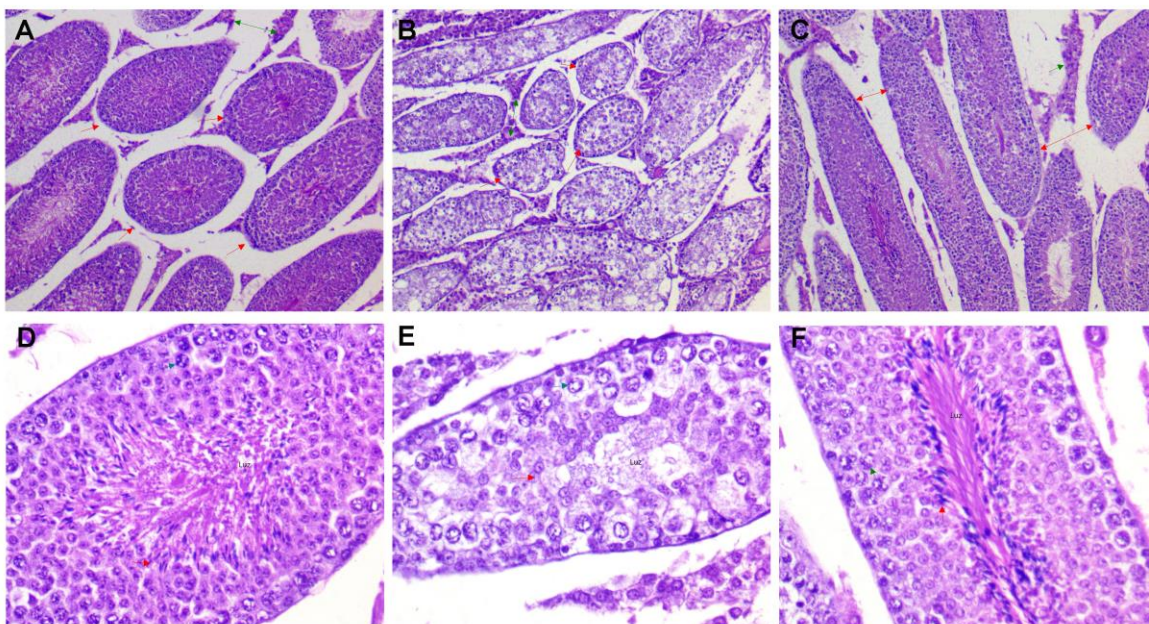


Figura 6. Cortes histológicos de túbulos seminíferos dos animais dos grupos experimentais CN (A e D), CP (B e E) e CP + CTM (C e F). Na figura A as setas vermelhas indicam túbulos seminíferos normais com celularidade normal e com a presença de espermátides secundárias. Na figura B as setas vermelhas apresentam túbulos seminíferos alterados com uma menor celularidade, sem a visualização de espermátides secundárias. Na figura C as setas vermelhas apontam para túbulos seminíferos normais com espermátides secundárias. Nas figuras A, B e C - as setas verdes indicam células de Leydig intersticiais. Nas figuras D, E e F as setas vermelhas indicam espermátides secundárias/espermatozóides e as setas verdes indicam espermatócito primário. Na Figura E é possível notar a ausência de espermatozóide. A coloração usada foi Hematoxilina/Eosina. As figuras A, B e C estão em um aumento de 100x e as figuras D, E e F estão em um aumento de 400X.

## 5. Discussão

A medicina tradicional sofre importantes transformações e uma das promessas da medicina do futuro é a medicina regenerativa. Essa constitui-se da possibilidade de prover a regeneração do organismo em nível celular e/ou tecidual (Mason; Dunnill, 2008; Acero, 2015). Esse novo paradigma da medicina provocará transformações na ciência, nas terapêuticas e na saúde pública (Morrison, 2012; Acero, 2015) e revoluções serão criadas na busca da homeostasia. Para que isso se concretize há a necessidade de acelerar a transferência de conhecimentos das bancadas dos laboratórios (da pesquisa básica) para a aplicação clínica; aprofundar as observações clínicas em busca de melhor entendimento dos processos de doença (fisiopatológico), terapêutica

e cura; além de aplicar as inovações biotecnológicas à população com responsabilidade. São esses os preceitos que definem a medicina translacional, segundo Luz (2018), com modificações.

Baseado nesses conceitos o presente trabalho se propôs a testar um protocolo de explante e cultivo de células tronco do tecido adiposo em modelo pré-clínico com o intuito de translada-lo, posteriormente, para estudos clínicos. O protocolo descrito nesse estudo foi adaptado da literatura se mostrou eficiente em isolar as CTM de pequenos fragmentos de tecido adiposo, a um baixo custo, em um curto espaço de tempo, sem muitos passos (protocolo simplificado), sem a necessidade de equipamentos de grande porte e, portanto, possui potencial para aplicação clínica. Outro fato importante a ser informado é que as células utilizadas no presente estudo, realmente, se tratavam de CTM visto que as mesmas se diferenciaram em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Segundo a literatura especializada essas três diferenciações indicam que as células são CTM (Nargesi et al., 2017; Patschan et al., 2018).

Em relação ao transplante das CTM foi escolhida a via endovenosa. Essa é de fácil acesso tanto em modelo pré-clínico como clínico e, portanto, seria de fácil adesão pela classe médica. Existe uma extensa discussão na literatura sobre as diferentes vias de transplante das CTM e alguns autores citam e fazem a opção pela colocação das células *in situ* (na lesão a ser reparada). Isso se concretiza em lesões renais (Monteiro et al., 2018), cardíacas (Woudstra et al., 2016; Yamamoto et al., 2018) hepáticas (Eom et al., 2015), dentre outras. No entanto, outros autores para tratar esses mesmos tipos de lesões, fazem uso da via endovenosa (Nargesi et al., 2017; Sun et al., 2018; Zheng et al., 2019). Em relação ao testículo, em especial, há relatos tanto do uso da via endovenosa (Yang et al., 2014) quanto da via intratesticular (Kadam et al., 2018; Meligy et al., 2019) tanto para modelo pré-clínico (Yang et al., 2014; Kadam et al., 2018; Meligy et al., 2019) quanto clínico (Smith et al., 2014). Mas, a nossa preferência pela via endovenosa se deve à facilidade de proceder o transplante e, possível, menor resistência pelo paciente em se submeter ao procedimento.

Nosso estudo avaliou a frequência de danos no DNA induzidos pela ciclofosfamida em sangue periférico. Essa é uma medida indireta dos danos no DNA que podem ocorrer também nas células germinativas visto que a

ciclofosfamida é um quimioterápico de ação indireta e que após metabolização no fígado, por meio da hidroxilação pela enzima CYP2B, libera a 4-hidroxíciclofosfamida e o seu tautômero, a aldofosfamida (Colvin et al., 1976; Fenselau et al., 1977; Sladek, 1988; Zhang; Tian; Zhou, 2006; Veal et al., 2016). Uma vez em contato com as células, a aldofosfamida sofre clivagem e libera a mostarda de fosforamida e da acroleína sendo a primeira responsável pela ação antineoplásica e, portanto, causadora de danos no DNA (Colvin et al., 1976; Fenselau et al., 1977; Sladek, 1988; Zhang; Tian; Zhou, 2006; Veal et al., 2016). Os nossos resultados indicaram que o transplante das CTM não modifica o padrão de danos no DNA (danos cromossômicos) contabilizados por meio do ensaio do micronúcleo. O aumento da frequência de micronúcleos, em geral, está associado a pior prognóstico e desenvolvimento de doenças crônicas (Roth et al., 2008) danos teciduais (Wultsch et al., 2014) e acometimento por câncer (Ravegnini et al., 2015).

Como a maior contribuição desse estudo, os nossos resultados demonstraram que a terapia celular com CTM foi capaz de melhorar a qualidade do epitélio germinativo. A ciclofosfamida como era esperado reduziu a qualidade do epitélio germinativo o que é condizente com redução da fertilidade e isso se deve às alterações histopatológicas com a formação de vacúolos (Vaisheva et al., 2007; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Abiodun et al., 2016), estreitamento dos túbulos seminíferos, perda de células germinativas (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Abiodun et al., 2016; Onaolopo; Oladipo; Onaolapo, 2017), edema (Rezvanfar et al., 2008) e aumento do espaço intersticial (Rezvanfar et al., 2008; Onaolopo; Oladipo; Onaolapo, 2017). Além disso a literatura cita diminuição na contagem espermática (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Abiodun et al., 2016; Onaolopo; Oladipo; Onaolapo, 2017), alterações morfológicas dos espermatozoides (Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010) e a diminuição do peso dos testículos e dos epidídimos (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010). No nosso estudos destacamos redução do escore de qualidade do epitélio germinativo segundo Johnsen (1970) com destaque para

a redução depleção celular dos túbulos seminíferos e ausência de espermatozoides.

Por outro lado, camundongos tratados que ciclofosfamida mas que receberam a terapia celular com CTM teve o epitélio germinativo e os túbulos seminíferos reestabelecidos a padrões muito próximos aqueles observados no grupo controle negativo. Essa assertiva é confirmada pela ausência de diferenças significativas entre os grupos CN e CP + CTM. Assim, pode-se inferir que as CTM foram capazes de reestabelecer a qualidade do epitélio germinativo e isso pode corresponder ao reestabelecimento da fertilidade. Nossos resultados corroboram os estudos de Lue et al. (2007), Monfesi et al. (2013), Zhang et al. (2014), Yang et al. (2014), Chen et al. (2015), Cakici et al. (2013) e Mehrabani et al. (2015) que relataram recuperação do tecido testicular.

Acredita-se que essas melhorias no epitélio germinativo podem ocorrer por dois mecanismos: (I) a regeneração e (II) a imunomodulação por efeito parácrino). No primeiro caso acredita-se que as CTM administradas, diretamente na lesão ou por via endovenosa, tem a capacidade reconhecer a lesão e aderir no local a ser regeneração. Nesse caso as CTM sofrem transdiferenciação e passam a compor o tecido do órgão auxiliando na recuperação tecidual (Little et al, (2018)) e fisiológica para se atingir a homeostasia. No segundo caso acredita-se que as CTM migram até o local da lesão e produzem fatores reparadores endógenos, fatores anti-inflamatórios e antiapoptóticos que auxiliam na recuperação do órgão/tecido lesionado. Mas, sem acontecer a integração da CTM à matriz tecidual (Souza et al., 2010).

Em relação aos parâmetros biométricos observou-se que a ciclofosfamida, independentemente do transplante das CTM causou redução do peso final e, portanto, foi responsável por maior perda de peso. Esse fato já era esperado devido à toxicidade desse quimioterápico e esse fato foi relatado também por Michael et al. (2007). Já em relação às variações dos pesos absoluto dos órgãos que pode indicar toxicidade (Michael et al., 2007) observou-se alterações em fígado, rins e testículos. Porém, na avaliação do peso relativo (onde se faz a correção do peso do órgão pelo peso do animal) só foram observadas diferenças entre o grupo CP e os grupos CN e CP + CTM (sendo esses dois últimos estatisticamente semelhantes). O aumento do fígado

observado no grupo CP pode ter ocorrido pela necessidade de metabolização da ciclofosfamida que é ativada nesse órgão (Colvin et al., 1976; Michael et al., 2007; Veal et al., 2016). Essa metabolização pode requerer hipertrofia e hiperplasia do órgão (Michael et al., 2007;). Além disso, o órgão pode apresentar processo inflamatório característico da grande atividade e da hepatomegalia induzida pela ciclofosfamida (Faro et al., 2009).

Frente ao exposto considera-se que a maior contribuição desse artigo para a área é apresentar um protocolo de explante de células tronco mesenquimais de fragmento de tecido adiposo viável para ser transladado para pesquisas clínicas devido ao seu baixo custo e simplicidade, e comprovar, histologicamente, que a terapia celular melhora a qualidade do epitélio germinativo em modelo pré-clínico.

## 6. Referências

- Abioduna AO, Esthera OO, Christiana IE, Aderonkea AK, Ayowole OA (2016). Neuro-endocrine effects of aqueous extract of *Amaranthus viridis* (Linn.) leaf in male Wistar rat model of cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Toxicology Reports*. 3:608-619.
- Acero L (2015). Internationalization, science and health: global regenerative medicine and the parallel markets. *Ciencia & saude coletiva*. 20:433-440.
- Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B (2002). Chronic Cyclophosphamide Treatment Alters the Expression of Stress Response Genes in Rat Male Germ Cells. *Biology of Reproduction*. 66:1024-1032.
- Barton TS, Wyrobek HJ, Hill FS, Robaire B, Hales BF (2003). Numerical Chromosomal Abnormalities in Rat Epididymal Spermatozoa Following Chronic Cyclophosphamide Exposure. *Biology of Reproduction*. 69:1150-1157.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 68:394-424.
- Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Nisjk A, Uludag O, Ustun H, Subasj C, Karaoz E (2013). Recovery of Fertility in Azoospermia Rats after Injection of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Sperm Generation. *BioMed Research International*. 2013:1-18.
- Chen H, Tang QL, Wu XY, Xie LC, Lin LM, Ho GY, Ma L (2015). Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Molecular Medicine Reports*. 12:819-828.
- Choy JT, Brannigan RE (2013). The determination of reproductive safety in men during and after cancer treatment. *Fertility and sterility*. 100:1187-1191.
- Colvin M, Brundrett RB, Kan MNN, Jardine I, Fenselau C (1976). Alkylating Properties of Phosphoramidate Mustard. *Cancer Research*. 36:1121-1126.
- Condrigton AM, Hales BF, Robaire B (2007). Chronic Cyclophosphamide Exposure Alters the Profile of Rat Sperm Nuclear Matrix Proteins. *Biology of Reproduction*. 77:303-311.
- Delbès G, Vaisheva F, Luu T, Marcona L, Hales BF, Robaire B (2010). Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin

lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Reproductive Toxicology*. 29:332-338.

Dong X, Yang L, Wang H (2017). miR-520 promotes DNA-damage-induced trophoblast cell apoptosis by targeting PARP1 in recurrent spontaneous abortion (RSA). *Gynecological Endocrinology*. 33:274-278.

Dornelas LF, de Castro Duarte NM, de Castro Magalhães L (2015). Neuropsychomotor developmental delay: conceptual map, term definitions, uses and limitations. *Revista Paulista de Pediatria (English Edition)*. 33:88-103.

Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*. 222:60-70.

Eom YW, Shim KY, Baik SK (2015). Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *The Korean journal of internal medicine*. 30:580.

Faro AM, Daleck CR, Santana AE, Nardi AB, Motta FR, Eurides D (2009). Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. estudo experimental. *Ars Veterinaria*. 24:01-08.

Fenselau C, Kan MNN, Rao SS, Myles A, Friedman OM, Colvin M (1977). Identification of Aldophosphamide as a Metabolite of Cyclophosphamide in Vitro and in Vivo in Humans. *Cancer Research*. 37:2538-2543.

Hayashi M, Sofuni T, Ishidate JrM (1990). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*. 120:241–247.

Hermeto LC, Derossi R, Oliveira RJ, Pesarini JR, Antonioli-Silva ACMB, Jardim PHA, Santana ÁE, Deffune E, Rinaldi JC, Justulin LA (2016). Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research*. 15: 1-14.

IARC (2012). A review of human carcinogens – Part A: Pharmaceuticals. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 100:63-90.

Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*. 1:2-25.

- Kadam P, Ntemou E, Baert Y, Van Laere S, Van Saen D, Goossens E (2018). Co-transplantation of mesenchymal stem cells improves spermatogonial stem cell transplantation efficiency in mice. *Stem cell research & therapy*. 9:317.
- Leroy C, Rigot JM, Leroy M, Decanter C, Le Mapihan K, Parent AS, Guillou ACL, Yakoub-Agha I, Dharancy S, Noel C, Vantyghem MC (2015). Immunosuppressive drugs and fertility. *Orphanet journal of rare diseases* 10: 136.
- Liu M, Hales BF, Robaire B (2014). Effects of Four Chemotherapeutic Agents, Bleomycin, Etoposide, Cisplatin, and Cyclophosphamide, on DNA Damage and Telomeres in a Mouse Spermatogonial Cell Line. *Biology of Reproduction*. 90: 1-10.
- Lue Y, Erkila K, Liu PY, MA K, Wang C, Hikim AS, Swerdloff RS (2007). Fate of Bone Marrow Stem Cells Transplanted into the Testis - Potential Implication for Men with Testicular Failure. *The American Journal of Pathology*. 170:899-908.
- Luz PLD (2018). Medicina translacional-nova fronteira. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*. 28.
- Mason C, Dunnill P (2008). A brief definition of regenerative medicine.
- Mehrabani D, Hassanshashi MAM, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, Dianatpour M, Khodabandeh Z, Jahromi IR, Tanideh N, Ramzi M, Aqababa H, Kuhi-Hoseinabadi O (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 8:103-110.
- Meligy FY, Abo Elgheed AT, Alghareeb SM (2019). Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on Cisplatin induced testicular damage in adult male albino rat. *Ultrastructural Pathology*. 1-28.
- Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, Johnson JK, Schafer K (2007). Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. *Toxicologic Pathology*. 35:742-750.
- Monfesi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T (2013). Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 11:537-544.

Monteiro BS, Santos BSD, Almeida BLD, Hiura E, Fiorio WAB, Valdetaro GP, Campagnol, D. (2018). Adipose tissue derived mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of ischemia/reperfusion induced acute kidney injury in rats. Application route and therapeutic window. *Acta cirurgica brasileira*. 33:1016-1026.

Morrison M (2012). The dynamics of contemporary expectations in regenerative medicine. *Biosocieties*. 7:3-22.

Nargesi AA., Lerman LO, Eirin A (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges. *Stem cell research & therapy*. 8:273.

Oliveira RJ, Kanno TYN, Salles MJS, Lourenã OACS, Ribeiro LR, Freiria GA, Matiazi HJO, Mantovani MS, Silva AF (2009). Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 53:164-73.

Onaolapo AY, Oladipo BP, Onaolapo OJ (2017). Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. *Andrologia*. 3:1-10.

Oveissi V, Ram M, Bahramsoltani R, Ebrahimi F, Rahimi R, Naseri R, Belwahl T, Devkotas HP, Abbasabad Z, Farzaei MH (2019). Medicinal plants and their isolated phytochemicals for the management of chemotherapy-induced neuropathy: therapeutic targets and clinical perspective. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Patschan D, Buschmann I, Ritter O, Kribben A (2018). Cell-Based Therapies in Acute Kidney Injury (AKI). *Kidney and Blood Pressure Research*. 43:673-681.

Pesarini JR, de Oliveira EJT, Pessatto LR, Rabacow APM, Camassola M, dos Santos BP, Barros ME, Cantero WB, Antonioli-Silva ACMB, Oliveira RJ (2018). Calcitriol combined with calcium chloride causes apoptosis in undifferentiated adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells, but this effect decreases during adipogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 108:914-924.

Pesarini JR, Oliveira RJ, Pessatto LR, Antonioli-Silva ACMB, Felicidade I, Nardi NB, Camassola M, Mantovani MS, Ribeiro LR (2017). Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern

Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 91:861-871.

Pınar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M (2018). The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97:1486-1492.

Pontes LDB, Antunes YPPV, Bugano DDG, Karnakis T, Giglio AD, Kaliks RA (2014). Prevalence of renal insufficiency in elderly cancer patients in a tertiary cancer center. *Einstein (São Paulo)*. 12:300-303.

Ravegnini G, Zolezzi Moraga J, Maffei F, Musti M, Zenesini C, Simeon V, Sammarini G, Festi D, Hrelia P, Angelini S (2015). Simultaneous analysis of SEPT9 promoter methylation status, micronuclei frequency, and folate-related gene polymorphisms: The potential for a novel blood-based colorectal cancer biomarker. *International journal of molecular sciences*. 16:28486-28497.

Rengasamy P (2017). Congenital malformations attributed to prenatal exposure to cyclophosphamide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 17:1211-1227.

Rezvanfar MA, Sadrhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-sadee H, Rezvanfar MA, Mohammadirad A, Salehnia A, Abdollahi M (2008). Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human & Experimental Toxicology*. 27:901-910.

Roth JM, Restani RG, Goncalves TT, Sphor SL, Ness AB, Martino-Roth MG, Garcias GL (2008). Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genet Mol Res*. 7:433-43.

Schweich LC, de Oliveira EJT, Pesarini JR, Hermeto LC, Camassola M, Nardi NB, Brochado TM, Antonioli-Silva ACMB, Oliveira RJ (2017). All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 96:1267-1274.

Sladek NE (1988). Metabolism of Oxazasphosphorines. *Pharmacology & Therapeutics*. 37:301-355.

Smith JF, Yango P, Altman E, Choudhry S, Poelzl A, Zamah AM, Rosen M, Klatsky PC, Tran ND (2014). Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. *Stem cells translational medicine*. 3:1043-1054.

Souza ML, Rodrigues FSM, Ferraz RRN, Deus RB, Malagutti W, Barnabé AS, Francisco L, Nunes RS (2010). Incidência de insuficiência renal aguda e crônica como complicações de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva. *Conscientiae Saúde*. 9:456-461.

Sun X, Shan A, Wei Z, Xu B (2018). Intravenous mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate myocardial inflammation in the dilated cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 503:2611-2618.

Torchinsky A, Savion S, Gorivodsky M, Shepshelovich J, Zaslavsky Z, Fein A, Toder V (1995). Cyclophosphamide-induced teratogenesis in ICR mice: the role of apoptosis. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 15:79-190.

Tripathi DN, Jena GB (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*. 248:96-103.

Urt-Filho A, Oliveira RJ, Hermeto LC, Pesarini JR, David ND, Cantero WDB, Falcão G, Marks G, Antonioli-Silva ACMB (2016). Mesenchymal stem cell therapy promotes the improvement and recovery of renal function in a preclinical model. *Genetics and molecular biology*. 39:290-299.

Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Cremer I, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L (2014). Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology*. 3:e27878. 1

VAISHEVA F, DELBÈS G, HALES BF, ROBAIRE B (2007). Effects of the Chemotherapeutic Agents for Non-Hodgkin Lymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (CHOP), on the Male Rat Reproductive System and Progeny Outcome. *Journal of Andrology*. 28:578-587.

Veal GJ, Cole M, Chinnaswamy G, Sludden J, Jamieson D, Errigton J, Malik G, Hill CR, Chamberlain T, Boddy AV (2016). Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer*. 55:56-64.

Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *European journal of cancer*. 44:1507-1515.

Woudstra L, Krijnen PAJ, Bogaards SJP, Meinster E, Emmens RW, Kokhuis TJA, Bollen IAE, Baltzer H, Baart SMT, Parbhudayal R, Helder MN, van Hinsbergh VWM, Musters RJP, de Jong N, Kamp O, Niessen HWM, van Dijk A, Juffermans LJM (2016). Development of a new therapeutic technique to direct stem cells to the infarcted heart using targeted microbubbles: StemBells. *Stem cell research*. 17:6-15.

Wultsch G, Nersesyan A, Kundi M, Jakse R, Beham A, Wagner KH, Knasmueller S (2014). The sensitivity of biomarkers for genotoxicity and acute cytotoxicity in nasal and buccal cells of welders. *International journal of hygiene and environmental health*. 217:492-498.

Yamamoto K, Kurata Y, Inoue Y, Adachi M, Tsuneto M, Miake J, Ogino K, Ninomiya H, Yoshida A, Shirayoshi Y, Suyama Y, Yagi S, Nishimura M, Yamamoto K, Hisatome I (2018). Pretreatment with an angiotensin II receptor blocker abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Regenerative therapy*. 9:79-88.

Yang RF, Liu TH, Zhao K, Xiong CL (2014). Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian journal of andrology*. 16:698.

ZHANG D, LIU X, PENG J, HE D, LIN T, ZHU J, LI X, ZHANG Y, WEI G (2014). Potential Spermatogenesis Recovery with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in an Azoospermic Rat Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:13151-13165.

ZHANG J, TIAN Q, ZHOU SF (2006). Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Current Drug Therapy*. 1:55-84.

Zheng W, Yang Y, Sequeira RC, Bishop CE, Atala A, Gu Z, Zhao W (2019). Effects of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem/stromal Cells on Liver Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*.

## Artigo

### **A terapia celular com células tronco mesenquimais do tecido adiposo melhora a qualidade do epitélio germinativo em camundongos Swiss**

Juliano Rodrigues de Oliveira<sup>1,2</sup>, Silvia Cordeiro das Neves<sup>1,2</sup>, Giovana Corbucci Danti Rezende<sup>1,2</sup>, Luciana Nakao Odashiro Miji<sup>3</sup>, Giovana Corbucci Danti Rezende<sup>1,2</sup>, Bruno Ivo Pelizaro<sup>1,4</sup>, Diego Duarte Marques de Oliveira<sup>1,2</sup>, Rodrigo Juliano Oliveira<sup>1,2,4,5\*</sup>, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva<sup>1,2\*\*</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Estudos em Células-Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica - CeTroGen, Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian - HUMAP, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade de Medicina Dr. Hélio Mandetta - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>3</sup>Lac Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

<sup>5</sup>Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas - CCB, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

\*Autor correspondente para os ensaios biológicos:  
rodrigo.oliveira@ufms.br

\*\*Autor correspondente geral: andreia@corporesanosaude.com.br

Resumo

## RESUMO

O câncer é uma doença que acomete um grande número de pessoas e essas, em geral, são submetidas à quimioterapia. Um dos efeitos adversos dessa terapêutica são as lesões testiculares com a redução a fertilidade e uma das alternativas para o tratamento desses casos é a terapia celular. Assim, a presente pesquisa avaliou um protocolo de explante de células tronco mesenquimais do tecido adiposo e os efeitos da terapia celular, sob o epitélio germinativos de camundongos Swiss tratados com ciclofosfamida. Os grupos experimentais foram: (I) Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Os resultados indicaram que o transplante das CTM não altera a frequência de micronúcleos no sangue periférico. Mas, melhora a qualidade do epitélio germinativo sendo o escore de qualidade do grupo CP + CTM igualado ao do grupo CN. Frente ao exposto considera-se que a maior contribuição desse artigo foi apresentar um protocolo de explante de células tronco mesenquimais de fragmento de tecido adiposo viável para ser transladado para pesquisas clínicas devido ao seu baixo custo e simplicidade, e comprovar, histologicamente, que a terapia celular melhora a qualidade do epitélio germinativo em modelo pré-clínico.

## 1. Introdução

São diagnosticados anualmente cerca de 18 milhões casos de câncer (Bray et al., 2018). Esse é um problema de saúde pública que se agrava em adultos jovens, que ainda desejam constituir família e pretendem ter filhos, visto que os tratamentos com quimioterápicos causam danos genéticos em diferentes linhagens celulares e inclusive nas reprodutivas (Choy and Brannigan, 2013). Danos no DNA podem acarretar redução da fertilidade (Pinar et al., 2018) e/ou predispor a prole à embrioletalidade (Torchinsk et al., 1995), aborto (Dong et al., 2017) e alterações do desenvolvimento embrio-fetal tais como malformações congênitas e atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (Dornelas et al., 2015; Rengasamy, 2017). No entanto, ao se considerar a relação custo-benefício a quimioterapia ainda é uma das formas mais importantes para o tratamento de tumores (Oveissi et al., 2019). Mas, em geral os quimioterápicos possuem muitos efeitos adversos (Wolf et al., 2008; Oveissi et al., 2019).

A ciclosfosfamida é um dos quimioterápicos mais usados (Vacchelli et al., 2014) e é indicado para o tratamento de leucemias linfocíticas crônicas, linfomas e tumores sólidos (Iarc, 2012; Vacchelli et al., 2014). Quando os pacientes se expõem a esse quimioterápico pode ocorrer nefro (Pontes et al., 2014) e gonadotoxicidade (Leroy et al., 2015). Nesse último caso inclui-se a diminuição na contagem espermática (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Abiodun et al., 2016; Onaolapo; Oladipo; Onaolapo, 2017), alterações morfológicas (Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010), danos ao material genético dos espermatozoides (Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Liu; Hales; Robaire, 2014), aumento do número de aneuploidias (Barton et al., 2003), disfunção telomérica (Liu; Hales; Robaire, 2014), alteração no perfil proteico da matrix nuclear (Condrigton; Hales; Robaire, 2007) e da expressão gênica (Aguilar-Mahecha; Hales; Robaire, 2002), a diminuição do peso dos testículos, dos epidídimos (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010) e da próstata (Rezvanfar et al., 2008; Delbès et al., 2010), alterações histopatológicas, com a formação de vacúolos (Vaisheva et al.,

2007; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Abiodun et al., 2016), o estreitamento dos túbulos seminíferos, a perda de células germinativas (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Abiodun et al., 2016; Onaolopo; Oladipo; Onaolapo, 2017), o edema (Rezvanfar et al., 2008) e o aumento do espaço intersticial (Rezvanfar et al., 2008; Onaolopo; Oladipo; Onaolapo, 2017), a diminuição nos níveis plasmáticos de hormônio luteinizante (LH) (Elangovan et al., 2006; Abiodun et al., 2016), do hormônio folículo-estimulante (FSH) (Abiodun et al., 2016) e da testosterona (Elangovan et al., 2006; Rezvanfar et al., 2008; Abiodun et al., 2016; Onaolapo; Oladipo; Onaolapo, 2017). Destaca-se ainda que muitas vezes mesmo após suspensão do tratamento os testículos não retomam a sua arquitetura e produção celular normal. Assim, novas terapias são estudadas na tentativa melhorar a infertilidade causada por esse agente anticâncer.

Dentre diferentes propostas terapêuticas a terapia celular com células tronco mesenquimais, independentemente da sua origem (medula óssea, cordão umbilical ou tecido adiposo), tem demonstrado efeitos positivos na recuperação de danos estruturais do epitélio germinativo, do peso testicular e da fertilidade (Lue et al., 2007; Monfesi et al., 2013; Zhang et al., 2014; Yang et al., 2014; Chen et al., 2015; Cakici et al., 2013; Mehrabani et al., 2015). Diante do exposto a presente pesquisa avaliou um protocolo de explante de células tronco mesenquimais do tecido adiposo bem como os avaliou os efeitos da terapia celular, com células tronco mesenquimais do tecido adiposo, sob o epitélio germinativos de camundongos *Swiss* tratados com ciclofosfamida.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Animais**

Utilizou-se 40 camundongos *Mus musculus* da variedade *Swiss*, com peso médio de 30 g, em idade reprodutiva cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os animais passaram por um de adaptação de 7 dias antes de iniciar os experimentos.

Os animais foram mantidos isolados em caixas de polipropileno forradas com cepilho sob condições padronizadas de climatização (com temperatura mantendo-se em torno de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $55 \pm 10\%$ ) em *rack*

ventilada Alesco®. Os animais foram alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*.

O estudo foi realizado de acordo com as Diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Cômite de Ética no Uso de Animais da UFMS sob o protocolo #920/2017.

## **2.2. Delineamento Experimental**

Os animais foram distribuídos em dois lotes: (I) composto por 10 fêmeas doadoras do tecido adiposo para a obtenção das CTM e, (II) composto por 30 machos distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais (n=10): Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção, na proporção de 0,1mL/10g de peso corporal (p.c.) por via intraperitoneal (i.p.), durante 30 dias, com intervalos de cinco dias entre as administrações; e, duas administrações de solução tampão fosfato (PBS), livre de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  com pH 7,4, por via intravenosa (i.v.), com intervalo de 10 dias entre elas, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida (Genuxal - Baxter®, CAS 2638B5063, Lote 6/138) na dose de 150 mg/kg (p.c.;i.p) durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as administrações (Drumond et al., 2011) e, duas administrações de PBS (i.v.), com intervalo de 10 dias, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico; e Controle Positivo + Células-Tronco Mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg (p.c.;i.p) durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as administrações e, realizou-se dois transplantes de  $1 \times 10^6$  CTM (i.v.), de acordo com Cakici et al. (2013), com modificações, com intervalo de 10 dias e, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico.

Após 60 dias de experimentação, submeteu-se os machos à pesagem, eutanásia por deslocamento cervical e retirada dos órgãos (coração, pulmões, fígado, baço, rins e testículos).

## **2.3. Explante e cultivo das Células Tronco Mesenquimais**

As CTM foram explantadas segundo o protocolo de Hermeto et al. (2016), com modificações. As amostras de tecido adiposo foram obtidas da região abdominal/inguinal de camundongos fêmeas adultas após eutanásia por deslocamento cervical. Sucintamente, acrescentou-se meio DMEM *Low Glucose* (DMEMLG) (Sigma-Aldrich®, lote SLBS0097V, número de catálogo D5523), na proporção de 2 mL de meio para cada grama de tecido adiposo. Suplementou-se o meio com Colagenase tipo A1 (Gibco®, lote 1879368, número de catálogo 17100017) na proporção de 2 mg de colagenase para cada mL do meio DMEMLG. Manteve-se o material biológico em incubadora a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> *overnight*. A inativação da atividade enzimática, na manhã seguinte, deu-se pela adição de meio de cultivo DMEMLG suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich®, lote SPBB2353V, número de catálogo F2561), na mesma quantidade de meio utilizado com colagenase anteriormente citado. Em seguida, centrifugou-se o material a 300 g durante 10 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* de células e, prontamente plaqueou-se o material em garrafas de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> com meio DMEMLG suplementado com 10% de SFB. Manteve-se as CTM em cultivo em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub> até que essas atingissem cerca de 80% de confluência, quando realizou-se a tripsinização com solução a 0,025% de tripsina (Tripsina-EDTA, 0,025%; LCG Biotecnologia, lote 11014AB, número de catálogo BR30042-01). Posteriormente, fez-se a contagem do número de células em câmara de Neubauer e o replaqueamento em frascos de 75 cm<sup>2</sup> de área de cultura. Esse procedimento de cultivo repetiu-se até a 4ª passagem celular, quando realizou-se o transplante das CTM na proporção de 1,0 x 10<sup>6</sup> células/animal (Cakici et al., 2013).

#### **2.4. Diferenciação Osteogênica, Adipogênica e Condrogênica**

Os frascos destinados aos experimentos de diferenciação, quando atingiram a confluência de 80%, foram novamente tripsinizados e as CTM foram semeadas em 6 frascos de 25 cm<sup>2</sup>, na concentração de 2x10<sup>5</sup> células/frasco (Urt-Filho et al., 2016). Três frascos de 25cm<sup>2</sup>, utilizados como controles, foram mantidos em meio DMEMLG suplementado com 10% SBF. Para a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica, as células

foram mantidas por 24 horas em meio com 10% SBF suplementado. Em seguida, esse foi substituído por meio de cultura *STEMPRO Adipogenic, Osteogenesis e Chondrogenesis Differentiation Kit* (Invitrogen®) e mantidas em cultura por 14 dias para a diferenciação adipogênica e por 21 dias para as culturas osteogênicas e condrogênicas, com trocas duas vezes por semana (Urt-Filho et al., 2016).

Para a confirmação da diferenciação adipogênica, após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 60 minutos, em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas com isopropanol a 60% e, posteriormente, incubadas com *Oil Red O* (Sigma®) por 20 minutos em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação foi confirmada pelo acúmulo de lipídeos intracelulares no 14º dia (Pesarini et al., 2017; Schweich et al., 2017; Pesarini et al., 2018).

Para a diferenciação osteogênica, após descarte do meio diferenciador, as células foram fixadas por 10 min., em temperatura ambiente, com formol a 10%. Em seguida, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e coradas com *Alizarin Red* (Sigma®) por 5 min. em temperatura ambiente. O excesso de corante foi removido por lavagens com água destilada. A diferenciação osteogênica foi comprovada pela visualização de depósitos de cálcio no 21º dia (Pesarini et al., 2017; Schweich et al., 2017; Pesarini et al., 2018).

Durante o processo de cultivo celular da diferenciação condrogênica as células se agruparam formando um esferoide. Ao final do processo esse foi coletado por aspiração com uma pipeta Pasteur. O esferoide foi fixado em formalina tamponada 10% à temperatura ambiente e, posteriormente, submetido à rotina histológica no processador de tecidos automatizado TP09 TS Lupetec® conforme instruções do fabricante. Posteriormente, o esferoide foi cortado em micrótomo Leica® RM2235 em cortes com espessura 3 µm. As lâminas foram coradas com *Azul de Alcian* usando o kit EasyPath conforme as especificações do fabricante. A diferenciação foi confirmada pela presença de matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos no 21º dia (Pesarini et al., 2017; Schweich et al., 2017; Pesarini et al., 2018).

## **2.5. Preparação e transplante das CTM**

Na 4ª passagem as CTM foram tripsinizadas, em seguida, lavou-se as CTM com PBS a exaustão (homogeneização em 5 mL de PBS seguido de centrifugação a 300 g por 10 min, até que o *pellet* ficasse completamente limpo e o sobrenadante transparente) para o transplante.

Os animais do grupo CTM foram submetidos à anestesia inalatória (Isoflurano - BioChimico®, Brasil, CAS/401. 4238-3, Lote/007070). Em seguida, transplantou-se  $1 \times 10^6$  CTM preparadas em solução de PBS (pH 7,4) por i.v., num volume máximo 100 µL, com auxílio de cateter intravenoso 24 G (Solidor®, Brasil, Lote/011606G). Repetiu-se esse procedimento por mais uma vez, com intervalo de 10 dias entre as duas aplicações (Cakici et al., 2013).

## **2.6. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico**

Coletou-se 20µL de sangue periférico por meio da punção da veia caudal e depositou-se a amostra em uma lâmina previamente corada com 20 µL Alaranjado de Acridina (1 mg/mL). Em seguida a amostra foi coberta por uma lamínula. As coletas de sangue ocorreram 24 horas após a aplicação de Célula Tronco Mesenquimais. Armazenou-se o material em freezer (-20°C) por um período mínimo de quinze dias. Avaliou-se a presença de micronúcleos no interior de eritrócitos por meio de microscópio de fluorescência no aumento de 40x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Analisou-se 2000 células/animal (Hayashi et al., 1990; Oliveira et al., 2009).

## **2.7. Histologia**

Os testículos foram fixados em solução de Bouin (75,0 mL de Ácido Pícrico, 25,0 mL de formaldeído 40% e 5,0 mL de ácido acético) por 24h e posteriormente preservados em álcool etílico 70%. Os órgãos foram seccionados e incluídos em parafina e cortados em micrótomo com 5 µm de espessura e corados em hematoxilina e eosina (HE). A análise histológica foi realizada segundo Johnsen (1970) bem como o cálculo dos scores totais (pode chegar a 1.000 pontos). Assim, todos os túbulos seminíferos das lâminas histológicas foram avaliados sistematicamente e cada um deles recebeu uma pontuação de 1 a 10 de acordo com os seguintes critérios: (I) Score 1 - sem

células em seção tubular; (II) Score 2 - sem células germinativas, mas as células de Sertoli estão presentes; (III) Score 3 - as espermatogônias são as únicas células germinativas presentes; (IV) Score 4 - apenas poucos espermatócitos (<5) e sem espermátides ou espermatozóides presentes; (V) Score 5 - sem espermatozóides, sem espermátides, mas com vários ou muitos espermatócitos presentes; (VI) Score 6 - sem espermatozóides e apenas poucas espermátides (<5-10) presentes; (VII) Score 7 - sem espermatozóides, mas muitas espermátides presentes; (VIII) Score 8 - apenas alguns espermatozóides (<5-10) presentes na seção; (IX) Score 9 - muitos espermatozóides presentes, mas epitélio germinativo desorganizado com descamação marmoreada ou obliteração do lúmen; (X) Score 10 - espermatogênese completa com muitos espermatozóides (os espermatozóides são aqui definidos como células que atingiram a forma da cabeça pequena do espermatozóide) e o epitélio germinativo organizado em uma espessura regular, deixando um lúmen aberto). Para calcular uma pontuação média, o número de tubulus registrados em cada pontuação é multiplicado pela pontuação e a soma de todas as 10 multiplicações é dividida pelo número total de tubulus registrados. Por uma questão de clareza, os números de tubulus encontrados em cada etapa são mostrados neste artigo em percentagem do número de tubulis. Isso não é feito no trabalho de rotina. Para algum propósito, as percentagens cumulativas (10 + 9, 10 + 9 + 8 etc.) são formadas e estas podem ser multiplicadas pelo volume total dos testículos para produzir números para espermatogênese em termos absolutos (Figura 6).

Para calcular a pontuação média (PM), o número de tubulus registrados em cada pontuação foi multiplicado de 1 a 10 e a soma de todas as 10 multiplicações foi dividida pelo número total de tubulus registrados. Por uma questão de clareza, os números de tubulus encontrados em cada etapa são mostrados neste artigo em percentagem do número de tubulis. Isso não é feito no trabalho de rotina. Para algum propósito, as percentagens cumulativas (10 + 9, 10 + 9 + 8 etc.) são formadas e estas podem ser multiplicadas pelo volume total dos testículos para produzir números para espermatogênese em termos absolutos (Johnsen, 1970).

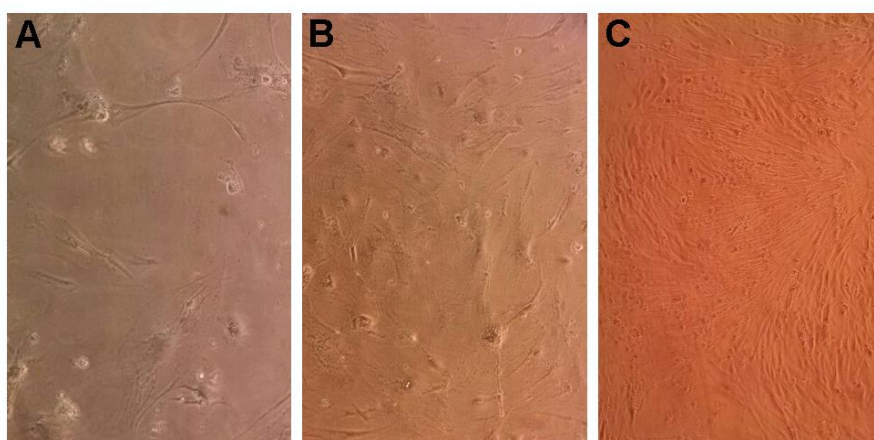
## 2.8. Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  Erro Padrão da Média. A análise estatística foi realizada de acordo a distribuição dos dados. Para dados com distribuição paramétrica utilizou-se o teste ANOVA/Tukey e para dados de distribuição não paramétrica utilizou-se o teste Kruskal-Wallis/Dunn. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

### 3.1. Expansão das Células Tronco Mesenquimais

Após a extração e o isolamento das CTM essas foram expandidas em frascos de cultura com sucessivos repiques. Em todas as passagens a viabilidade foi superior a 95%. Na figura 1 podem ser observados os aspectos das culturas de CTM (Figura 1).

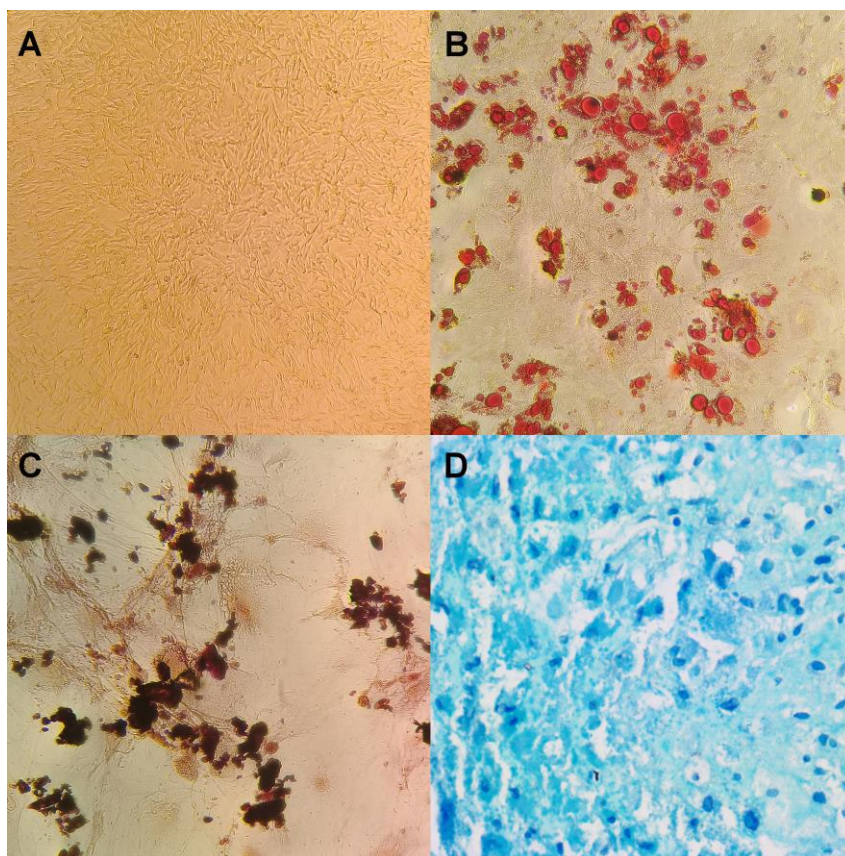


**Figura 1** – Aspectos das culturas em expansão: A – Cultivo em fase inicial (20 dias), aumento 400x; B – Cultura com confluência próximo a 60% (7 dias após a primeira passagem – 1 repique), aumento de 400x; C – Cultura em confluência superior a 90%, aumento de 100x.

### 3.2. As Células Tronco Mesenquimais Diferenciam-se em Células Osteogênicas, Adipogênicas e Condrogênicas *in vitro*

A confirmação que as células em cultivo realmente se tratavam de CTM se deu por meio das diferenciações adipogênica, osteogênica e condrogênica onde foi possível identificar o acúmulo de lipídeos corados com *Oil red O*, os

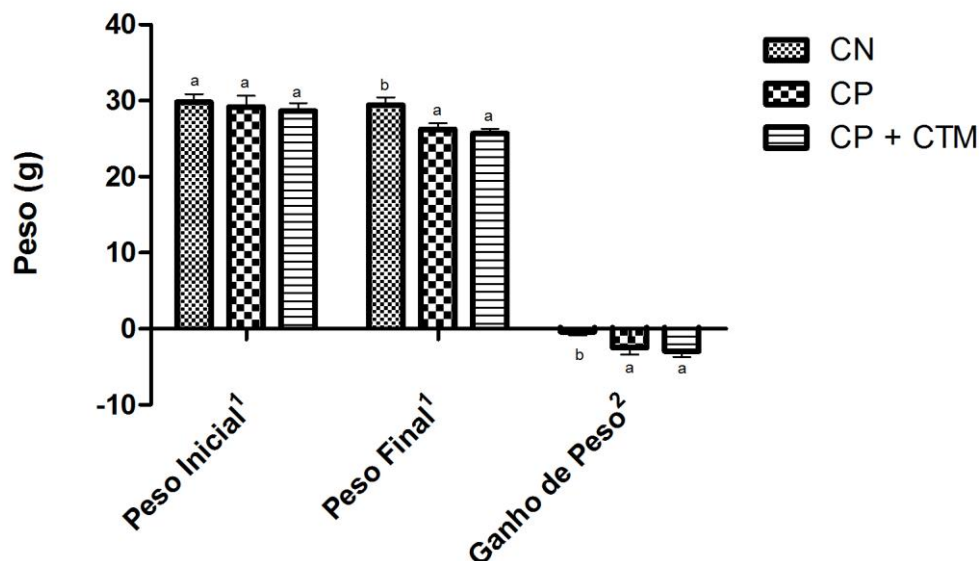
depósitos de cálcio corados com *Alizarin Red* e a matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos corados com Azul de Alcian, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2** – Fotomicrografia das células tronco mesenquimais e das células tronco mesenquimais em diferenciação: (A) cultura indiferenciada, (B) cultura em diferenciação adipogênica com vacúolos lipídicos corados por *Oil red O*, (C) cultura em diferenciação osteogênica com depósitos de cálcio corados por *Alizarin Red*, (D) Cultura em diferenciação condrogênica com matriz extracelular rica de glicosaminoglicanos corada por Azul de Alcian. Aumento de 400x.

### 3.3. Parâmetros biométricos

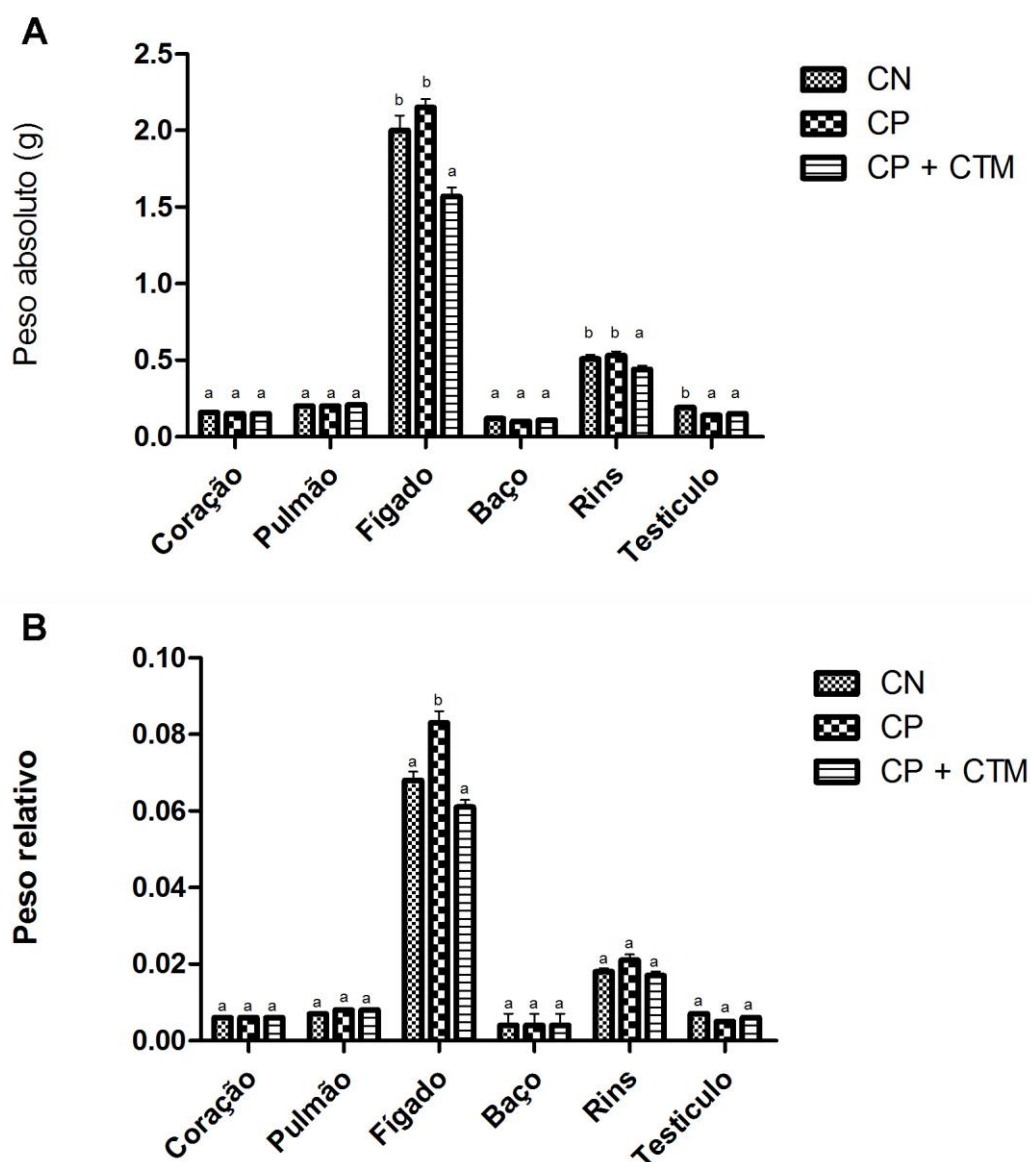
O peso inicial dos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Entretanto, os animais do grupo CN apresentaram maior peso final e menor perda de peso quando comparado aos animais dos grupos CP e CP + CTM ( $p < 0,05$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Parâmetros biométricos de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais. Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: <sup>1</sup>ANOVA/Tukey; <sup>2</sup>Kruskall-Wallis/Dunn,  $p < 0,05$ ).

Os pesos absolutos do coração, pulmão e baço não demonstraram diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Já os pesos do fígado e rins dos animais do grupo CP + CTM foram inferiores ( $p < 0,05$ ) aos dos grupos CN e CP. O peso absoluto dos testículos dos camundongos do grupo CN foi superior ( $p < 0,05$ ) aos dos demais grupos experimentais (CP e CP + CTM) (Figura 4 A).

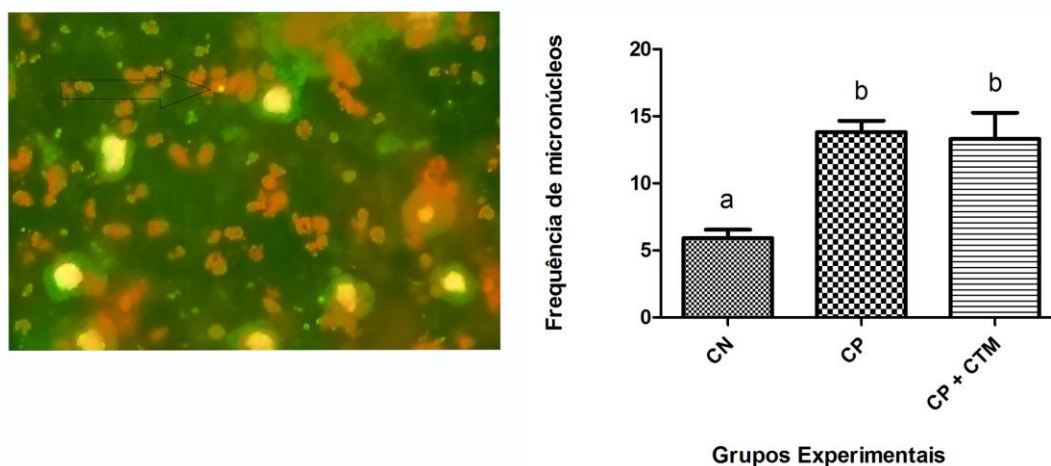
Os pesos relativos dos órgãos coração, pulmão, rins, baço e testículos não apresentaram diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ). Já o peso do fígado aumentou ( $p < 0,05$ ) no grupo CP em relação aos demais (Figura 4B).



**Figura 4.** Parâmetros biométricos de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais. Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ).

### 3.4. Avaliação da integridade do material genético

A frequência de micronúcleos do sangue periférico foi maior ( $p>0,05$ ) nos grupos CP e CP + CTM, ambos tratados com ciclofosfamida, em relação ao grupo CN (Figura 5).



**Figura 5.** Frequência de micronúcleo de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais. Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ANOVA/Tukey;  $p<0,05$ ).

### 3.5. Avaliação histológica

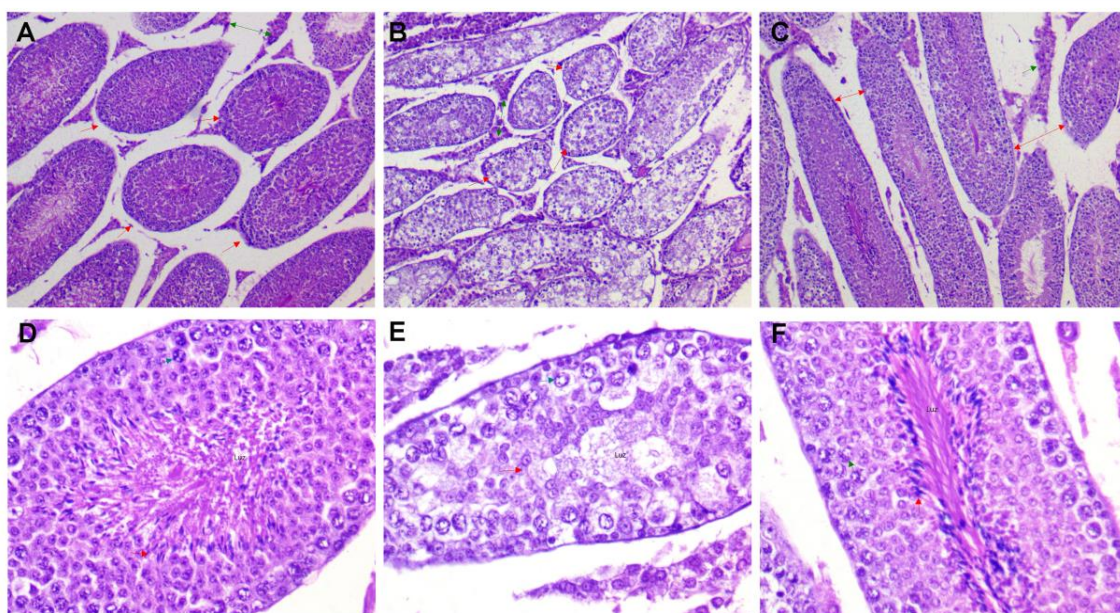
A análise histopatológica demonstrou que a administração da ciclofosfamida reduziu ( $p<0,05$ ) o escore de qualidade dos túbulos seminíferos de  $981,73 \pm 3,84$  no CN para  $831,90 \pm 50,22$  no CP. Isso demonstra uma perda 15,26 pontos percentuais na qualidade do epitélio germinativo. Quando junto à ciclofosfamida foi transplantadas as CTM o escore subiu de  $831,90 \pm 50,22$  no CP para  $953,33 \pm 11,34$  no grupo CP + CTM. Isso demonstra uma melhora de 14,60 pontos percentuais e assim CN e CP + CTM são estatisticamente semelhantes.

Tabela 1. Escore de qualidade testicular de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de células tronco mesenquimais.

| Grupos Experimentais | Escore de lesão testicular |
|----------------------|----------------------------|
| CN                   | 981,73±3,84 <sup>a</sup>   |
| CP                   | 831,90±50,22 <sup>b</sup>  |
| CP + CTM             | 953,33±11,34 <sup>a</sup>  |

Legenda: Controle Negativo (CN) - os animais foram tratados com água de injeção; Controle Positivo (CP) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg; e Controle Positivo + Células-tronco mesenquimais (CP + CTM) - os animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg e transplantados com  $1,0 \times 10^6$  células tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ANOVA/Tukey;  $p < 0,05$ ).

Na figura 6 é possível observar túbulos seminíferos dos animais dos grupos experimentais. Nos grupos CN e CP + CTM observa-se túbulos seminíferos normais e a presença de espermatídes secundárias (Figuras A, D e C, F). Já no grupo tratado apenas com ciclofosfamida os túbulos seminíferos estão alterados e não observa-se espermatozóides (Figura B). Na figura E nota-se presença de espermatócitos primário e secundários, porém não observa-se espermatozoides (Figura E).



**Figura 6.** Cortes histológicos de túbulos seminíferos dos animais dos grupos experimentais CN (A e D), CP (B e E) e CP + CTM (C e F). Na figura A as setas vermelhas indicam túbulos seminíferos normais com celularidade normal e com a presença de espermatídes secundárias. Na figura B as setas vermelhas apresentam túbulos seminíferos alterados com uma menor celularidade, sem a visualização de espermatídes secundárias. Na figura C as setas vermelhas apontam para túbulos seminíferos normais com espermatídes secundárias. Nas figuras A, B e C - as setas verdes indicam células de Leydig intersticiais. Nas figuras D, E e F as setas vermelhas indicam espermatídes secundárias/espermatozóides e as setas verdes indicam espermatócito primário. Na Figura E é possível notar a ausência de espermatozóide. A coloração usada foi Hematoxilina/Eosina. As figuras A, B e C estão em um aumento de 100x e as figuras D, E e F estão em um aumento de 400X.

#### 4. Discussão

A medicina tradicional sofre importantes transformações e uma das promessas da medicina do futuro é a medicina regenerativa. Essa constitui-se da possibilidade de prover a regeneração do organismo em nível celular e/ou tecidual (Mason; Dunnill, 2008; Acero, 2015). Esse novo paradigma da medicina provocará transformações na ciência, nas terapêuticas e na saúde pública (Morrison, 2012; Acero, 2015) e revoluções serão criadas na busca da homeostasia. Para que isso se concretize há a necessidade de acelerar a transferência de conhecimentos das bancadas dos laboratórios (da pesquisa básica) para a aplicação clínica; aprofundar as observações clínicas em busca de melhor entendimento dos processos de doença (fisiopatológico), terapêutica e cura; além de aplicar as inovações biotecnológicas à população com responsabilidade. São esses os preceitos que definem a medicina translacional, segundo Luz (2018), com modificações.

Baseado nesses conceitos o presente trabalho se propôs a testar um protocolo de explante e cultivo de células tronco do tecido adiposo em modelo pré-clínico com o intuito de translada-lo, posteriormente, para estudos clínicos. O protocolo descrito nesse estudo foi adaptado da literatura se mostrou eficiente em isolar as CTM de pequenos fragmentos de tecido adiposo, a um baixo custo, em um curto espaço de tempo, sem muitos passos (protocolo simplificado), sem a necessidade de equipamentos de grande porte e, portanto, possui potencial para aplicação clínica. Outro fato importante a ser informado é que as células utilizadas no presente estudo, realmente, se tratavam de CTM

visto que as mesmas se diferenciaram em adipócitos, osteócitos e condrócitos. Segundo a literatura especializada essas três diferenciações indicam que as células são CTM (Nargesi et al., 2017; Patschan et al., 2018).

Em relação ao transplante das CTM foi escolhida a via endovenosa. Essa é de fácil acesso tanto em modelo pré-clínico como clínico e, portanto, seria de fácil adesão pela classe médica. Existe uma extensa discussão na literatura sobre as diferentes vias de transplante das CTM e alguns autores citam e fazem a opção pela colocação das células *in situ* (na lesão a ser reparada). Isso se concretiza em lesões renais (Monteiro et al., 2018), cardíacas (Woudstra et al., 2016; Yamamoto et al., 2018) hepáticas (Eom et al., 2015), dentre outras. No entanto, outros autores para tratar esses mesmos tipos de lesões, fazem uso da via endovenosa (Nargesi et al., 2017; Sun et al., 2018; Zheng et al., 2019). Em relação ao testículo, em especial, há relatos tanto do uso da via endovenosa (Yang et al., 2014) quanto da via intratesticular (Kadam et al., 2018; Meligy et al., 2019) tanto para modelo pré-clínico (Yang et al., 2014; Kadam et al., 2018; Meligy et al., 2019) quanto clínico (Smith et al., 2014). Mas, a nossa preferência pela via endovenosa se deve à facilidade de proceder o transplante e, possível, menor resistência pelo paciente em se submeter ao procedimento.

Nosso estudo avaliou a frequência de danos no DNA induzidos pela ciclofosfamida em sangue periférico. Essa é uma medida indireta dos danos no DNA que podem ocorrer também nas células germinativas visto que a ciclofosfamida é um quimioterápico de ação indireta e que após metabolização no fígado, por meio da hidroxilação pela enzima CYP2B, libera a 4-hidroxíciclofosfamida e o seu tautômero, a aldofosfamida (Colvin et al., 1976; Fenselau et al., 1977; Sladek, 1988; Zhang; Tian; Zhou, 2006; Veal et al., 2016). Uma vez em contato com as células, a aldofosfamida sofre clivagem e libera a mostarda de fosforamida e da acroleína sendo a primeira responsável pela ação antineoplásica e, portanto, causadora de danos no DNA (Colvin et al., 1976; Fenselau et al., 1977; Sladek, 1988; Zhang; Tian; Zhou, 2006; Veal et al., 2016). Os nossos resultados indicaram que o transplante das CTM não modifica o padrão de danos no DNA (danos cromossômicos) contabilizados por meio do ensaio do micronúcleo. O aumento da frequência de micronúcleos, em geral, está associado a pior prognóstico e desenvolvimento de doenças

crônicas (Roth et al., 2008) danos teciduais (Wultsch et al., 2014) e acometimento por câncer (Ravegnini et al., 2015).

Como a maior contribuição desse estudo, os nossos resultados demonstraram que a terapia celular com CTM foi capaz de melhorar a qualidade do epitélio germinativo. A ciclofosfamida como era esperado reduziu a qualidade do epitélio germinativo o que é condizente com redução da fertilidade e isso se deve às alterações histopatológicas com a formação de vacúolos (Vaisheva et al., 2007; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Abiodun et al., 2016), estreitamento dos túbulos seminíferos, perda de células germinativas (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010; Abiodun et al., 2016; Onaolapo; Oladipo; Onaolapo, 2017), edema (Rezvanfar et al., 2008) e aumento do espaço intersticial (Rezvanfar et al., 2008; Onaolapo; Oladipo; Onaolapo, 2017). Além disso a literatura cita diminuição na contagem espermática (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Abiodun et al., 2016; Onaolapo; Oladipo; Onaolapo, 2017), alterações morfológicas dos espermatozoides (Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010) e a diminuição do peso dos testículos e dos epidídimos (Elangovan et al., 2006; Vaisheva et al., 2007; Rezvanfar et al., 2008; Tripathi; Jena, 2008; Delbès et al., 2010). No nosso estudos destacamos redução do escore de qualidade do epitélio germinativo segundo Johnsen (1970) com destaque para a redução depleção celular dos túbulos seminíferos e ausência de espermatozoides.

Por outro lado, camundongos tratados que ciclofosfamida mas que receberam a terapia celular com CTM teve o epitélio germinativo e os túbulos seminíferos reestabelecidos a padrões muitos próximos aqueles observados no grupo controle negativo. Essa assertiva é confirmada pela ausência de diferenças significativas entre os grupos CN e CP + CTM. Assim, pode-se inferir que as CTM foram capazes de reestabelecer a qualidade do epitélio germinativo e isso pode corresponder ao reestabelecimento da fertilidade. Nossos resultados corroboram os estudos de Lue et al. (2007), Monfesi et al. (2013), Zhang et al. (2014), Yang et al. (2014), Chen et al. (2015), Cakici et al. (2013) e Mehrabani et al. (2015) que relataram recuperação do tecido testicular.

Acredita-se que essas melhorias no epitélio germinativo podem ocorrer por dois mecanismos: (I) a regeneração e (II) a imunomodulação por efeito parácrino). No primeiro caso acredita-se que as CTM administradas, diretamente na lesão ou por via endovenosa, tem a capacidade reconhecer a lesão e aderir no local a ser regeneração. Nesse caso as CTM sofrem transdiferenciação e passam a compor o tecido do órgão auxiliando na recuperação tecidual (Little et al, (2018)) e fisiológica para se atingir a homeostasia. No segundo caso acredita-se que as CTM migram até o local da lesão e produzem fatores reparadores endógenos, fatores anti-inflamatórios e antiapoptóticos que auxiliam na recuperação do órgão/tecido lesionado. Mas, sem acontecer a integração da CTM à matriz tecidual (Souza et al., 2010).

Em relação aos parâmetros biométricos observou-se que a ciclofosfamida, independentemente do transplante das CTM causou redução do peso final e, portanto, foi responsável por maior perda de peso. Esse fato já era esperado devido à toxicidade desse quimioterápico e esse fato foi relatado também por Michael et al. (2007). Já em relação às variações dos pesos absoluto dos órgãos que pode indicar toxicidade (Michael et al., 2007) observou-se alterações em fígado, rins e testículos. Porém, na avaliação do peso relativo (onde se faz a correção do peso do órgão pelo peso do animal) só foram observadas diferenças entre o grupo CP e os grupos CN e CP + CTM (sendo esses dois últimos estatisticamente semelhantes). O aumento do fígado observado no grupo CP pode ter ocorrido pela necessidade de metabolização da ciclofosfamida que é ativada nesse órgão (Colvin et al., 1976; Michael et al., 2007; Veal et al., 2016). Essa metabolização pode requerer hipertrofia e hiperplasia do órgão (Michael et al., 2007;). Além disso, o órgão pode apresentar processo inflamatório característico da grande atividade e da hepatomegalia induzida pela ciclofosfamida (Faro et al., 2009).

Frente ao exposto considera-se que a maior contribuição desse artigo para a área é apresentar um protocolo de explante de células tronco mesenquimais de fragmento de tecido adiposo viável para ser transladado para pesquisas clínicas devido ao seu baixo custo e simplicidade, e comprovar, histologicamente, que a terapia celular melhora a qualidade do epitélio germinativo em modelo pré-clínico.

## 5. Referências

- Abioduna AO, Esthera OO, Christiana IE, Aderonkea AK, Ayowole OA (2016). Neuro-endocrine effects of aqueous extract of *Amaranthus viridis* (Linn.) leaf in male Wistar rat model of cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. *Toxicology Reports*. 3:608-619.
- Acero L (2015). Internationalization, science and health: global regenerative medicine and the parallel markets. *Ciencia & saude coletiva*. 20:433-440.
- Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B (2002). Chronic Cyclophosphamide Treatment Alters the Expression of Stress Response Genes in Rat Male Germ Cells. *Biology of Reproduction*. 66:1024-1032.
- Barton TS, Wyrobek HJ, Hill FS, Robaire B, Hales BF (2003). Numerical Chromosomal Abnormalities in Rat Epididymal Spermatozoa Following Chronic Cyclophosphamide Exposure. *Biology of Reproduction*. 69:1150-1157.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 68:394-424.
- Cakici C, Buyrukcu B, Duruksu G, Haliloglu AH, Aksoy A, Nisjk A, Uludag O, Ustun H, Subasj C, Karaoz E (2013). Recovery of Fertility in Azoospermia Rats after Injection of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Sperm Generation. *BioMed Research International*. 2013:1-18.
- Chen H, Tang QL, Wu XY, Xie LC, Lin LM, Ho GY, Ma L (2015). Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. *Molecular Medicine Reports*. 12:819-828.
- Choy JT, Brannigan RE (2013). The determination of reproductive safety in men during and after cancer treatment. *Fertility and sterility*. 100:1187-1191.
- Colvin M, Brundrett RB, Kan MNN, Jardine I, Fenselau C (1976). Alkylating Properties of Phosphoramidate Mustard. *Cancer Research*. 36:1121-1126.
- Condrigton AM, Hales BF, Robaire B (2007). Chronic Cyclophosphamide Exposure Alters the Profile of Rat Sperm Nuclear Matrix Proteins. *Biology of Reproduction*. 77:303-311.
- Delbès G, Vaisheva F, Luu T, Marcona L, Hales BF, Robaire B (2010). Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin

lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. *Reproductive Toxicology*. 29:332-338.

Dong X, Yang L, Wang H (2017). miR-520 promotes DNA-damage-induced trophoblast cell apoptosis by targeting PARP1 in recurrent spontaneous abortion (RSA). *Gynecological Endocrinology*. 33:274-278.

Dornelas LF, de Castro Duarte NM, de Castro Magalhães L (2015). Neuropsychomotor developmental delay: conceptual map, term definitions, uses and limitations. *Revista Paulista de Pediatria (English Edition)*. 33:88-103.

Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST (2006). Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*. 222:60-70.

Eom YW, Shim KY, Baik SK (2015). Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *The Korean journal of internal medicine*. 30:580.

Faro AM, Daleck CR, Santana AE, Nardi AB, Motta FR, Eurides D (2009). Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. estudo experimental. *Ars Veterinaria*. 24:01-08.

Fenselau C, Kan MNN, Rao SS, Myles A, Friedman OM, Colvin M (1977). Identification of Aldophosphamide as a Metabolite of Cyclophosphamide in Vitro and in Vivo in Humans. *Cancer Research*. 37:2538-2543.

Hayashi M, Sofuni T, Ishidate JrM (1990). An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. *Mutation Research*. 120:241–247.

Hermeto LC, Derossi R, Oliveira RJ, Pesarini JR, Antonioli-Silva ACMB, Jardim PHA, Santana ÁE, Deffune E, Rinaldi JC, Justulin LA (2016). Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. *Genetics and Molecular Research*. 15: 1-14.

IARC (2012). A review of human carcinogens – Part A: Pharmaceuticals. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 100:63-90.

Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*. 1:2-25.

- Kadam P, Ntemou E, Baert Y, Van Laere S, Van Saen D, Goossens E (2018). Co-transplantation of mesenchymal stem cells improves spermatogonial stem cell transplantation efficiency in mice. *Stem cell research & therapy*. 9:317.
- Leroy C, Rigot JM, Leroy M, Decanter C, Le Mapihan K, Parent AS, Guillou ACL, Yakoub-Agha I, Dharancy S, Noel C, Vantyghem MC (2015). Immunosuppressive drugs and fertility. *Orphanet journal of rare diseases* 10: 136.
- Liu M, Hales BF, Robaire B (2014). Effects of Four Chemotherapeutic Agents, Bleomycin, Etoposide, Cisplatin, and Cyclophosphamide, on DNA Damage and Telomeres in a Mouse Spermatogonial Cell Line. *Biology of Reproduction*. 90: 1-10.
- Lue Y, Erkila K, Liu PY, MA K, Wang C, Hikim AS, Swerdloff RS (2007). Fate of Bone Marrow Stem Cells Transplanted into the Testis - Potential Implication for Men with Testicular Failure. *The American Journal of Pathology*. 170:899-908.
- Luz PLD (2018). Medicina translacional-nova fronteira. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*. 28.
- Mason C, Dunnill P (2008). A brief definition of regenerative medicine.
- Mehrabani D, Hassanshashi MAM, Tamadon A, Zare S, Keshavarz S, Rahmanifar F, Dianatpour M, Khodabandeh Z, Jahromi IR, Tanideh N, Ramzi M, Aqababa H, Kuhi-Hoseinabadi O (2015). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 8:103-110.
- Meligy FY, Abo Elgheed AT, Alghareeb SM (2019). Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on Cisplatin induced testicular damage in adult male albino rat. *Ultrastructural Pathology*. 1-28.
- Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, Johnson JK, Schafer K (2007). Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. *Toxicologic Pathology*. 35:742-750.
- Monfesi M, Fereydouni B, Rohani L, Talaei T (2013). Mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of sterile rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*. 11:537-544.

Monteiro BS, Santos BSD, Almeida BLD, Hiura E, Fiorio WAB, Valdetaro GP, Campagnol, D. (2018). Adipose tissue derived mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of ischemia/reperfusion induced acute kidney injury in rats. Application route and therapeutic window. *Acta cirurgica brasileira*. 33:1016-1026.

Morrison M (2012). The dynamics of contemporary expectations in regenerative medicine. *Biosocieties*. 7:3-22.

Nargesi AA., Lerman LO, Eirin A (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for kidney repair: current status and looming challenges. *Stem cell research & therapy*. 8:273.

Oliveira RJ, Kanno TYN, Salles MJS, Lourenã OACS, Ribeiro LR, Freiria GA, Matiazi HJO, Mantovani MS, Silva AF (2009). Effects of the polysaccharide  $\beta$ -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 53:164-73.

Onaolapo AY, Oladipo BP, Onaolapo OJ (2017). Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. *Andrologia*. 3:1-10.

Oveissi V, Ram M, Bahramsoltani R, Ebrahimi F, Rahimi R, Naseri R, Belwahl T, Devkotas HP, Abbasabad Z, Farzaei MH (2019). Medicinal plants and their isolated phytochemicals for the management of chemotherapy-induced neuropathy: therapeutic targets and clinical perspective. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.

Patschan D, Buschmann I, Ritter O, Kribben A (2018). Cell-Based Therapies in Acute Kidney Injury (AKI). *Kidney and Blood Pressure Research*. 43:673-681.

Pesarini JR, de Oliveira EJT, Pessatto LR, Rabacow APM, Camassola M, dos Santos BP, Barros ME, Cantero WB, Antonioli-Silva ACMB, Oliveira RJ (2018). Calcitriol combined with calcium chloride causes apoptosis in undifferentiated adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells, but this effect decreases during adipogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 108:914-924.

Pesarini JR, Oliveira RJ, Pessatto LR, Antonioli-Silva ACMB, Felicidade I, Nardi NB, Camassola M, Mantovani MS, Ribeiro LR (2017). Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern

Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 91:861-871.

Pınar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M (2018). The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 97:1486-1492.

Pontes LDB, Antunes YPPV, Bugano DDG, Karnakis T, Giglio AD, Kaliks RA (2014). Prevalence of renal insufficiency in elderly cancer patients in a tertiary cancer center. *Einstein (São Paulo)*. 12:300-303.

Ravegnini G, Zolezzi Moraga J, Maffei F, Musti M, Zenesini C, Simeon V, Sammarini G, Festi D, Hrelia P, Angelini S (2015). Simultaneous analysis of SEPT9 promoter methylation status, micronuclei frequency, and folate-related gene polymorphisms: The potential for a novel blood-based colorectal cancer biomarker. *International journal of molecular sciences*. 16:28486-28497.

Rengasamy P (2017). Congenital malformations attributed to prenatal exposure to cyclophosphamide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 17:1211-1227.

Rezvanfar MA, Sadrhanlou RA, Ahmadi A, Shojaei-sadee H, Rezvanfar MA, Mohammadirad A, Salehnia A, Abdollahi M (2008). Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Human & Experimental Toxicology*. 27:901-910.

Roth JM, Restani RG, Goncalves TT, Sphor SL, Ness AB, Martino-Roth MG, Garcias GL (2008). Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genet Mol Res*. 7:433-43.

Schweich LC, de Oliveira EJT, Pesarini JR, Hermeto LC, Camassola M, Nardi NB, Brochado TM, Antonioli-Silva ACMB, Oliveira RJ (2017). All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 96:1267-1274.

Sladek NE (1988). Metabolism of Oxazasphosphorines. *Pharmacology & Therapeutics*. 37:301-355.

Smith JF, Yango P, Altman E, Choudhry S, Poelzl A, Zamah AM, Rosen M, Klatsky PC, Tran ND (2014). Testicular niche required for human spermatogonial stem cell expansion. *Stem cells translational medicine*. 3:1043-1054.

Souza ML, Rodrigues FSM, Ferraz RRN, Deus RB, Malagutti W, Barnabé AS, Francisco L, Nunes RS (2010). Incidência de insuficiência renal aguda e crônica como complicações de pacientes internados em uma unidade de terapia intensiva. *Conscientiae Saúde*. 9:456-461.

Sun X, Shan A, Wei Z, Xu B (2018). Intravenous mesenchymal stem cell-derived exosomes ameliorate myocardial inflammation in the dilated cardiomyopathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 503:2611-2618.

Torchinsky A, Savion S, Gorivodsky M, Shepshelovich J, Zaslavsky Z, Fein A, Toder V (1995). Cyclophosphamide-induced teratogenesis in ICR mice: the role of apoptosis. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis*. 15:79-190.

Tripathi DN, Jena GB (2008). Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*. 248:96-103.

Urt-Filho A, Oliveira RJ, Hermeto LC, Pesarini JR, David ND, Cantero WDB, Falcão G, Marks G, Antonioli-Silva ACMB (2016). Mesenchymal stem cell therapy promotes the improvement and recovery of renal function in a preclinical model. *Genetics and molecular biology*. 39:290-299.

Vacchelli E, Aranda F, Eggermont A, Galon J, Sautès-Fridman C, Cremer I, Zitvogel L, Kroemer G, Galluzzi L (2014). Trial Watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology*. 3:e27878. 1

VAISHEVA F, DELBÈS G, HALES BF, ROBAIRE B (2007). Effects of the Chemotherapeutic Agents for Non-Hodgkin Lymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (CHOP), on the Male Rat Reproductive System and Progeny Outcome. *Journal of Andrology*. 28:578-587.

Veal GJ, Cole M, Chinnaswamy G, Sludden J, Jamieson D, Errigton J, Malik G, Hill CR, Chamberlain T, Boddy AV (2016). Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Cancer*. 55:56-64.

Wolf S, Barton D, Kottschade L, Grothey A, Loprinzi C (2008). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prevention and treatment strategies. *European journal of cancer*. 44:1507-1515.

Woudstra L, Krijnen PAJ, Bogaards SJP, Meinster E, Emmens RW, Kokhuis TJA, Bollen IAE, Baltzer H, Baart SMT, Parbhudayal R, Helder MN, van Hinsbergh VWM, Musters RJP, de Jong N, Kamp O, Niessen HWM, van Dijk A, Juffermans LJM (2016). Development of a new therapeutic technique to direct stem cells to the infarcted heart using targeted microbubbles: StemBells. *Stem cell research*. 17:6-15.

Wultsch G, Nersesyan A, Kundi M, Jakse R, Beham A, Wagner KH, Knasmueller S (2014). The sensitivity of biomarkers for genotoxicity and acute cytotoxicity in nasal and buccal cells of welders. *International journal of hygiene and environmental health*. 217:492-498.

Yamamoto K, Kurata Y, Inoue Y, Adachi M, Tsuneto M, Miake J, Ogino K, Ninomiya H, Yoshida A, Shirayoshi Y, Suyama Y, Yagi S, Nishimura M, Yamamoto K, Hisatome I (2018). Pretreatment with an angiotensin II receptor blocker abolished ameliorating actions of adipose-derived stem cell sheets on cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Regenerative therapy*. 9:79-88.

Yang RF, Liu TH, Zhao K, Xiong CL (2014). Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. *Asian journal of andrology*. 16:698.

ZHANG D, LIU X, PENG J, HE D, LIN T, ZHU J, LI X, ZHANG Y, WEI G (2014). Potential Spermatogenesis Recovery with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in an Azoospermic Rat Model. *International Journal of Molecular Sciences*. 15:13151-13165.

ZHANG J, TIAN Q, ZHOU SF (2006). Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Current Drug Therapy*. 1:55-84.

Zheng W, Yang Y, Sequeira RC, Bishop CE, Atala A, Gu Z, Zhao W (2019). Effects of Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem/stromal Cells on Liver Diseases. *Curr Stem Cell Res Ther*.

**Anexo A - Documento de aprovação emitido pelo Cômite de Ética no Uso de Animais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada “Efeito do tratamento de células tronco mesenquimais em camundongos *Swiss* expostos ao quimioterápico ciclofosfamida: avaliação da fertilidade, desempenho reprodutivo, gestação e progênie”, registrada com o nº 920/2017, sob a responsabilidade de **Rodrigo Juliano Oliveira** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 1ª reunião ordinária do dia 21/02/2018.

| FINALIDADE              | ( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Vigência da autorização | 1º/03/2018 a 1º/12/2020              |
| Espécie/Linhagem/Raça   | <i>Mus musculus</i> / Swiss          |
| Nº de animais           | Machos 130 / Fêmeas 240 = 370        |
| Peso/Idade              | 35g / 10 semanas                     |
| Sexo                    | Machos e Fêmeas                      |
| Origem                  | Biotério Central/INBIO/UFMS          |

  
Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS  
Campo Grande, 23 de fevereiro de 2018.