

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

NEIMAR CORRÊA SEVERO

**TRATAMENTO DA ADENITE VESICULAR (VESICULITE) EM TOUROS COM
APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS**

Uberlândia

2024

NEIMAR CORRÊA SEVERO

**TRATAMENTO DA ADENITE VESICULAR (VESICULITE) EM TOUROS
COM APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal

ORIENTADORA: Profa. Dra. Renata Lançoni

COORIENTADORA: Profa. Dra. Teresinha

Inês de Assumpção

Uberlândia

2024

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

S498 2024	<p>Severo, Neimar Corrêa, 1959- TRATAMENTO DA ADENITE VESICULAR (VESICULITE) EM TOUROS COM APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS [recurso eletrônico] / Neimar Corrêa Severo. - 2024.</p> <p>Orientadora: Renata Lançoni. Coorientadora: Teresinha Inês de Assumpção. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2024.209 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Lançoni, Renata, 1990-, (Orient.). II. Assumpção, Teresinha Inês de, 1965-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias

BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 04/2024				
Data:	09 DE FEVEREIRO DE 2024	Hora de início:	09:00	Hora de encerramento:	11:15
Matrícula do Discente:	12212MEV010				
Nome do Discente:	NEIMAR CORREA SEVERO				
Título do Trabalho:	TRATAMENTO DA ADENITE VESICULAR (VESICULITE) EM TOUROS COM APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS DIRETAMENTE NAS GLÂNDULAS AFETADAS				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	FATORES AMBIENTAIS E NUTRICIONAIS QUE AFETAM A EFICIÊNCIA PRODUTIVA E REPRODUTIVA DE ANIMAIS DE INTERESSE ZOOTÉCNICO				

Reuniu-se no Anfiteatro do Hospital Veterinário, bloco 2S, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Maurício Antônio Silva Peixer (Bio Reprodução Animal); Gustavo Ferrer Carneiro (UFRPE); Renata Lançoni (FAMEV/UFU), orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Renata Lançoni, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de **Mestre**.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos,

conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Renata Lançoni, Professor(a) do Magistério Superior**, em 09/02/2024, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Ferrer Carneiro, Usuário Externo**, em 10/02/2024, às 09:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mauricio Antônio Silva Peixer, Usuário Externo**, em 14/02/2024, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5099661** e o código CRC **C8BF14D2**.

Dedico este trabalho a minha filha Ana Clara e minha esposa Danieli, pelo estímulo, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiro ao Grande Arquiteto do Universo que permitiu a minha caminhada até aqui. Em segundo, mas não menos importante a minha família, Danieli minha esposa e Ana Clara minha filha que sempre estiveram ao meu lado neste desafio.

A Profa. Dra. Renata Lançoni, minha orientadora por me aceitar como seu primeiro orientado de mestrado na UFU. Seu companheirismo, ensinamentos e presença em todos os trabalhos de campo foram fundamentais para que esta dissertação se tornasse realidade.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Teresinha Inês de Assumpção pelo incentivo e "puxões de orelha" que sempre pleitearam a nossa amizade de longa data. Enfrentamos muitos desafios ao longo dos anos com a ABRAA, nossa "associação do coração".

Muito obrigado a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da UFU pelos ensinamentos e pela paciência em especial a nossa coordenadora do curso Profa. Dra. Ricarda Maria dos Santos.

Aos meus colegas do PPGVET da UFU que conheci ao longo destes dois anos de aprendizado e que foram muito importantes pela ajuda no meu mestrado.

Aos colegas dos Centros de Coleta e Processamento de Sêmen que contribuíram com os doadores de sêmen para este projeto, Adolfo, Ricardo e Ana Clara da ABS Pecplan, André Crespilho e Gustavo da Central Bela Vista e José Roberto e Patrícia da Seleon, meu muito obrigado!

Um agradecimento muito especial aos colegas Maurício Peixer e Patrícia Mallard da BIO CELL por doarem as células-tronco mensenquimais para o projeto!

As empresas Chácara Naviraí, Rancho da Matinha e EAO Agropecuária por permitirem o uso de seus animais para este experimento, muito obrigado!

Aos meus filhos Patrícia e Veríssimo pelo incentivo e aos meus irmãos Marco Aurélio e Leliane por sempre torcerem pelo meu sucesso, muito obrigado!

Aos touros doadores de sêmen das centrais de coleta, meu respeito. Vocês foram a razão do meu trabalho ao longo de 40 anos de dedicação e trouxeram alegria e amor à minha vida. Verdadeiras fontes de aprendizado, resiliência e inspiração.

Enfim, meu muito obrigado a todos os que contribuíram de alguma maneira para meu sucesso pessoal e profissional.

Agradeço imensamente!

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Esquema resumido da produção de células-tronco mesenquimais.	17
Figura 2.	Representação esquemática do sistema reprodutor do touro.	19
Figura 3.	Imagem dos órgãos genitais internos do touro.	20
Figura 4.	Imagem ultrassonográfica de uma glândula vesicular (direita) afetada com adenite vesicular com edema e fibrose.	23
Figura 5.	Presença de leucócitos degenerados (piócitos) na lamina de sêmen puro em aumento de 200 vezes.	27

Artigo 1. Tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros com aplicação de células-tronco mesenquimais alogênicas diretamente nas glândulas afetadas

Figura 1.	Imagem dos pontos de tricotomia para anestesia epidural baixa (A) e da punção com as agulhas longas para aplicação das CTMs (B).	41
Figura 2.	Aplicação das CTMs pela punção com agulha longa (30 cm) na fossa isquiorretal esquerda (A) com seringa preparada com as CTMs diluídas (B).	41
Figura 3.	Representação esquemática da aplicação das CTMs com agulha longa (30 cm) na glândula vesicular esquerda.	43
Gráfico 1	Gráfico 1. Médias (\pm E.P.M) da motilidade pré-congelação (A), motilidade pós-descongelação (B) e número de doses congeladas por colheita (C) antes e após o tratamento com células tronco mesenquimais em touros com adenite vesicular.	44
Gráfico 2	Gráfico 2. Número total de doses congeladas em cinco colheitas pré-tratamento e cinco colheitas após o tratamento com CTMs em touros com adenite vesicular.	45

Artigo 2. Protocolo para o diagnóstico da adenite vesicular em touro

Figura 1.	Imagem dos órgãos genitais internos do touro. 1. Par de ampolas dos ductos deferentes; 2. Par de glândulas vesiculares; 3. Corpo da próstata; 4. Próstata disseminada coberta pelo músculo uretral; 5. Par de glândulas bulbo-uretrais.	54
-----------	---	----

Figura 2.	Presença de piócitos (leucócitos degenerados) na lâmina de sêmen <i>in natura</i> (setas).	55
Figura 3.	Imagem do teste CMT mostrando a gelatinização da amostra de sêmen, positiva para vesiculite na raquete.	56
Figura 4.	Panóptico rápido para coloração da lâmina para contagem de leucócitos no sêmen, começando pelo fixador 1 e terminando na lavagem final.	57
Figura 5.	Lâmina corada pelo Panoptico rápido. Presença de muitos leucócitos polimorfonucleares na amostra. Aumento de 100x.	57
Figura 6.	Presença de dois leucócitos degenerados (seta) e um macrófago (ponta de seta) na lâmina de sêmen puro, corado com Rosa Bengala (aumento de 400x).	58
Figura 7.	Na imagem A, vista dorsal das glândulas sexuais acessórias (glândulas vesiculares na seta azul) mostrando o local de posicionamento do transdutor para medidas ultrassonográficas (ampolas na seta preta). Na imagem B, glândula vesicular sem alteração.	60
Figura 8.	Imagem ultrassonográfica de uma ampola do ducto deferente espessada em touro com adenite vesicular bilateral (círculo em vermelho).	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais bactérias encontradas em ejaculados de touros com adenite vesicular	24
-----------	--	----

Artigo 1. Tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros com aplicação de células-tronco mesenquimais alogênicas diretamente nas glândulas afetadas

Tabela 1.	Médias (\pm E.P.M) das características analisadas em touros com adenite vesicular antes e após tratamento com células tronco mesenquimais.	43
Tabela 2.	Comparação descritiva das glândulas vesiculares por palpação transretal, ultrassonografia e presença de piócitos na lâmina.	44

Artigo 2. Protocolo para o diagnóstico da adenite vesicular em touro

Tabela 1.	Classificação do CMT para avaliação do sêmen suspeito de vesiculite.	54
Tabela 2.	Classificação do aspecto das glândulas vesiculares através da ultrassonografia.	58
Tabela 3.	Itens de avaliação das glândulas vesiculares e das ampolas dos ductos deferentes.	59
Tabela 4.	Classificação do aspecto das ampolas através da ultrassonografia.	60

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	OBJETIVOS.....	18
	2.1. Objetivo geral	
	2.2. Objetivos específicos	
3.	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
	3.1. Anatomia do sistema reprodutor do touro.....	19
	3.2. Adenite vesicular.....	20
	3.2.1. Etiologia	
	3.2.2. Epidemiologia	
	3.2.3. Patogenia	
	3.2.4. Diagnóstico da adenite vesicular	
	3.2.5. Tratamentos convencionais	
	3.2.6. Tratamento com injeção intraglandular de antibióticos	
	3.3. Ação das CTMs na modulação da inflamação.....	31
	REFERÊNCIAS.....	32
	ANEXOS	
	ARTIGO 1: Tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros com aplicação de células-tronco mesenquimais alogênicas.....	37
	ARTIGO 2: Protocolo para o diagnóstico da adenite vesicular em touro.....	52
	CEUA.....	64

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares no tratamento da vesiculite. Doze touros que apresentaram vesiculite aguda e crônica com duas ou mais recidivas, foram selecionados em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), pela presença de pus no ejaculado, piócitos na lâmina de avaliação de motilidade e vigor, reagente ao teste do California Mastite Teste - CMT (uma cruz e acima) e presença de leucócitos em lâmina corada pelo Panóptico Rápido com mais de 5 polimorfonucleares (PMN) por campo. O exame ultrassonográfico das glândulas vesiculares foi realizado, porém, os sinais clínicos foram definitivos para o diagnóstico. O método de injeção intraglandular de CTMs proposto foi a aplicação através da fossa isquiorretal com agulha longa de 30 a 35cm e guia de 25 a 30cm de comprimento diretamente na glândula vesicular afetada. As CTMs foram cultivadas e congeladas no laboratório Bio Cell Terapia Celular® (Brasília, DF, Brasil) e descongeladas e preparadas por lavagem e centrifugação para a injeção intraglandular no dia da aplicação. Foram injetadas um total de 3×10^6 CTMs por glândula vesicular. As variáveis analisadas foram: volume do ejaculado (mL), motilidade em % e vigor de 1 a 5 em microscopia de luz, concentração (milhões de espermatozoides/mL), número de espermatozoides totais no ejaculado, morfologia espermática avaliada em contraste de fase com aumento de 1000 vezes. CMT utilizando 0,5 mL de sêmen mais 2,5 mL do reagente (classificação de 0 a 3 cruces), ultrassonografia das glândulas vesiculares avaliadas em escala de 1 a 5, sendo 1- normais, 2- com áreas hiperecogênicas, 3- com áreas hiperecogênicas e paredes espessadas, 4- com áreas hiperecogênicas, paredes espessadas e cistos, 5- com áreas hiperecogênicas, paredes espessadas, cistos e presença de fibrose e crescimento de colônias bacterianas na espermiocultura do sêmen congelado quando possível. Todas as variáveis foram mensuradas antes e após o tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0.05$) os dados foram transformados ou retirados os outliers e reavaliados. O “Teste T” foi aplicado para identificar diferenças estatísticas entre as variáveis antes do tratamento e após o tratamento. Além disso, foi realizado o teste da binomial para a comparação de 2 proporções pelo teste qui-quadrado do programa R. A probabilidade de $P \leq 0.05$ foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Foram observadas melhora na motilidade inicial

de $60,09 \pm 4,8$ para $69,89 \pm 4,6$ ($P < 0,05$), bem como na motilidade pós descongelamento (PD) de $26,26 \pm 6,77$ para $42,5 \pm 5,99$ ($P < 0,05$). O número de doses produzidas aumentou significativamente após o tratamento com as CTMs, de $95,61 \pm 23,31$ unidades para $337,84 \pm 67,75$ unidades ($P < 0,05$) por ejaculado. O número de piócitos observados por campo passou de $5,83 \pm 0,48$ para zero, demonstrando a recuperação das glândulas vesiculares inflamadas. Com base nos resultados apresentados, concluiu-se que a aplicação de 3×10^6 CTMs nas glândulas vesiculares de touros com vesiculite é segura e eficiente, pois melhorou vários parâmetros avaliados nesta pesquisa, principalmente a produção de doses de sêmen por ejaculado.

Palavras-chave: bovino, glândulas vesiculares, inflamação, células-tronco, reprodução

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effects of applying allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) directly to inflamed vesicular glands in the treatment of vesiculitis. Twelve bulls that presented acute and chronic vesiculitis with two or more recurrences were selected at Semen Collection and Processing Centers (SCPC), based on the presence of a thick yellowish/greenish opaque liquid produced in infected tissue, consisting of dead white blood cells and bacteria with tissue debris and serum. In the ejaculate, pyocytes on the motility and vigor evaluation slide, reagent to the California test Mastitis Test - CMT (one cross and above) and presence of leukocytes on a slide stained by Rapid Panoptico with more than 5 polymorphonuclear cells (PMN) for field. Ultrasound examination of the vesicular glands was performed, however, the clinical signs were definitive for the diagnosis. The proposed method of intraglandular injection of MSCs was application through the ischioanal fossae with a long needle measuring 30 to 35cm and a guide measuring 25 to 30cm in length directly into the affected vesicular gland. The MSCs were cultured and frozen in the Bio Cell Terapia Celular® laboratory (Brasília, DF, Brazil) and thawed and prepared by washing and centrifugation for intraglandular injection on the day of application. A total of 3×10^6 MSCs were injected for vesicular gland. The variables analyzed were: ejaculate volume (mL), motility in % and vigor from 1 to 5 in light microscopy, concentration (millions of sperm/mL), number of total sperm in the ejaculate, sperm morphology evaluated in contrast phase with 1000 times magnification. CMT using 0.5 mL of semen plus 2.5 mL of reagent (classification from 0 to 3 crosses), ultrasound of the vesicular glands evaluated on a scale of 1 to 5, with 1 being normal, 2 - with hyperechogenic areas, 3 - with hyperechogenic areas and thickened walls, 4 - with hyperechogenic areas, thickened walls and cysts, 5 - with hyperechogenic areas, thickened walls, cysts and presence of fibrosis and growth of bacterial colonies in sperm culture from frozen semen when possible. All variables were measured before and after treatment. Data were evaluated for normality of residuals using the Shapiro-Wilk test. When the normality of the test was significant ($P < 0.05$) the data were transformed or outliers were removed and reevaluated. The "T-Test" was applied to identify statistical differences between variables before treatment and after treatment. Furthermore, the binomial test was performed to compare 2 proportions using the chi-square test of the R program. The probability of $P \leq 0.05$ was considered a significant difference. Data were

presented as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Improvements were observed in initial motility from 60.09 ± 4.8 to 69.89 ± 4.6 ($P < 0.05$), as well as in post-thaw motility (PD) from 26.26 ± 6.77 to 42.5 ± 5.99 ($P < 0.05$). The number of doses produced increased significantly after treatment with MSCs, from 95.61 ± 23.31 units to 337.84 ± 67.75 units ($P < 0.05$) for ejaculate. The number of piocytes observed for field went from 5.83 ± 0.48 to zero, demonstrating the recovery of the inflamed vesicular glands. Based on the results presented, it was concluded that the application of 3×10^6 MSCs in the vesicular glands of bulls with vesiculitis is safe and efficient, as it improved several parameters evaluated in this research, mainly the production of semen doses for ejaculate.

Keywords: bovine, vesicular glands, inflammation, stem cells, reproduction

1. INTRODUÇÃO

A eficiência econômica de um Centro de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS) está associada diretamente à capacidade produtiva e reprodutiva dos touros doadores de sêmen, portanto a dependência de reprodutores clinicamente aptos interfere diretamente na produtividade total de um CCPS.

O Brasil possui em torno de 3000 doadores de sêmen alojados em CCPS espalhados em diferentes regiões. A incidência de problemas reprodutivos diretamente ligados a produção de sêmen não tem levantamento estatístico confiável no país. Poucos pesquisadores em centros de coleta publicam dados de problemas reprodutivos em doadores de sêmen (Crespilho, 2021).

A adenite vesicular também conhecida como vesiculite é um dos mais frustrantes problemas reprodutivos encontrados em CCPS. Tentativas de diagnóstico, tratamento e manejo podem conduzir a resultados frustrantes e, muitos touros afetados são refratários aos vários regimes de tratamentos. Portanto, um touro com adenite vesicular pode estar em boa condição física, libido satisfatória e boa capacidade de produção de espermatozoides, mas o sêmen não pode ser processado para congelamento devido a presença de pus no ejaculado (Monke, 1984).

Os sintomas clínicos da adenite vesicular são semelhantes a peritonite de início agudo, com desconforto, tenesmo ou claudicação dos membros posteriores; no entanto, geralmente não apresenta sinais clínicos evidentes além das alterações do ejaculado com a presença de muitos polimorfonucleares (>5 PMN por cada campo contado), com predominância de neutrófilos (Kozioł; Armstrong, 2018). A maior viscosidade do líquido vesicular ou alterações no seu pH pode reduzir a motilidade espermática.

Os tratamentos utilizados na adenite vesicular são fundamentados na aplicação de antibióticos e antiinflamatórios não esteróides de uso parenteral, porém, a resposta ao tratamento é muito variável (Martinez; Barth, 2007).

As células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas caracterizam-se como uma população de células multipotentes produzidas a partir de vários tecidos orgânicos, como por exemplo medula óssea, cordão umbilical, placenta e tecido adiposo (Pittenger et al., 2019). Portanto, a partir do cultivo celular de qualquer um desses tecidos podem ser isoladas e cultivadas as CTMs (Malard; Brunel, 2021) (Quadro 1).

As CTMs expressam muitas moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento,

permitindo interações com demais células-alvo. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, estimulando a angiogênese e a mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (Caplan, 2009).

As CTMs derivadas de tecido adiposo são as comumente utilizadas nos laboratórios de biotecnologia pela facilidade de acesso e obtenção de grande quantidade de tecido para multiplicação celular. Elas possuem uma grande plasticidade e passam pelo processo de diferenciação celular com maior facilidade e produção, podendo se diferenciar em células da linhagem mesodérmica (Gimble et al., 2007).

A terapia celular é considerada uma das áreas mais promissoras da medicina regenerativa, inclusive na área reprodutiva de acordo com Pieri et al. (2019). O efeito terapêutico das CTMs no tratamento de afecções reprodutivas é atribuído à sua capacidade de produzir fatores de crescimento e outras quimiocinas (Murphy et al., 2013). As CTMs possuem diversos efeitos indiretos nos tecidos lesados que contribuem para a sua recuperação e regeneração (Karp; Teo, 2009). Vários experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito das CTMs alogênicas derivadas de tecido adiposo bovino, na recuperação de afecções de ovários de vacas doadoras de oócitos (Malard et al., 2020; Peixer et al., 2023).

Baseado nesses experimentos em ovários de vacas e endométrio de éguas, foi proposto a utilização de CTMs alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares afetadas por inflamação e/ou lesões crônicas. Este é o primeiro relato do uso de CTMs alogênicas aplicadas via fossa ísquio-retal direto nas glândulas vesiculares para o tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros de CCPS.

Figura 1. Esquema resumido da produção de Células-Tronco Mesenquimais (CTMs).



Fonte: acervo BIO CELL (modificado pelo autor).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo deste experimento proposto foi observar a influência da aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares inflamadas de touros para avaliar a eficácia desta terapia na recuperação e na prevenção de recidivas desta afecção.

2.2. Objetivos Específicos

A partir dos resultados obtidos neste experimento foi possível:

- a) Avaliar a possibilidade da aplicação de CTMs diretamente nas glândulas vesiculares com lesões crônicas de vesiculite como tratamento dessa afecção.
- b) Verificar se a técnica de aplicação pararectal das CTMs causa sequelas no local de manipulação externa e nas glândulas vesiculares.
- c) Correlacionar os achados clínicos aos dados obtidos pela avaliação ultrassonográfica, pela avaliação do California Mastite Teste (CMT), pela coloração com corante Panoptico Rápido e pela palpação transretal com a adenite vesicular.
- d) Recomendar a aplicação de CTMs em touros de CCPS para tratamento da adenite vesicular, uma das patologias reprodutivas que mais prejuízo causa para a indústria da inseminação artificial.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Anatomia do Sistema Reprodutor do Touro

O sistema reprodutor do touro é constituído pelos órgãos genitais externos localizados na região inguinal e os órgãos genitais internos localizados na pelve. Suas principais funções são produção, armazenamento e transporte dos espermatozoides, produção e secreção de hormônios testiculares e produção do líquido seminal. Este sistema é constituído por um par de testículos, um par de ductos epididimários (formado pela cabeça, corpo e cauda dos epidídimos), ductos deferentes, uretra, glândulas sexuais acessórias (glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais) e pênis (Mullins; Saacke, 2003) (Figura 1).

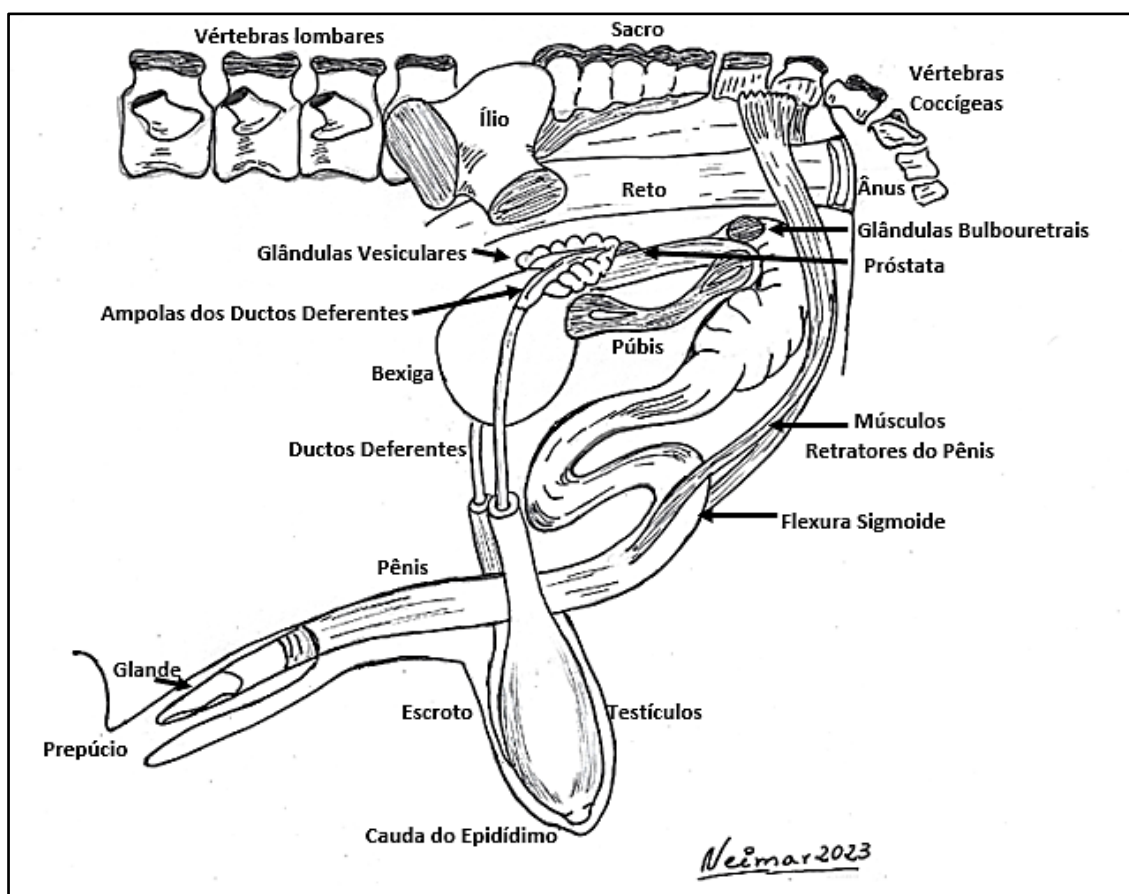


Figura 2. Representação esquemática do sistema reprodutor do touro. Fonte: arquivo do autor.

A glândula vesicular apresenta forma lobulada com uma cápsula muscular e trabéculas importantes para a ejeção do conteúdo secretor. A glândula e os ductos são revestidos por epitélios secretores cuboide a colunares baixos e são caracterizados no

bulbo por um lúmen bastante espaçoso que fornece capacidade de armazenamento para os fluidos vesiculares (Mullins; Saacke, 2003). No touro, as glândulas vesiculares são as principais glândulas sexuais acessórias que contribuem com o maior volume do plasma seminal do ejaculado (Figura 2).

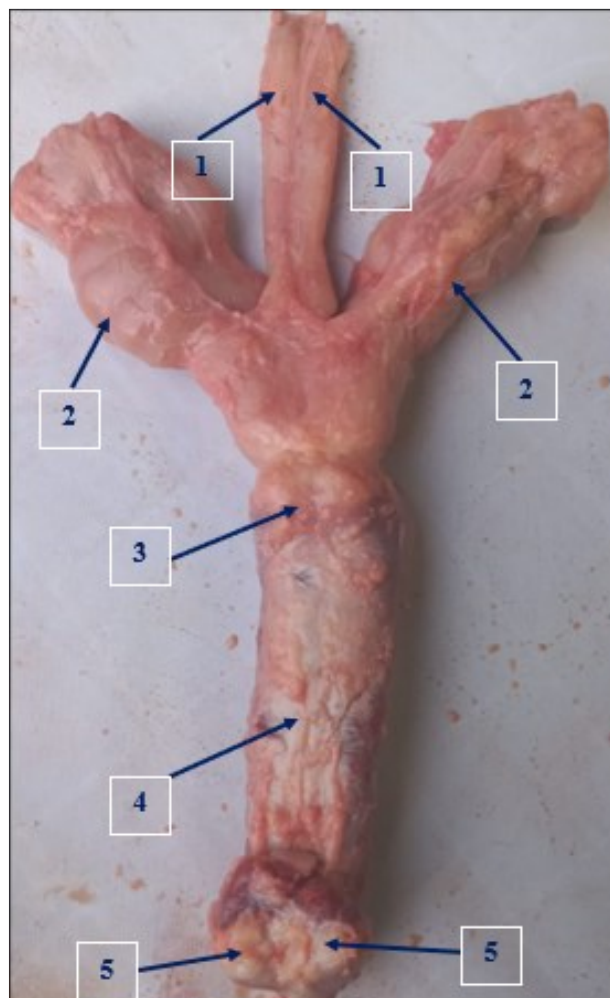


Figura 3. Imagem dos órgãos genitais internos do touro. 1. Par de ampolas dos ductos deferentes; 2. Par de glândulas vesiculares; 3. Corpo da próstata; 4. Próstata disseminada coberta pelo músculo uretral; 5. Par de glândulas bulbo-uretrais. Fonte: arquivo do autor.

3.2. Adenite Vesicular

A adenite vesicular, também chamada de vesiculite, é a infecção mais comum das glândulas sexuais acessórias do touro, encontrada tanto no exame andrológico de campo como nos doadores de sêmen dos CCPS (Rohret, 2008).

Os sintomas clínicos da adenite vesicular são semelhantes a peritonite de início agudo, no entanto, geralmente não apresenta sinais clínicos evidentes além das alterações

no ejaculado, com a presença de muitos leucócitos polimorfonucleares (>5 PMN por cada campo contado), com predominância de neutrófilos (Koziol; Armstrong, 2018). A maior viscosidade do líquido seminal ou alterações no seu pH pode reduzir a motilidade espermática. A sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelamento no sêmen criopreservado é reduzida na presença da adenite vesicular (Cavaliere; Van Camp, 1997).

Muitos touros afetados são refratários para os vários tipos de tratamentos o que resulta na cronificação da afecção. Subsequentemente, um touro com adenite vesicular crônica pode estar em uma boa condição física, frequentemente com libido satisfatória e capacidade de produção de espermatozoides, mas o sêmen não pode ser processado para congelamento devido a presença de pus e fibrina (Martinez; Barth, 2007).

O quadro clínico possui etiologia de difícil definição, sendo a infecção bacteriana considerada a causa mais frequente, porém a causa primária é indefinida. Os principais agentes infecciosos identificados por espermiocultura como agente etiológico da vesiculite no Canadá foram *Trueperella pyogenes*, *Histophilus somni*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma bovinogenitalium*, *Mycoplasma bovis*, *Ureaplasma diversum* e outras bactérias de origem comum em processos inflamatórios (Martinez et al., 2008).

A vesiculite apresenta sinais clínicos inespecíficos ou ausentes, o que torna seu diagnóstico precoce ainda mais complexo na rotina. Esta enfermidade pode levar a redução da fertilidade de touros em monta natural e touros doadores de sêmen em CCPS. O diagnóstico, tratamento e manejo da vesiculite pode conduzir a terapêutica mais adequada em casos agudos, porém em casos crônicos os resultados são frustrantes e muitos touros afetados são refratários aos diferentes tratamentos (Rovay et al., 2008).

Tipicamente o problema da adenite vesicular vai além do que tem sido descrita na literatura (Cavaliere; Van Camp, 1997; Monke, 1984). A adenite vesicular é uma inflamação da glândula vesicular, porém, ela é reconhecida como a forma mais comum de inflamação do trato reprodutivo dos touros por muito tempo (Dagartz et al., 1987). O processo inflamatório associado com a adenite vesicular frequentemente resulta em leucospermia, ou seja, a presença de leucócitos na forma de pus no sêmen (Monke, 1984). Sendo assim, o problema é realmente a formação do pus no sêmen. Um segundo problema igualmente importante é identificar a origem da infecção. O terceiro problema é como conduzir o tratamento da glândula vesicular infectada - tratar com antibióticos, usar anti-inflamatórios, remover cirurgicamente ou fazer a ablação química da glândula? E o último problema é definir o destino do touro afetado – aguardar a recuperação clínica, através de

tratamentos com antibióticos e anti-inflamatórios, aguardar a recuperação espontânea ou, descartar o animal?

A incidência de adenite vesicular é muito variável, sendo reportada em torno de 1% em muitos rebanhos, podendo atingir até 49% em outros (Gilbert; Fales, 1996). Considera-se que a infecção causa lesões nas glândulas vesiculares dos touros doadores de sêmen a uma taxa de pelo menos um touro para 500 touros-ano em CCPS (Rohret, 2008). Alguns casos de adenite vesicular podem não produzir alterações grosseiras nas glândulas que possam ser palpadas prontamente. Isso é indicado pelo fato de que pesquisas rotineiras de matadouros, cujo diagnóstico é baseado no exame histopatológico da glândula, demonstraram maior prevalência da inflamação do que normalmente é encontrada no exame clínico, de 9% no estudo realizado por Bagshaw e Ladds (1974) na Austrália.

A primeira indicação de uma possível adenite vesicular em touros de um CCPS, é a presença de leucócitos degenerados (piócitos) no ejaculado (Rohret, 2008). Neste caso, deve se descartar condições inflamatórias do pênis e do prepúcio como origem dos piócitos. Uma vez que essa fonte tenha sido descartada, uma avaliação cuidadosa do trato reprodutivo deve ser realizada. Na adenite vesicular, a palpação retal da genitália pélvica poderá revelar que uma ou ambas as glândulas vesiculares podem apresentar-se firmes e fibróticas. Elas podem estar aumentadas e com lobulações menos distintas do que o normal. Raramente, uma glândula inflamada poderá ter um abscesso palpável. A aplicação da pressão digital na glândula afetada, pode provocar uma leve resposta de sensibilidade, embora seja comum a ausência de dor. Em casos mais crônicos, pode haver aderências das glândulas vesiculares aos tecidos da pelve (Monke, 1984).

O critério para o diagnóstico clínico da adenite vesicular é subjetivo e é dependente quase inteiramente da palpação retal e da habilidade para detectar pequenas variações da normalidade. A adenite vesicular frequentemente pode estar acompanhada por inflamação de outras estruturas como os testículos, epidídimos, ampolas, próstata, glândulas bulbouretrais e uretra. Os métodos inexatos de diagnóstico e a inflamação dos tecidos adjacentes podem muitas vezes explicar falhas no tratamento (Rovay et al., 2008).

O uso do exame ultrassonográfico transretal como meio de diagnóstico da adenite vesicular é o método de eleição, principalmente em casos subclínicos. As glândulas vesiculares normais têm uma cápsula distinta com lóbulos homoganeamente ecogênicos, com pequenas vesículas anecoicas cheias de líquido no centro e um ducto coletor

anecóico distinto. No entanto, em touros com adenite vesicular, a glândula está aumentada, com perda de estrutura lobular, paredes firmes e espessadas e aumento da ecogenicidade, com a presença de cavidades cheias de líquido dentro da glândula (Gnemmi; Lefebvre, 2009) (Figura 3).



Figura 4. Imagem ultrassonográfica de uma glândula vesicular (direita) afetada por adenite vesicular com edema e fibrose (seta). Fonte: arquivo do autor.

3.2.1. Etiologia

Gilbert (1996) cita que em áreas onde a brucelose é endêmica, ela pode ser a principal causa da adenite vesicular. Em outras situações os agentes mais encontrados nos casos de vesiculite foram a *Trueperella pyogenes* e o *Histophilus somni*. Não está claro se estes microrganismos são os principais responsáveis pela doença ou se são simplesmente invasores oportunistas após a formação do quadro inflamatório. A *T. pyogenes*, bactéria gram-positiva, imóvel, anaeróbica facultativa, tem fraca penetração nos tecidos e isso sugere que ela é apenas um oportunista que invade as glândulas já lesadas por algum outro mecanismo (Martinez et al, 2008). O *H. somni*, bactéria gram-negativa, imóvel, anaeróbica facultativa, é comum em abscessos de origem hepática (Rovay et al., 2008). Alguns vírus foram isolados de casos de adenite vesicular, entre eles o Enterovírus, a Rinotraqueite Infecciosa Bovina (IBR) e outros não caracterizados como o Epivag Africano (Cavalieri; Van Camp, 1997). Pode ocorrer um tipo degenerativo de adenite vesicular causada por vírus. A doença autoimune foi sugerida como uma explicação alternativa para este tipo de infecção (Bagshaw; Ladds, 1974).

Em pesquisas posteriores, atenção foi dada aos agentes *Mycoplasma bovinogenitalium*, *Mycoplasma bovis* e *Ureaplasma diversum* como agentes etiológicos de importância em touros (Rovay et al., 2008). Também foram isoladas *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp*, *Proteus mirabilis*, *Actinobacillus seminis*, *Actinobacillus bovis*, *Norcadia farcinica* e *Salmonela spp* (Rovay et al., 2008). Em muitos casos de adenite vesicular, o agente infeccioso escapa da identificação. Somados aos efeitos diretos na reprodução, a doença é uma óbvia manifestação de uma séria e complexa síndrome que inclui infecções em outras áreas da genitália, incluindo infecções em órgãos subjacentes como rúmen, fígado e peritônio (Dagartz et al., 1987).

Tabela 1. Principais bacterias encontradas em ejaculados de touros com adenite vesicular.

FAMÍLIA	GÊNERO
Brucellaceae	<i>Brucella abortus*</i>
Actinomycetaceae	<i>Trueperella pyogenes</i>
Pasteurellaceae	<i>Histophilus somni</i>
Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma spp.</i>
Mycoplasmataceae	<i>Ureaplasma diversum</i>
Chlamydiaceae	<i>Chlamydophila psittaci</i>
Moraxellaceae	<i>Acinetobacter sp</i>
Streptococcaceae	<i>Streptococcus sp.</i>
Pasteurellaceae	<i>Pasteurella sp.</i>
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium sp.</i>
Aeromonadaceae	<i>Aeromonas hydrophila**</i>

Fonte: adaptado de Gilbert, 1996*; Moro et al., 1999**; Martinez et al., 2008; Rovay et al., 2008.

3.2.2. Epidemiologia

A incidência da adenite vesicular parece ser bimodal. Os touros infectados são predominantemente jovens, com menos de 2 anos de idade ou touros acima de 9 anos de idade (Gilbert, 1996). A infecção é mais comum em touros criados e alimentados intensivamente do que em touros criados de forma extensiva (Rovay et al., 2008). A incidência reportada pela pesquisa varia de 2-5% em animais adultos, porém, em certos rebanhos pode ser extremamente alta, variando de 5-50% em grupos de touros jovens (Cavalieri; Van Camp, 1997). A cura espontânea é frequentemente encontrada em touros jovens, mas muito baixa em touros velhos. O curso e o resultado da infecção não são influenciados pelo tratamento com antibióticos (Gilbert, 1996). A adenite vesicular tem sido diagnosticada tanto em touros de leite como de corte e parece não haver diferença na

prevalência entre touros *Bos indicus* e *Bos taurus* mantidos em ambientes semelhantes (Weber et al., 1988).

3.2.3. Patogenia

Ainda não está completamente esclarecido porque alguns touros são mais suscetíveis do que outros em desenvolver a adenite vesicular. A alta incidência em touros jovens sugere uma associação com o desenvolvimento puberal. As glândulas vesiculares continuam a crescer após a puberdade e seu tamanho está relacionado com o tamanho testicular e o perímetro escrotal (Salisbury et al., 1978). Blom (1979) sugeriu que anomalias do desenvolvimento como a aplasia segmentar ou aberrações na anatomia do colículo seminal, podem contribuir para a suscetibilidade à infecção da glândula vesicular. Em um rebanho com uma alta incidência da doença, Gilbert (1996) após dissecar animais infectados e não infectados, não foi capaz de encontrar anormalidades do desenvolvimento do colículo como uma causa da doença.

Ainda há discordância quanto à importância da disseminação da infecção por vias ascendente, descendente, hematogênica e direta na patogênese da vesiculite. A maioria dos touros afetados não tem crescimento bacteriano ou viral da uretra, o que implica que a infecção ascendente não é importante. Exceto no caso de brucelose, quando a infecção pode acompanhar ou seguir uma epidídimo-orquite, a infecção descendente não é considerada importante também. Parece provável que a maioria das infecções seja por via hematogênica. A propagação direta de um abscesso abdominal como a onfaloflebite também é possível. De fato, se touros jovens são infectados por via intraperitoneal, exsudam dezenas de pequenos abscessos que podem se acumular na bolsa genitourinária, uma possível fonte de infecção (Galloway, 1964).

Em touros jovens confinados, a doença foi associada com dietas de alta energia (Cavalieri; Van Camp, 1997). Este tipo de dieta predispõe ao desenvolvimento de acidose ruminal, seguida por ruminite e bacteremia. A *T. pyogenes* é a bactéria gram-positiva mais comum isolada de abscessos hepáticos em animais confinados e, também comumente isolada de infecções na glândula vesicular (Dagartz et al., 1987). Em contrapartida, culturas de bactérias e vírus de glândulas inflamadas frequentemente dão resultado negativo (Barth, 2013).

Em touros adultos que apresentam adenite vesicular crônica ou na fase final de recuperação do tecido glandular é comum a presença de fibrina e debris celulares no

ejaculado. Esta observação é frequente em touros doadores de sêmen em CCPS e foi observado em alguns touros tratados neste experimento.

A adenite vesicular é a causa mais comum de leucócitos presentes no sêmen. A presença de leucócitos deve ser diferenciada de células epiteliais, células germinativas ou espermatozoides imaturos que podem ser liberados no sêmen quando ocorre degeneração testicular. O uso de corantes como o Diff-Quick™ ou o Panóptico rápido em esfregaços de sêmen ajudam a diferenciar esses dois tipos de células (Meronek, 2002).

Uma função importante do plasma seminal é modular as respostas imunológicas e em várias espécies ele deprime a função dos linfócitos e de outras células imunes. A origem dessa função imunomoduladora pode ser em parte devido a secreção das glândulas vesiculares (Gilbert, 1996). Se essa secreção glandular for tóxica para os neutrófilos, parece que isso afetará a persistência da infecção na glândula, quaisquer que fossem os meios de infecção. O plasma seminal bovino exerce um efeito profundamente prejudicial na função e integridade dos neutrófilos. Provavelmente, esse é um fator importante na patogênese da adenite vesicular (Gilbert, 1996).

Depois que a infecção é estabelecida na glândula, é provável que as suas secreções impeçam a função eficaz dos neutrófilos, essenciais na defesa contra os agentes da doença. Se for possível encontrar maneiras de controlar, temporariamente, a secreção de fatores prejudiciais, isso pode ser muito útil no tratamento da adenite vesicular, que normalmente é muito resistente ao tratamento clínico (Gilbert; Fale, 1996).

3.2.4. Diagnóstico da Adenite Vesicular

O diagnóstico da adenite vesicular é realizado através da avaliação andrológica do touro suspeito, através da palpação das glândulas sexuais acessórias por via transretal e pela avaliação ultrassonográfica. A avaliação visual do ejaculado é o primeiro indicador da alteração do sêmen contaminado por piócitos, através do exame entre lâmina e lamínula examinada em microscópio com aumento de 100 a 200 vezes (Barth, 2013).

A presença de piócitos na lâmina (leucócitos degenerados) é um indicativo de adenite vesicular. Ao avaliar a motilidade/vigor do sêmen puro (sem a diluição inicial) em aumento de 200 vezes de preferência, a presença de 5 ou mais leucócitos por campo já é um indicativo de infecção (Zart et al., 2014). Deve-se avaliar em torno de 5 campos por lâmina corada pelo Panóptico rápido. Essa infecção pode ser originada em qualquer parte do sistema reprodutivo (epidídimos, ampolas, próstata, uretra, pênis), porém, é mais

comum da glândula vesicular. O aspecto do piócito na lâmina é de um ponto refringente maior que a cabeça do espermatozoide (Figura 4).



Figura 5. Presença de leucócitos degenerados (piócitos) na lâmina (seta) no sêmen puro em aumento de 200 vezes. Fonte: arquivo do autor.

Em casos positivos para piócitos, o uso do teste do California Mastite Teste (CMT) para avaliar o nível de contaminação por leucócitos, utilizando 0,5mL de sêmen mais 2,5mL do reagente CMT em placa utilizada para teste de mastite é recomendável (Leite, 1983). A contagem de leucócitos por campo em lâmina corada pelo Diff Quick™ ou pelo Panótico rápido também pode ser utilizado para avaliar o nível de contaminação do ejaculado (Meronek, 2002; Zart et al., 2014).

O sêmen de touros acometidos pela vesiculite pode apresentar alterações no aspecto como aumento da viscosidade, pela presença de exsudato purulento e fibrina, sendo importante nesses casos descartar infecções no pênis e prepúcio (Hull; Vogel, 2008). Na avaliação microscópica do sêmen é observada presença de leucócitos degenerados e o sêmen pode apresentar queda da motilidade espermática e do vigor, com aumento do pH seminal. Não há comprometimento da concentração e da morfologia espermática (Cavalieri; Van camp, 1997).

Durante a palpação transretal é possível perceber a ocorrência de mudanças na forma e no tamanho das glândulas comprometidas, com assimetria, alteração de consistência dos lóbulos que se tornam mais firmes e fibróticos e com menos lobulações

do que uma glândula normal. Essas alterações podem ser uni ou bilaterais e, em alguns casos junto com alterações nas ampolas dos ductos deferentes. Quando a vesiculite se torna crônica podem ser observadas aderências aos tecidos adjacentes como o reto com a presença de abscessos palpáveis. Sinais de dor ao realizar pressão digital das vesículas também são observados (Hull; Vogel, 2008).

Em touros acometidos pela adenite vesicular, as glândulas vesiculares são visualizadas na ultrassonografia com aumento de ecogenicidade, alterações de tamanho e contornos, áreas hiperecogênicas, espessamento da parede glandular, visualizada como estruturas hiperecóicas, perda de delimitação e irregularidades em seu contorno (Gnemmi & Lefebvre, 2009; Oliveira et al., 2018) (Figura 3).

3.2.5. Tratamentos Convencionais

Na maioria dos casos de touros doadores de sêmen o melhor tratamento é a aplicação de antibióticos cuja ação nas glândulas vesiculares é muito específica como a tulatromicina e a oxitetraciclina (Romano et al., 2022a; 2022b). A associação do antibiótico com um antiinflamatório não esteróide como o flunixin meglumine e o meloxicam (Rohret, 2008) reduzem o edema glandular. Coletar o animal com frequência de duas a quatro vezes por semana ajuda a eliminar o pus das glândulas esvaziando os ductos (Rohret, 2008). Em geral, o uso de antibióticos não específicos normalmente não é eficaz, mas é feito como tentativa de tratamento. Em grupos grandes de touros contaminados por vesiculite, os antibióticos podem ser dados na alimentação com uma programação de uma semana de tratamento e três semanas de intervalo, repetindo mais uma semana de tratamento (Rohret, 2008).

A cultura do sêmen para identificar organismos específicos geralmente não é eficaz porque o sêmen também está contaminado pelas bactérias da uretra e bainha prepucial. Quando for realizada, colher a amostra após a limpeza do prepúcio e da uretra e utilizar o cateterismo apropriado da uretra, aumentando a sensibilidade de uma amostra seminal para identificar as bactérias presentes aumentando a eficácia do tratamento com antibióticos (Rovay et al., 2008).

A injeção de agentes esclerosantes como o formaldeído a 4% dentro da glândula vesicular foi utilizada por Waguespack et al. (2004). O agente esclerosante causa irritação local e inflamação nos tecidos injetados e, essa inflamação geralmente dura de duas a quatro semanas e pode ser extensa (Hull; Monke, 1992). É muito importante que a injeção

do agente esclerosante seja feita dentro da base da glândula, porque a injeção nos tecidos circundantes pode levar a consequências desastrosas. A injeção do agente na base da glândula produz resultados variáveis (Monke, 1984). Mudanças no pH do sêmen acompanhada por baixa qualidade seminal foi observado após a injeção do agente esclerosante (Hull; Monke, 1992).

O uso de antibióticos injetáveis é usado rotineiramente para tratar touros de forma individual. A disponibilidade de antibióticos para tratamento desses casos de adenite vesicular é pequena e é difícil definir qual o mais efetivo. No entanto, ultimamente, alguns veterinários recomendam o uso dos mais novos antibióticos injetáveis que duram até três dias de ação para evitar ter que tratar os touros diariamente, como o florfenicol, tilmicosina e tulatromicina. As drogas de escolha mais recentes parecem ser a tulatromicina e a oxitetraciclina de ação prolongada (Romano et al., 2022a; 2022b).

Na rotina de tratamentos da adenite vesicular o protocolo utiliza antibiótico mais anti-inflamatório, com uma aplicação de tulatromicina injetável a 10%, na dose de 1,0ml/40kg de peso por via subcutânea, com duas aplicações com 5 dias de intervalo. Associado ao antibiótico aplicamos meloxicam injetável a 2%, na dose de 0,5mg/kg de peso via intramuscular, com aplicações a cada 24 horas por 4 dias. Alguns autores recomendam o uso da flunixin meglumine por 3 dias (Rohre, 2008), mantendo o touro em coleta 2 vezes por semana. Não é recomendado massagear as glândulas vesiculares para não provocar maiores lesões locais.

A recuperação espontânea ocorre geralmente em touros jovens até 18 meses e, complica os esforços na avaliação dos tratamentos. A maioria dos touros jovens com adenite vesicular aguda parece responder favoravelmente à antibioticoterapia sistêmica de amplo espectro se a dosagem e a duração do tratamento forem adequadas. Sugere-se que os antibióticos escolhidos tenham alta solubilidade lipídica, baixa ligação às proteínas e pH mais básico que o fluido seminal (Koziol; Armstrong, 2018).

A tulatromicina e a tilmicosina foram eficazes para o tratamento da adenite vesicular em um relato (Rovay et al., 2008). Esses dois antibióticos foram estudados com base em resultados experimentais anteriores do tecido da glândula vesicular *in vitro*, bem como evidências de que ambos se acumulam em macrófagos e neutrófilos e são subsequentemente liberados lentamente a partir desses tipos de células (Koziol; Armstrong, 2018). Ambos foram úteis no tratamento das adenites, incluindo alguns casos suspeitos de infecção crônica (Rovay et al., 2008). Pode-se considerar que um touro se

recuperou da doença quando o ejaculado continha menos de um neutrófilo por 5 campos microscópicos em aumento de 1000 vezes (Koziol; Armstrong, 2018).

As desvantagens da aplicação de antibióticos via parenteral no tratamento da vesiculite são as resistências bacterianas frequentes em bovinos (Romano et al., 2022b), a dificuldade de identificação do verdadeiro agente infectante da glândula vesicular por cultura bacteriológica (Martínez et al., 2008) e as recidivas comuns nesses tratamentos que levam a formação da vesiculite crônica com tecido cicatricial dentro do epitélio glandular (Rovay et al., 2008).

A aplicação de antibióticos diretamente nas glândulas vesiculares afetadas foi realizada por Martinez et al., (2008) e Rovay et al., (2008), com resultados promissores.

3.2.6. Tratamento com Injeção Intraglandular de Antibióticos

Com o objetivo de determinar a eficácia do tratamento intraglandular com antibióticos em touros de corte, Martinez et al., (2008) e Rovay et al., (2008) desenvolveram dois estudos para avaliar essa técnica. Os touros foram tratados com volume de 6 ml de uma solução de antibiótico contendo 10% da dose recomendada pelos fabricantes de penicilina, ceftiofur ou oxitetraciclina, diretamente na glândula vesicular. A preparação do local do procedimento foi realizada primeiro com a tricotomia da fossa isquiorretal e áreas adjacentes e depois com a desinfecção da área preparada com iodopovidine. A seguir foi realizada a anestesia epidural com 6 ml de lidocaína a 2% e infiltração do local da punção com 5 ml de lidocaína a 2%. Para realizar o procedimento de injeção, foi realizado um pequeno corte de 4 mm com bisturi no ponto da punção e, utilizado uma guia de metal com 30 cm e uma agulha de calibre 18 x 35 cm de comprimento na fossa isquiorretal. Os touros foram acompanhados por 6 semanas e todos se recuperaram com o tratamento entre 3 a 6 semanas com ceftiofur.

Em resumo, os experimentos indicaram que a injeção intraglandular de ceftiofur via fossa isquiorretal em touros de corte, foi uma rota segura e efetiva no tratamento da adenite vesicular. O ultrassom deve ser utilizado para avaliar as glândulas antes e depois do tratamento com antibióticos. A avaliação da glândula por palpação retal é útil para acompanhamento dos efeitos do tratamento. Manter o touro em coleta é importante para avaliar o progresso da recuperação.

As desvantagens deste tratamento diretamente na glândula vesicular se resume as recidivas por falhas da ação dos antibióticos e também a resistência a determinados antimicrobianos, difíceis de estabelecer na clínica (Rovay et al., 2008).

3.3. Ação das CTMs na Modulação da Inflamação

A terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTMs) é considerada uma das áreas mais promissoras da medicina regenerativa, sendo utilizada em diversos ensaios clínicos em humanos (Murphy et al., 2013; Pittenger et al., 2019) e animais (Cequier et al., 2021; Malard; Brunel, 2021). Na área reprodutiva de grandes animais houve um interesse crescente no uso das CTMs na pesquisa de avaliações clínicas que envolvem processos inflamatórios e degenerativos de ovários e útero tanto em bovinos como equinos (Falomo et al., 2015; Pieri et al., 2019).

As CTMs alogênicas caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes produzidas a partir de vários tecidos orgânicos, como por exemplo tecido adiposo (Gimble et al., 2007). As CTMs expressam muitas moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, estimulando a angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (Caplan, 2009).

O efeito terapêutico das CTMs no tratamento de afecções reprodutivas é atribuído à sua capacidade de produzir fatores de crescimento e outras quimiocinas mediadoras e reguladoras da inflamação e do recrutamento de leucócitos (Murphy et al., 2013). As CTMs possuem diversos efeitos indiretos nos tecidos lesados que contribuem para a sua recuperação e regeneração melhorando o fluxo sanguíneo e estimulando a mitose de células de regeneração (Karp; Teo, 2009).

Vários experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito das CTMs alogênicas na recuperação de lesões de ovários de vacas doadoras de oócitos (Malard et al., 2020; Peixer et al., 2023) e do endométrio de éguas (Falomo et al., 2015; Navarrete et al., 2020; Tongu et al., 2021) com resultados promissores.

O método de injeção intraglandular de antibióticos foi proposto por Martinez et al. (2008) e Rovay et al. (2008) como tratamento para adenite vesicular. Graças aos resultados obtidos pelos citados autores, foi proposto nesse trabalho de dissertação a

aplicação de CTMs alogênicas em substituição aos antibióticos diretamente nas glândulas vesiculares afetadas pela vesiculite em touros de CCPS.

REFERÊNCIAS

BAGSHAW, PA; LADDS, PW. A study of the accessory sex glands of bulls in abattoirs in Northern Australia. **Aust Vet J**, 50, 489–495, 1974. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1974.tb14053.x>

BARTH, AD. Bull Breeding Soundness. 3rd edition. **Saskatoon:Western Canadian Association of Bovine Practitioners**, 162:2013.

BLOM, E.: Studies on seminal vesiculitis in the bull. II. Malformations of the pelvic genital organs as a possible predisposing factor in the pathogenesis of seminal vesiculitis. **Nord Vet Med**, 31:241-250; 1979.

CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J Pathol**, 217(2):318-324, 2009. <https://doi.org/10.1002/path.2469>

CAVALIERI, J; VAN CAMP, SD. Bovine Seminal Vesiculitis. A Review. **Vet Clin North Amer Food Anim**, 13(2):233-41, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30337-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30337-6)

CEQUIER, A; SANZ, C; RODELLAR, C; BARRACHINA, L. The Usefulness of Mesenchymal Stem Cells beyond the Musculoskeletal System in Horses. **Animals**, 11:931, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11040931>

CRESPILHO, AM. Produção de sêmen em regime de central – Muito além do espermograma. **Rev Bras Reprod Anim**, 45(4):566-573, 2021. <https://doi.org/10.21451/1809-3000.RBRA2021.076>

CURRY, PT; ATHERTON, RW. Seminal vesicles: Development, secretory products, and fertility. **Arch Androl**, 25(2):107-113, 1990. <https://doi.org/10.3109/01485019008987601>

DAGARTZ, DA; MORTIMER, RG; BALL, L. Vesicular adenitis of bulls: a review. **Theriogenology**, 28(4):513-521, 1987. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90256-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90256-1)

- FALAMO, ME; FERRONI, L; TOCCO, I; GARDIN, C; ZAVAN, B. Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. **BioMed Res. Int.**, 2015, Article ID 141485, 6 pp. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/141485>
- GALLOWAY, DB. A study of bulls with the clinical signs of seminal vesiculitis. **Acta Vet Scand**, 5:2(Suppl, 2), 1964.
- GILBERT, RO. Mechanisms of pathogenesis of vesiculitis in bulls. **Proc 16th Techn Conf AI Reprod**, 74-79, 1996.
- GILBERT, RO; FALES, MH. The effect of bovine seminal plasma on the function and integrity of bovine neutrophils. **Theriogenology**, 46:649-658, 1996. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00216-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00216-6)
- GIMBLE, JM; KATZ, AJ; BRUNNELL, BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circ Res**, 100(9):1249-1260, 2007. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
- GNEMMI, R; LEVEBVRE, RC. Ultrasound Imaging of the Bull Reproductive Tract: An Important Field of Expertise for Veterinarians. **Vet Clin North Am Food Anim**, 25(3): 767–779, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.006>
- HULL, BL; VOGEL, SR. Seminal vesiculitis. **Vet Clin North Am Food Anim**, 24(2):267-272, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2008.02.006>
- KARP, JM; TEO, GSL. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. **Cell Stem Cell**, 4:206-216, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.02.001>
- KOZIOL, JH; ARMSTRONG, CL. Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls. 2nd edition, **Society for Theriogenology**, USA, 147:2018.
- LEITE, RC. Emprego do California Mastite Teste CMT para diagnóstico precoce da vesiculite de reprodutores bovino. **Tese mestrado, UFMG, Belo Horizonte**, 1983.
- MALARD, PF; BRUNEL, HSS. Células-Tronco na Medicina Veterinária. Princípios básicos para a utilização da terapia celular na rotina clínica. 1^a edição, **Bio Cell, Brasília**, 132:2021.

MALARD, PF; PEIXER, MAS; GRAZIA, JG; BRUNEL, HSS; FERES, LF; VILLARROEL, CL; SIQUEIRA, LGB; DODE, MAN; POGUE, R; VIANA, JHM; CARVALHO, JR. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64810-x>

MARTINEZ, M.F.; BARTH, A.D. Early detection and treatment of vesicular adenitis in bulls. **Anim Reprod Sci**, 101:252–6, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.009>

MARTINEZ, M.F.; ARTEAGA, A.A.; BARTH, A.D. Intraglandular injection of antibiotics for the treatment of vesicular adenitis in bulls. **Anim Reprod Sci**, 104(2-4):201-211, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.009>

MERONEK, J. Cells other than sperm (C.O.T.S.). **Proc 19th Techn Conf AI Reprod**, 56-57, 2002.

MONKE, DR. Bovine Seminal Vesiculitis. **Proc 10th Techn Conf AI Reprod**, 54-61, 1984.

MORO, EMP; WEISS, RDN; FRIEDRICH, RSC; VARGAS, AC; WEISS, LHN; NUNES, MP. Aeromonas hydrophila isolated from cases of bovine seminal vesiculitis in south Brazil. **J Vet Diagn Invest**, 11:189–191, 1999. <https://doi.org/10.1177/104063879901100217>

MULLINS, KJ; SAACKE, RG. Illustrated Anatomy of the Bovine Male and Female Reproductive Tracts. **NAAB-Germinal Dimension, Inc.**, 79:2003.

MURPHY, MB; MONCIVAIS, K; CAPLAN, AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental and Molecular Medicine**, 45, e54, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.94>

NAVARRETE, F; SARAIVA, F; CISTERNA, G; ROJAS, F; SILVA, PP; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L; ROJAS, D; CABEZAS, J; MANÇANARES, ACF; CASTRO, FO. Assessment of the anti-inflammatory and engraftment potential of horse endometrial and adipose mesenchymal stem cells in an in vivo model of post breeding induced endometritis. **Theriogenology**, 155:33-42, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.010>

OLIVEIRA, RPL; FAVARO, PC; PEREIRA, GR; BARCA JR,FA; BORGES, MHF; GALDIROLI, VH; KOETZ JR, C. Ultrassonografia no auxílio do diagnóstico de vesiculite seminal em toros de corte. **Pesq Vet Bras**, 38(6):1038-1042, 2018.

<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5414>

PEIXER, MA; MALARD, P; BRUNEL, HSS; VIANA, J; ALENCAR-SILVA, T; CARVALHO, J; POGUE, R. Clinical safety of bovine intra-ovarian application of allogeneic mesenchymal stem cells. **Braz J Sci**, 2(9):87-97, 2023.

<https://doi.org/10.14295/bjs.v2i9.383>

PIERI, NCG; SOUZA, AF; BOTIGELLI, RC; MACHADO, LS; AMBROSIO, CE; MARTINS, DS; ANDRADE, AFCA; MEIRELLES, FV; HYTTEL, P; BRESSAN, FF. Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. **Vet Res Com**, 43:7–16, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11259-019-9744-6>

PITTENGER, MF; MACKAY, AM; BECK, SC; JAISWAL, RK; DOUGLAS, R; MOSCA, JD; MOORMAN, MA; SIMONETTI, DW; CRAIG, S; MARSHAK, DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284:143-147, 1999. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>

ROHRET, P. Seminal vesiculitis. **Proc 22nd Techn Conf AI Reprod**, 65-66, 2008.

ROMANO, JE; BARBAROSSA, A; PAGLIUCA, G; VILLADÓNIGA, GB; GAZZOTTI, T; MISLEI, B; ZIRONI, E; MARI, G. Pharmacokinetics of tulathromycin on plasma and semen of beef bulls. **Theriogenology**, 177:50-55, 2022a.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.09.019>

ROMANO, JE; BARBAROSSA, A; PAGLIUCA, G; VILLADÓNIGA, GB; GAZZOTTI, T; MISLEI, B; ZIRONI, E; MARI, G. Pharmacokinetics of oxytetracycline long-acting on plasma and semen of beef bulls. **Theriogenology**, 182:21-26, 2022b.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.032>

ROVAY, H; BARTH, AD; CHIRINO-TREJO, M; MARTINEZ, MF. Update on Treatment of Vesiculitis in Bull. **Theriogenology**, 70(3):495–503, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.002>

SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L.; LODGE, J.R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. 2nd edition, **W.H. Freeman & Co.**, San Francisco, 798:1978.

TONGU, E.A.O.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; ALVARENGA, M.L.; MONTEIRO, A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. **Theriogenology**, 169:1-8, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.019>

WAGUESPACK, RW; SCHUMACHER, J; WOLFE, DF; SARTIN, EA; HEATH, A. Preliminary study to evaluation the feasibility of chemical ablation of the seminal vesicles in bull. **AABP Proceedings**, 37:295-296, 2004.

WEBER, JA; HILT, CJ; WOODS, GL. Ultrasonographic appearance of bull accessory sex glands. **Theriogenology**, 29(6):1347-1355, 1988. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90015-5)

ZART, AL; JURGIELEWICZ, VCL; FERNANDES, CE. Seminal leucocytary profile in beef bulls. **Reprod Dom Anim**, 49:719–724, 2014. <https://doi.org/10.1111/rda.12353>

ANEXO A. Artigo 1

Tratamento da adenite vesicular (vesiculite) em touros com aplicação de células-tronco mesenquimais alogênicas

Neimar Correa Severo¹, Teresinha Inês de Assumpção¹, Maurício Antônio Silva Peixer², Marcelo da Cunha Xavier², Renata Lançoni^{1*}

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU), Uberlândia, MG; ²BIO CELL Terapia Celular Ltda., Brasília, DF

*E-mail: ncsevero@gmail.com

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares inflamadas no tratamento da vesiculite. Doze touros que apresentaram vesiculite aguda e crônica com duas ou mais recidivas, foram selecionados em Centros de Coleta e Processamento de Sêmen (CCPS), pela presença de pus no sêmen, piócitos na lâmina de avaliação de motilidade e vigor, reagente ao teste do California Mastite Teste - CMT (uma cruz ou mais) e presença de leucócitos em lâmina corada pelo Panóptico Rápido com mais de 5 polimorfonucleares (PMN) por campo. O exame ultrassonográfico das glândulas vesiculares foi realizado, porém, os sinais clínicos foram definitivos para o diagnóstico. O método de injeção intraglandular de CTMs proposto foi a aplicação através da fossa isquiorretal com agulha longa de 30 a 35 cm e guia de 25 a 30 cm de comprimento diretamente na glândula vesicular afetada. As CTMs foram cultivadas e congeladas no laboratório BioCell Terapia Celular® (Brasília, DF, Brasil) e preparadas por lavagem e centrifugação para a injeção intraglandular no dia da aplicação. Foram injetadas 3×10^6 CTMs por glândula vesicular. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0.05$) os dados foram transformados ou retirados os outliers e reavaliados. O “Teste T” foi aplicado para identificar diferenças estatísticas entre as variáveis antes do tratamento e após o tratamento. Além disso, foi realizado o teste da binomial para a comparação de 2 proporções pelo teste qui-quadrado do programa R. A probabilidade de $P \leq 0.05$ foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Foram observadas melhora na motilidade inicial de $60,09 \pm 4,8$ para $69,89 \pm 4,6$ ($P < 0,05$), bem como na motilidade pós descongelação de $26,26 \pm 6,77$ para $42,5 \pm 5,99$ ($P < 0,05$). O número de doses produzidas aumentou

significativamente após o tratamento com as CTMs, de $95,61 \pm 23,31$ unidades para $337,84 \pm 67,75$ unidades ($P < 0,05$) por ejaculado. O número de piócitos observados por campo passou de $5,83 \pm 0,48$ para zero, demonstrando a recuperação das glândulas vesiculares inflamadas. Com base nos resultados apresentados, concluiu-se que a aplicação de 3×10^6 CTMs nas glândulas vesiculares de touros com vesiculite é segura e eficiente, pois melhorou vários parâmetros avaliados nesta pesquisa, principalmente a produção de doses de sêmen por ejaculado.

Palavras-chave: bovino, glândulas vesiculares, inflamação, células-tronco, reprodução

INTRODUÇÃO

A adenite vesicular ou vesiculite é um dos mais frequentes problemas reprodutivos encontrados em touros de campo e em CCPS. Tentativas de diagnóstico, tratamento e recuperação podem conduzir a resultados frustrantes e, muitos touros afetados são refratários aos vários regimes de tratamentos. Portanto, um touro com adenite vesicular pode estar em boa condição física, libido satisfatória e boa capacidade de produção de espermatozoides, mas o sêmen não pode ser processado para congelamento devido a presença de pus no ejaculado (Monke, 1984).

Os sintomas clínicos da adenite vesicular são semelhantes a peritonite de início agudo, com desconforto, tenesmo ou claudicação dos membros posteriores; no entanto, geralmente não apresenta sinais clínicos evidentes além das alterações do ejaculado com a presença de muitos leucócitos polimorfonucleares (>5 PMN por cada campo contado), com predominância de neutrófilos (Koziol & Armstrong, 2018). A maior viscosidade do líquido vesicular com alterações no seu pH pode reduzir a motilidade espermática (Cavalieri; Van Camp, 1997).

Os tratamentos utilizados na adenite vesicular são fundamentados na aplicação de antibióticos e antiinflamatórios não esteróides de uso parenteral, porém, a resposta ao tratamento é muito variável (Martinez & Barth, 2007), além do risco de resistência aos antimicrobianas.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas caracterizam-se como uma população de células multipotentes produzidas a partir de vários tecidos orgânicos, como medula óssea, cordão umbilical, placenta e tecido adiposo (Pittenger et al., 2019). Portanto, a partir do cultivo celular de qualquer um desses tecidos as CTMs podem ser isoladas e cultivadas (Malard; Brunel, 2021).

As CTMs expressam muitas moléculas bioativas como as moléculas de adesão as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células-alvo. Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, estimulando a angiogênese e a mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (Caplan, 2009).

As CTMs derivadas de tecido adiposo são as comumente utilizadas nos laboratórios de terapia celular pela facilidade de acesso e obtenção de grande quantidade de tecido para multiplicação celular. Elas possuem uma grande plasticidade e passam pelo processo de diferenciação celular com maior facilidade e produção, podendo se diferenciar em células da linhagem mesodérmica (Gimble et al, 2007).

A terapia celular é considerada uma das áreas mais promissoras da medicina regenerativa, inclusive na área reprodutiva de acordo com Pieri et al. (2019). O efeito terapêutico das CTMs no tratamento de afecções reprodutivas é atribuído à sua capacidade de produzir fatores de crescimento e outras quimiocinas bem como seus efeitos indiretos nos tecidos lesados que contribuem para a sua recuperação e regeneração (Murphy et al., 2013). Vários experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito das CTMs alogênicas derivadas de tecido adiposo, na recuperação de afecções de ovários de vacas doadoras de oócitos (Malard et al., 2020; Peixer et al., 2023) e de afecções no endométrio em éguas (Navarrete et al., 2020; Tongu et al., 2021).

Baseado nos experimentos em ovários de vacas e endométrio de éguas, foi proposta a utilização de CTMs alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares afetadas por inflamação e/ou lesões crônicas em touros para o tratamento e recuperação dos doadores de sêmen de CCPS.

MATERIAL E MÉTODOS

Os touros doadores de sêmen foram selecionados nos CCPS participantes do projeto de acordo com os procedimentos do exame andrológico de touros recomendados por Barth (2013) e Koziol & Armstrong (2018). O protocolo para o diagnóstico da adenite vesicular e triagem dos animais seguiu os procedimentos recomendados pela literatura para casos semelhantes de vesiculite (Dagartz et al., 1987; Cavalieri e Van Camp, 1997).

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e aprovado conforme protocolo nº 23117.051597/2022-62 de 23 de setembro de 2022 (Anexo C).

Delineamento Experimental

Para a realização deste projeto foi proposto o seguinte desenho experimental:

- a. **Seleção dos touros** – foram selecionados doze touros doadores de sêmen em CCPS com idade entre 3 a 12 anos que apresentaram recidiva ao tratamento para vesiculite com antibióticos e anti-inflamatórios parenterais e que eram importantes para a produção e comercialização de sêmen.
- b. **Células-Tronco Mesenquimais** – foram aplicadas 3 milhões de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas diretamente nas glândulas vesiculares. As CTMs foram fornecidas pelo laboratório Bio Cell Terapia Celular[®], Brasília, DF. Foram realizadas duas aplicações de CTMs com intervalo de 45 a 60 dias entre aplicações para os tratamentos.
- c. **Técnica de Aplicação** - seguiu os princípios desenvolvidos por Martinez et al. (2008) e Rovay et al. (2008) com modificações, para a aplicação de antibióticos nas glândulas vesiculares. Após tricotomia foram preparados os campos para aplicação da anestesia epidural baixa (figura 1, A) onde foram injetados 6 mL de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Lidovet[®], Bravet) por animal. Para a anestesia do local de punção na fossa isquiorretal foram aplicados 5 mL do mesmo anestésico em cada lado (figura 1, B). Após aguardar 10 minutos foram feitas as aplicações das CTMs (figuras 2 e 3). No local da punção foi realizado um pequeno corte com o bisturi de 1 cm de comprimento para a penetração da guia da agulha.
- d. **Avaliações pré e pós-tratamento** - foram avaliados os históricos de produção dos touros doadores antes da primeira aplicação das CTMs e após a segunda aplicação das CTMs intraglandular. Os parâmetros avaliados foram:
 - i. Volume ejaculado (mL), através da pesagem em balança de precisão tara com o peso do tubo coletor;
 - ii. Concentração de espermatozoides/mL ($\times 10^6$), em fotômetro calibrado para sêmen bovino, diluído 1:100 (3,640 mL de soro fisiológico mais 0,040 mL de sêmen puro e leitura direta em concentração/mL no equipamento (Accured[®] IMV Technologies, França);
 - iii. Concentração total de espermatozoides por ejaculado ($\times 10^9$), pela multiplicação do volume ejaculado vezes a concentração de espermatozoides por mL;
 - iv. Motilidade inicial, avaliada em microscópio com contraste de fase em aumento de 200 vezes, em porcentagem de móveis em 5 campos da lâmina;

- v. Vigor inicial, avaliado junto com a motilidade, classificado de 0 a 5 onde 5 é o vigor mais rápido;
- vi. Morfologia espermática classificada em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais (%), avaliada em aumento de 1000 vezes em microscópio com contraste de fase;
- vii. Congelabilidade, avaliada pela motilidade (%) e vigor (0-5) pós-descongelação de 2 palhetas em banho-maria a 37°C por no mínimo 30 segundos;
- viii. Presença de leucócitos/campo no sêmen à fresco em esfregaço corado pelo Panótico Rápido no microscópio em aumento de 200 vezes;
- ix. Exame de gelatinização pelo California Mastite Teste (CMT), utilizando 0,5 mL de sêmen em 2,5 mL do reagente, conforme Leite (1983). O resultado foi classificado de 0 a 3 cruces de acordo com a gelatinização da amostra;
- x. Palpação retal das glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes para avaliar alterações na consistência, sensibilidade e a presença de nódulos endurecidos relacionados a vesiculite.
- xi. Exame ultrassonográfico das glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes, utilizando equipamento com probe linear de 7,5 Mhz de profundidade conforme recomendado por Gnemmi & Levebvre (2009) e Oliveira et al. (2018).



Figura 1. Imagem dos pontos de tricotomia para anestesia epidural baixa (A) e da punção com a agulha longa para aplicação das CTMs (B). Figura 2. Aplicação das CTMs pela punção com agulha longa (30 cm) na fossa isquiorretal esquerda (A) com seringa preparada com as CTMs diluídas (B). Fontes: arquivo do primeiro autor.

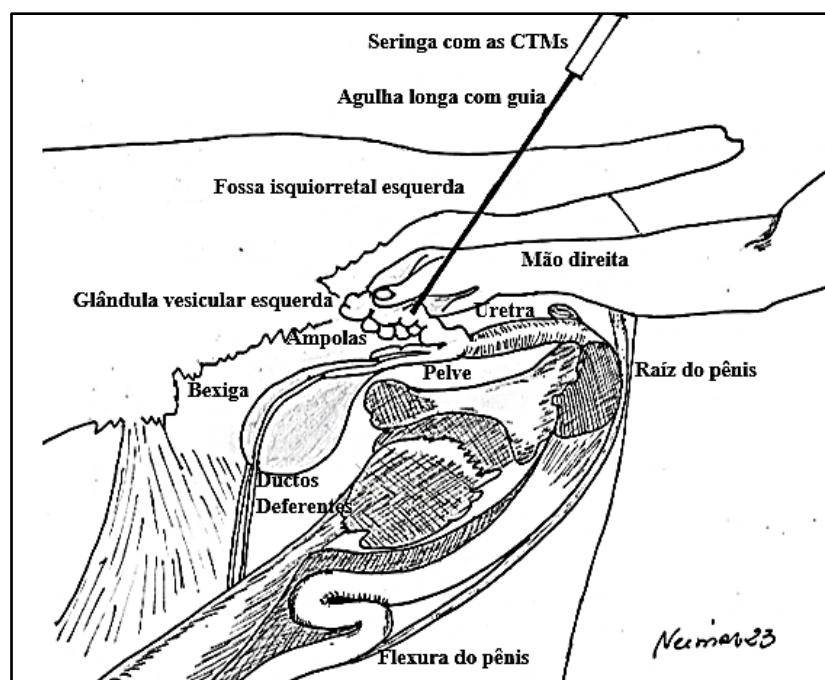


Figura 3. Representação esquemática da aplicação das CTM com agulha longa (30 cm) na glândula vesicular esquerda com seringa preparada com as CTM. Fonte: arquivo do primeiro autor.

Análise estatística

Foram obtidos dados de 5 colheitas de touros com adenite vesicular antes do tratamento e 5 colheitas após o tratamento. Os dados foram avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a normalidade do teste foi significativa ($P < 0.05$) os dados foram transformados ou retirados os outliers e reavaliados. O “Teste T” foi aplicado para identificar diferenças estatísticas entre as variáveis antes do tratamento e após o tratamento. Além disso, foi realizado o teste da binomial para a comparação de 2 proporções pelo teste qui-quadrado do programa R. A probabilidade de $P \leq 0.05$ foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (E.P.M.).

RESULTADOS

Os animais avaliados eram oriundos de CCPS, com todos os controles sanitários obrigatórios em dia. A presença de pus e piócitos no ejaculado foi o ponto de partida para a seleção dos doadores para o programa de tratamento com CTMs. Os dados referentes as características físicas e morfológicas dos ejaculados bem como as informações

referentes as características clínicas pré e após o tratamento com CTMs são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Médias (\pm E.P.M) das características analisadas em touros com adenite vesicular antes e após tratamento com células tronco mesenquimais, com intervalo de 21 dias entre as aplicações de CTMs e retorno às coletas de sêmen.

Características	Pré-tratamento	Após tratamento
Volume (mL)	6,15 \pm 0,91 ^a	6,41 \pm 0,76 ^a
Motilidade (%)	60,09 \pm 4,8 ^a	69,89 \pm 4,6 ^b
Conc. (milhões/mL)	1088,52 \pm 80,82 ^a	943,21 \pm 100,73 ^a
Piócitos/campo	5,83 \pm 0,48 ^a	.
CMT (0 a 3)	1,62 \pm 0,42 ^a	1,5 \pm 0,86 ^a
UFC	26,28 \pm 14,43 ^a	18 \pm 0,1 ^a
Def. Maiores (%)	12,69 \pm 1,72 ^a	11,14 \pm 1,9 ^a
Def. Totais (%)	21,25 \pm 1,79 ^a	19,11 \pm 2,44 ^a
Motilidade PD (%)	26,26 \pm 6,77 ^a	42,5 \pm 5,99 ^b
Nº doses/colheita	95,61 \pm 23,31 ^a	337,84 \pm 67,75 ^b

^{a,b} Letras diferentes dentro das linhas indicam diferenças estatísticas nas características seminais pré e após tratamento ($p < 0,05$) pelo teste T.

Foram observadas melhora na motilidade inicial de 60,09 \pm 4,8 para 69,89 \pm 4,6 estatisticamente significativa ($P < 0,05$), bem como na motilidade pós descongelamento (PD) de 26,26 \pm 6,77 para 42,5 \pm 5,99 ($P < 0,05$). O número de doses produzidas aumentou significativamente após o tratamento com as CTMs, de 95,61 \pm 23,31 unidades para 337,84 \pm 67,75 unidades ($P < 0,05$) por ejaculado. O número de piócitos observados por campo passou de 5,83 \pm 0,48 para zero, demonstrando a recuperação das glândulas vesiculares inflamadas.

Na tabela 2 são apresentadas as comparações descritivas entre a palpação transretal, avaliação ultrassonográfica e presença de piócitos na lâmina de análise da motilidade e vigor. A presença de piócitos na lâmina foi a técnica mais precisa no diagnóstico da adenite vesicular, seguida pela ultrassonografia e por último a palpação transretal. A ultrassonografia permite visualizar alterações na ecogenicidade das glândulas vesiculares antes da presença de alterações clínicas palpáveis por via transretal, enquanto a presença de piócitos no sêmen é o melhor indicativo da inflamação glandular.

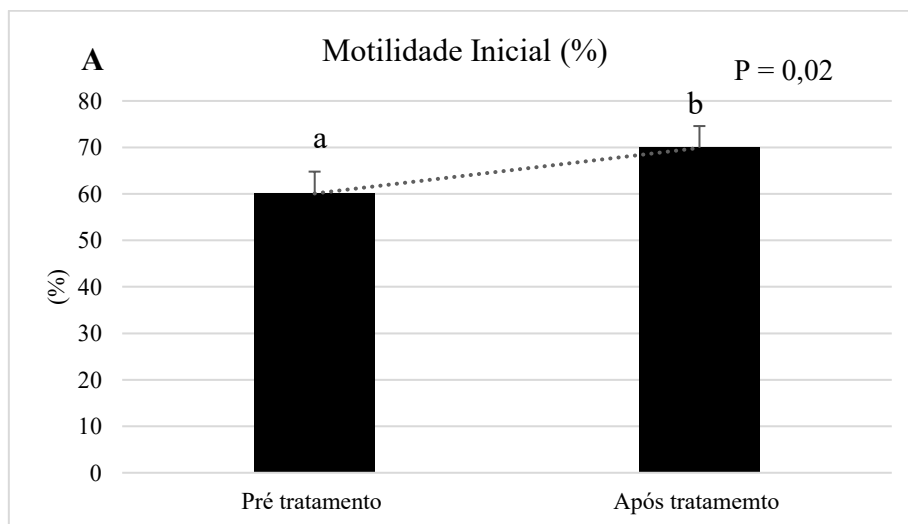
Tabela 2. Comparação descritiva das glândulas vesiculares por palpação transretal, ultrassonografia e presença de piócitos na lâmina.

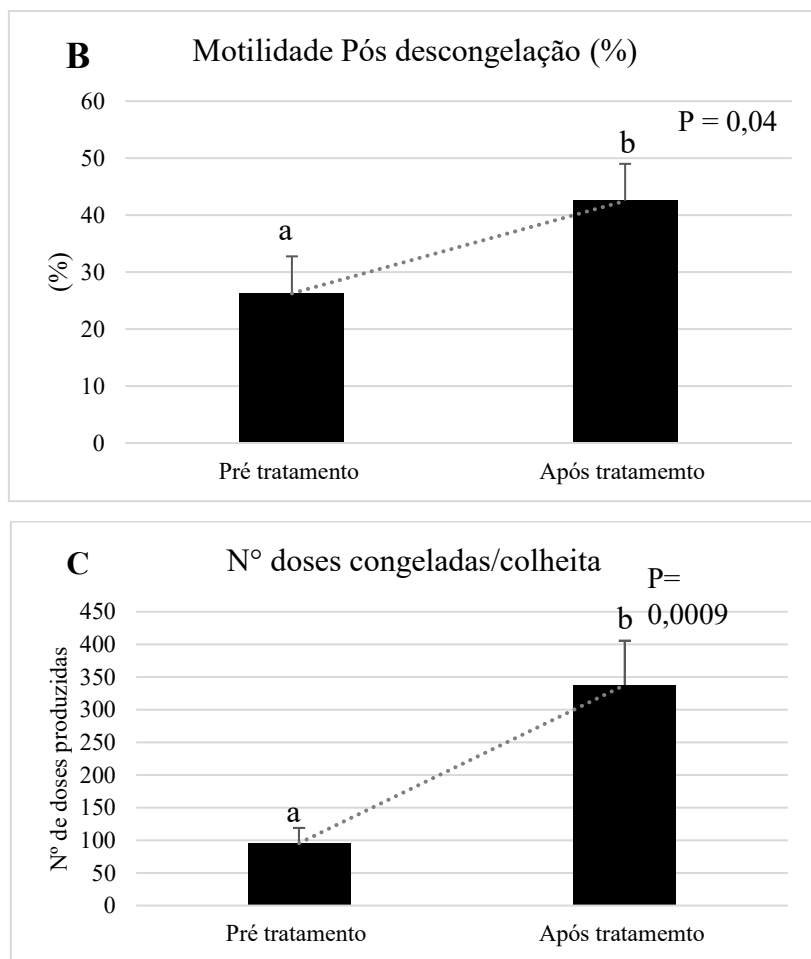
Método	Resultado	
	Positivo	Negativo
Palpação transretal (n, %)	9 (75,0)	3 (25,0)
Ultrassonografia (n, %)	10 (83,3)	2 (16,7)
Piócitos (n, %)	12 (100,0)	-

Dados da tabela: palpação transretal baseado na consistência, sensibilidade e tamanho dos lóbulos das glândulas vesiculares; ultrassonografia baseado na ecogenicidade da glândula; e presença de piócitos na lâmina de motilidade.

No gráfico 1 são apresentadas as médias da motilidade pré-congelação (A), motilidade após congelação (B) e número de doses produzidas (C) pré e após tratamento com CTMs. Tais resultados demonstram estatisticamente o efeito das CTMs na recuperação das glândulas vesiculares inflamadas.

Gráfico 1. Médias (\pm E.P.M) da motilidade pré-congelação (A), motilidade pós-descongelação (B) e número de doses congeladas por colheita (C) antes e após o tratamento com células tronco mesenquimais em touros com adenite vesicular.

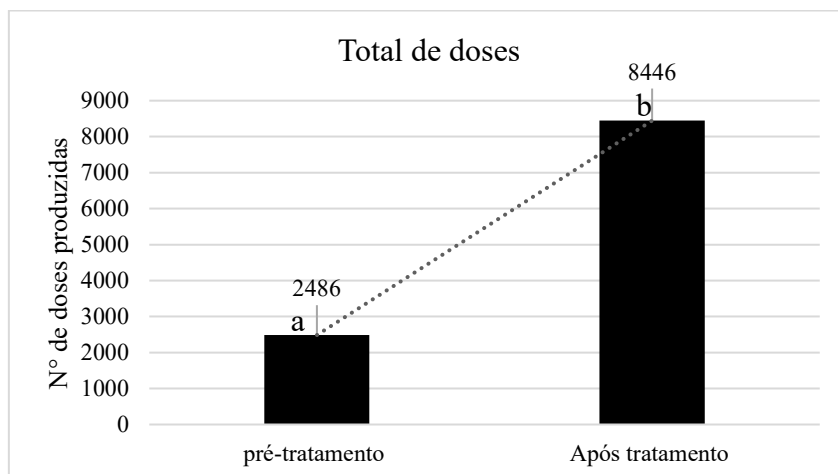




^{a, b} Colunas com letras diferentes diferem estatisticamente ($P < 0,05$) pelo teste T.

O gráfico 2 apresenta a produção de doses congeladas em cinco ejaculados antes do tratamento e cinco ejaculados após o tratamento com CTMs. O resultado é marcante com 3,4 vezes mais unidades produzidas pós-tratamento.

Gráfico 2. Número total de doses congeladas em cinco colheitas pré-tratamento e cinco colheitas após o tratamento com CTMs em touros com adenite vesicular.



DISCUSSÃO

Este é o primeiro relato de estudo sobre aplicação intraglandular de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas em touros de CCPS utilizando a fossa isquiorretal como via de administração e com acompanhamento da produção de sêmen pré e após tratamento. Estudos anteriores utilizando a mesma via de aplicação testaram o efeito de antibióticos distintos em diferentes concentrações no tratamento da adenite vesicular (Martinez et al, 2008; Rovay et al., 2008). Outros estudos se dedicaram a descrição da etiologia, patogênese, nos achados anatomopatológicos e no diagnóstico da adenite vesicular (Monke, 1984; Dagartz et al., 1987; Gilbert, 1996; Gilbert & Fales, 1996; Cavalieri & Van Camp, 1997).

A abordagem isquiorretal para aplicação das CTMs permitiu um bom controle do posicionamento da agulha durante a manipulação da glândula vesicular. Somente os casos de grande alteração do volume glandular exigiram esforço maior para fixação e punção glandular. Nenhuma reação adversa tanto na fossa isquiorretal como nas glândulas tratadas foi encontrada após esse procedimento, tanto no comportamento dos animais como na palpação retal e nas imagens ultrassonográficas.

No presente estudo, foram utilizadas 3×10^6 CTMs por glândula vesicular, baseada nas pesquisas de Mallard et al., (2020) e Peixer et al. (2023) para o tratamento de lesões de ovários em vacas doadoras de oócitos com resultados promissores. Pela resposta nos diferentes casos tratados, é possível dizer que a aplicação de 3×10^6 CTMs via glândula vesicular é o suficiente para tratar casos de vesiculite.

A ação das CTMs injetadas nas glândulas afetadas provavelmente se deve ao tropismo imediato das células ao local inflamado, da aderência às células secretoras e ao tecido intersticial lesados e a ação parácrina das CTMs nas células em regeneração (Mallard; Brunel, 2021). Baseado nessas informações da pesquisa foi estipulado um tempo de repouso de 21 dias entre a aplicação das CTM e o início das coletas após tratamento para que ocorresse a ação terapêutica celular.

Conforme descrito por Mallard & Brunel (2021) a ação das CTMs em processos inflamatórios ocorre pelo tropismo positivo para qualquer área que esteja passando por um processo inflamatório. Mesmo em touros com vesiculite unilateral as CTMs foram aplicadas na glândula sadia ao exame clínico. Tal procedimento foi utilizado porque é difícil diagnosticar a vesiculite subclínica pela palpação retal ou pela ultrassonografia.

Em um touro que apresentava abscesso na glândula esquerda e inflamação aguda na glândula direita, as CTMs atuaram bem na recuperação da glândula inflamada, porém, não houve recuperação da glândula com abscesso devido ao grande acúmulo de pus na luz do túbulo. Ficou demonstrado que as CTMs não atuam em casos crônicos com abscessos nos lóbulos glandulares não conseguindo recuperar a saúde do órgão nessa situação.

A injeção de CTMs nas glândulas vesiculares resultou na presença de sangue nas primeiras amostras de sêmen colhido em vários touros, que desapareceu rapidamente com a frequência das coletas. Presume-se que o sangramento ocorreu devido à ruptura do tecido glandular no local da aplicação, com extravasamento para o ducto principal do órgão, sem efeito adverso duradouro.

O tratamento intraglandular com CTMs melhorou a fisiologia das glândulas vesiculares afetadas com efeito benéfico na viabilidade espermática após a eliminação do pus e dos piócitos, melhorando a qualidade do sêmen, como demonstrado no gráfico 1, sobre a motilidade pré-congelamento ($P = 0,02$), motilidade pós-congelamento ($P = 0,04$) e número de doses congeladas por colheita ($P = 0,0009$).

Pelos resultados apresentados, é possível atribuir a recuperação das glândulas vesiculares inflamadas ao tratamento com CTMs, no entanto, a recuperação ocorreu após a segunda aplicação na maioria dos casos. Em um touro que recebeu apenas uma aplicação de CTMs a pedido do proprietário, a recuperação da qualidade seminal foi mais demorada, porém completa após 90 dias da aplicação.

Neste estudo não foi pesquisado o agente ou agentes causadores da inflamação glandular devido aos tratamentos efetuados com diferentes antibióticos e anti-inflamatórios nos touros pelos veterinários clínicos dos CCPS, o que dificultaria o cultivo dos microrganismos no sêmen, bem como pela contaminação saprófita da amostra durante a colheita conforme descrito por Gilbert & Fales (1996).

A aplicação das CTMs resultou na cura da vesiculite na maioria dos casos tratados, em touros entre 2 a 13 anos de idade alojados em CCPS. Embora o tempo de início da vesiculite nesses touros não pode ser determinado, é provável que as infecções fossem de natureza aguda e crônica.

CONCLUSÃO

A aplicação de 3×10^6 CTMs nas glândulas vesiculares de touros com vesiculite é segura e eficiente, pois melhorou vários parâmetros avaliados nesta pesquisa,

principalmente a produção de doses de sêmen por ejaculado. Além disso, nenhum doador tratado apresentou manifestações clínicas negativas, tanto na primeira como na segunda aplicação das CTMs. Dessa forma, a aplicação de CTMs alogênicas derivadas de tecido adiposo no tratamento da adenite vesicular em touros doadores apresenta-se como uma opção de terapia viável.

REFERÊNCIAS

BARTH, AD. Bull Breeding Soundness. 3rd edition. Saskatoon: **Western Canadian Association of Bovine Practitioners**, 162:2013.

CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **J Pathol**, 217(2):318-324, 2009. <https://doi.org/10.1002/path.2469>

CAVALIERI, J; VAN CAMP, SD. Bovine Seminal Vesiculitis. A Review. **Vet Clin North Amer Food Anim.**, 13(2):233-41, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30337-6](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30337-6)

GILBERT, RO; FALES, MH. The effect of bovine seminal plasma on the function and integrity of bovine neutrophils. **Theriogenology**, 46:649-658, 1996. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00216-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00216-6)

GIMBLE, JM; KATZ, AJ; BRUNNELL, BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circ Res**, 100(9):1249-1260, 2007. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>

GNEMMI, R; LEVEBVRE, RC. Ultrasound Imaging of the Bull Reproductive Tract: An Important Field of Expertise for Veterinarians. **Vet Clin North Am Food Anim**, 25(3): 767–779, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.006>

KOZIOL, JH; ARMSTRONG, CL. Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls. 2nd edition, **Society for Theriogenology (SFT)**, USA, 147:2018.

LEITE, RC. Emprego do California Mastite Teste CMT para diagnóstico precoce da vesiculite de reprodutores bovino. **Tese mestrado, UFMG, Belo Horizonte**, 1983.

MALARD, PF; BRUNEL, HSS. Células-Tronco na Medicina Veterinária. Princípios básicos para a utilização da terapia celular na rotina clínica. 1ª edição, **Bio Cell, Brasília**, 132:2021.

MALARD, PF; PEIXER, MAS; GRAZIA, JG; BRUNEL, HSS; FERES, LF; VILLARROEL, CL; SIQUEIRA, LGB; DODE, MAN; POGUE, R; VIANA, JHM; CARVALHO, JR. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64810-x>

MARTINEZ, M.F.; BARTH, A.D. Early detection and treatment of vesicular adenitis in bulls. **Anim Reprod Sci**, 101:252–6, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.009>

MARTINEZ, M.F.; ARTEAGA, A.A.; BARTH, A.D. Intraglandular injection of antibiotics for the treatment of vesicular adenitis in bulls. **Anim Reprod Sci**, 104(2-4):201-211, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.009>

MONKE, DR. Bovine Seminal Vesiculitis. **Proc 10th Techn Conf AI Repr**, 54-61, 1984.

MULLINS, KJ; SAACKE, RG. Illustrated Anatomy of the Bovine Male and Female Reproductive Tracts. **NAAB-Germinal Dimension, Inc.**, 79:2003.

MURPHY, MB; MONCIVAIS, K; CAPLAN, AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental and Molecular Medicine**, 45, e54, 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/emm.2013.94>

NAVARRETE, F; SARAVIA, F; CISTERNA, G; ROJAS, F; SILVA, PP; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L; ROJAS, D; CABEZAS, J; MANÇANARES, ACF; CASTRO, FO. Assessment of the anti-inflammatory and engraftment potential of horse endometrial and adipose mesenchymal stem cells in an in vivo model of post breeding induced endometritis. **Theriogenology**, 155:33-42, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.010>

OLIVEIRA, RPL; FAVARO, PC; PEREIRA, GR; BARCA JR,FA; BORGES, MHF; GALDIROLI, VH; KOETZ JR, C. Ultrassonografia no auxílio do diagnóstico de vesiculite seminal em touros de corte. **Pesq Vet Bras**, 38(6):1038-1042, 2018.

<https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5414>

PEIXER, MA; MALARD, P; BRUNEL, HSS; VIANA, J; ALENCAR-SILVA, T; CARVALHO, J; POGUE, R. Clinical safety of bovine intra-ovarian application of allogeneic mesenchymal stem cells. **Braz J Sci.**, 2(9):87-97, 2023. <https://doi.org/10.14295/bjs.v2i9.383>

PIERI, NCG; SOUZA, AF; BOTIGELLI, RC; MACHADO, LS; AMBROSIO, CE; MARTINS, DS; ANDRADE, AFCA; MEIRELLES, FV; HYTTEL, P; BRESSAN, FF. Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. **Vet Res Com**, 43:7–16, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11259-019-9744-6>

PITTENGER, MF; MACKAY, AM; BECK, SC; et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, 284:143-147, 1999. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>

ROVAY, H; BARTH, AD; CHIRINO-TREJO, M; MARTINEZ, MF. Update on Treatment of Vesiculitis in Bull. **Theriogenology**, 70(3):495–503, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.002>

TONGU, E.A.O.; SEGABINAZZI, L.G.T.M.; ALVARENGA, M.L.; MONTEIRO, A; PAPA, FO; ALVARENGA, MA. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. **Theriogenology**, 169:1-8, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.019>

ZART, AL; JURGIELEWICZ, VCL; FERNANDES, CE. Seminal leucocytary profile in beef bulls. **Reprod Dom Anim**, 49:719–724, 2014. <https://doi.org/10.1111/rda.12353>

ANEXO B. Artigo 2:**Protocolo para o diagnóstico da adenite vesicular em touro**

Neimar Correa Severo^{1*}, Teresinha Inês Assumpção¹, Renata Lançoni¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV - UFU), Uberlândia, MG, Brasil.

* [E-mail: ncsevero@gmail.com](mailto:ncsevero@gmail.com)

RESUMO

A adenite vesicular ou vesiculite é o processo inflamatório mais frequente em touros acometendo as glândulas vesiculares podendo se estender para as ampolas dos ductos deferentes. Esta enfermidade pode levar a redução da fertilidade de touros em regime de monta natural e em touros doadores de sêmen nos centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS). Para obter bons resultados no tratamento da vesiculite é necessário realizar o diagnóstico mais precoce possível. Nesse artigo descrevemos os principais métodos para identificar adequadamente um quadro de vesiculite, utilizando vários procedimentos clínicos para dar segurança ao veterinário andrologista no diagnóstico dessa afecção de caráter agudo ou crônico no macho bovino. O tratamento mais adequado será definido a partir dos dados do protocolo de diagnóstico da adenite vesicular, quadro clínico de infecção aguda ou de vesiculite crônica.

Palavras-chave: glândula vesicular, vesiculite, métodos diagnósticos, reprodução

INTRODUÇÃO

As glândulas sexuais acessórias ou anexas no touro são formadas pelas glândulas bulbouretrais, a próstata e as glândulas vesiculares. As ampolas dos ductos deferentes são órgãos mistos glandular e de armazenamento de espermatozoides e também são importantes na formação do sêmen (Mullins; Saacke, 2001). As glândulas vesiculares são órgãos pares localizadas na área pélvica do touro. Elas são facilmente identificadas por palpação retal e estão numa posição cranial à próstata, lateral as ampolas e dorsal a bexiga urinária (Figura 1).

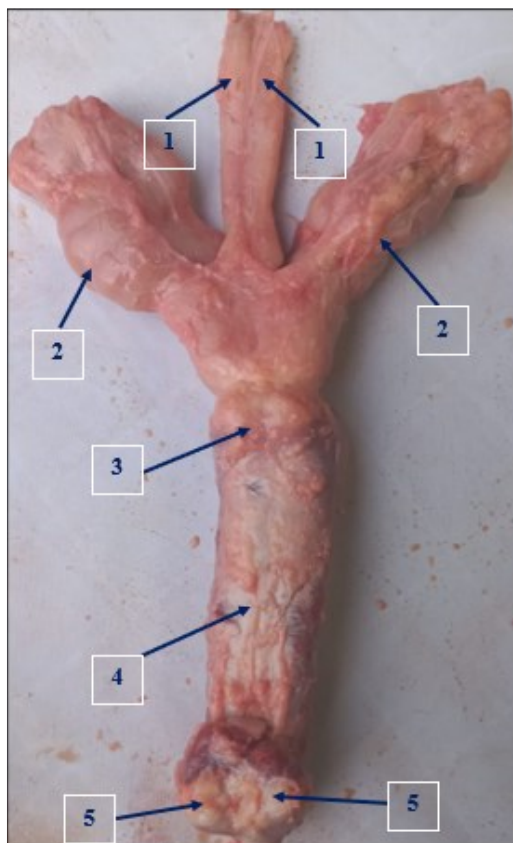


Figura 1. Imagem dos órgãos genitais internos do touro. 1. Par de ampolas dos ductos deferentes; 2. Par de glândulas vesiculares; 3. Corpo da próstata; 4. Próstata disseminada coberta pelo músculo uretral; 5. Par de glândulas bulbo-uretrais. Fonte: arquivo dos autores.

As glândulas vesiculares saudáveis do touro adulto medem entre 8 a 15 cm de comprimento, 3 a 6 cm de largura e 2 a 3 cm de espessura (Barth, 2013), podendo ser levemente assimétricas em tamanho e forma sendo considerado normal. Elas tem uma estrutura lobulada e uma consistência firme, mas resiliente e móveis. As glândulas vesiculares variam muito de tamanho, sendo pequenas em touros jovens e grandes em touros adultos. O aumento das glândulas vesiculares com perda das lobulações e consistência firme sugerem alteração clínica na sua estrutura. A principal alteração ligada a esse quadro é a adenite vesicular ou vesiculite (Koziol; Armstrong, 2018).

A adenite vesicular é um processo inflamatório da glândula vesicular e essa inflamação frequentemente resulta na presença de piócitos (leucócitos degenerados) no sêmen. O agente infeccioso pode ou não ser identificado pela espermocultura como agente etiológico. As principais bactérias presentes na adenite vesicular são a *Trueperella*

pyogenes, o *Histophilus somni*, a *Escherichia coli*, os *Staphylococcus* sp. e outras bactérias comuns em processos inflamatórios e abscessos (Martinez et al., 2008; Rovay et al., 2008).

Os sintomas clínicos da adenite vesicular aguda são semelhantes a peritonite aguda, como desconforto, tenesmo ou claudicação dos membros posteriores; no entanto, geralmente não apresenta sinais clínicos evidentes além das alterações do ejaculado, com a presença de muitos leucócitos polimorfonucleares (>5 PMN por cada campo contado na lâmina corada), com predominância de neutrófilos (Zart et al., 2014). A maior viscosidade do líquido vesicular e alterações no seu pH podem reduzir a motilidade espermática e a congelabilidade, com baixa sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelamento no sêmen criopreservado (Monke, 1984).

O objetivo deste estudo foi a criação desse protocolo para diagnóstico de casos de vesiculite em touros foi melhorar o diagnóstico para recomendar o tratamento precoce mais adequado da infecção e assim reduzir o alto percentual de recidivas que ocorrem nesses casos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. No sêmen *in natura*

A presença de piócitos na observação entre lâmina e lamínula (leucócitos degenerados) é um indicativo de adenite vesicular (Dagartz et al., 1987). Ao avaliar a motilidade e vigor do sêmen puro (sem a diluição inicial), entre lâmina e lamínula em aumento de 200 vezes de preferência, a presença de um piócito por campo é um indicativo de infecção (Zart et al., 2014). Deve-se avaliar em torno de cinco campos por lâmina (Barth, 2013) para ter uma avaliação mais segura. Essa infecção pode ser originada em qualquer parte do sistema reprodutivo (epidídimos, ampolas, próstata, uretra, pênis), porém, é mais frequente da glândula vesicular. O aspecto do piócito na lâmina é de um ponto refringente 2 a 3 vezes maior do que a cabeça do espermatozoide (Figura 2). Ele tem aspecto redondo diferente de células de descamação.



Figura 2. Presença de piócitos (leucócitos degenerados) na lâmina de sêmen *in natura* (setas). Fonte: arquivo dos autores.

2. California Mastite Teste (CMT)

Ao constatar a presença de piócitos entre lâmina e lamínula, realiza-se o teste do CMT para avaliar o nível de contaminação por leucócitos, utilizando 0,5mL de sêmen puro mais 2,5mL do reagente CMT na placa de avaliação. Homogeneizar por 30 segundos e verificar a formação do gel (Figura 3). O CMT é um método indireto, que avalia a quantidade de células somáticas no sêmen *in natura*, sob a ação de um detergente aniônico que atua rompendo o citoplasma e núcleo dos leucócitos, liberando o material genético (protéico) no meio (Leite, 1983). A formação do gel ocorre pela interação dos ácidos nucléicos celulares com o detergente, quanto mais significativa a viscosidade, maior a quantidade de células somáticas presentes no sêmen. Pode ser classificado seguindo o padrão para o leite bovino de 0 a 3 cruzes, conforme tabela abaixo (Leite, 1983).

Tabela 1. Classificação do CMT para avaliação do sêmen suspeito de vesiculite.

Códigos	Aspecto do California Mastite Teste	Resultado
0	Ausência de grumos	Sem alterações
+ -	Poucos grumos no fundo da placa	Suspeita
1 (+)	Presença de grumos sem gelatinização	Vesiculite inicial
2 (++)	Presença de grumos com gelatinização	Vesiculite aguda
3 (+++)	Presença de grumos com gelatinização e mudança de cor	Vesiculite aguda



Figura 3. Imagem do teste CMT mostrando a gelatinização da amostra de sêmen, positiva para vesiculite. Fonte: arquivo dos autores.

3. Esfregaço de sêmen corado

A coloração de um esfregaço de sêmen puro é o diagnóstico final da presença de leucócitos no sêmen (Figura 4), classificado como método direto. A presença de um leucócito/campo em pelo menos cinco campos contados, já é o suficiente para demonstrar a contaminação da amostra por leucócitos (Zart et al., 2014).

3.1. Técnica de coloração

Qualquer corante utilizado para sêmen bovino cora os leucócitos, porém, o mais adequado é o Diff-Quik® (Zart et al., 2014) ou o Panótico Rápido.

A técnica a seguir foi utilizada para o Panótico Rápido:

- a) Fazer o esfregaço com o sêmen puro;
- b) Secar à temperatura ambiente;
- c) Submeter à coloração pelo Panótico Rápido (Figura 4);
- d) 5 segundos no corante 1 (fixador), escorrer o excesso do fixador e em seguida colocar no corante 2 (vermelho) por 5 segundos e por último 10 segundos no corante 3 (azul);
- e) Lavar rapidamente em água;
- f) Secar à temperatura ambiente e está pronto para leitura em 100 a 200 vezes.



Figura 4. Panóptico rápido para coloração da lâmina para contagem de leucócitos no sêmen, começando pelo fixador 1 e terminando na lavagem final. Fonte: Arquivo dos autores.

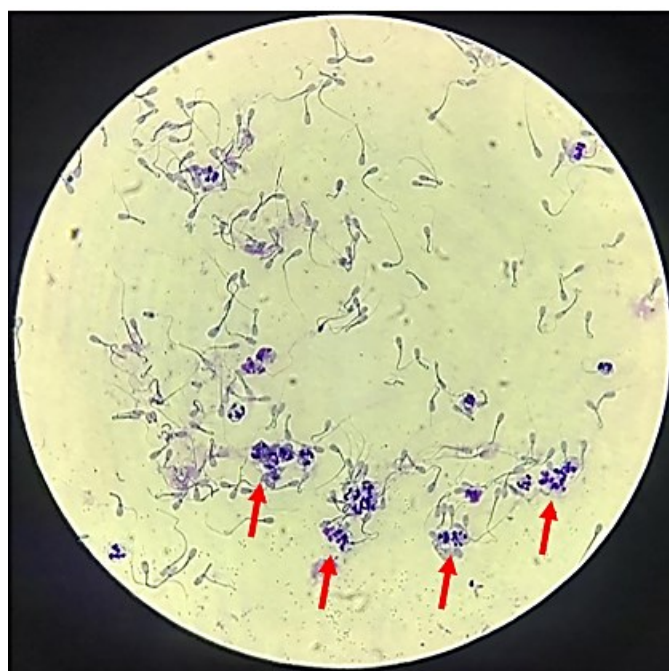


Figura 5. Lâmina corada pelo Panoptico rápido. Presença de muitos leucócitos polimorfonucleares na amostra de sêmen puro. Aumento de 100x. Fonte: arquivo dos autores.

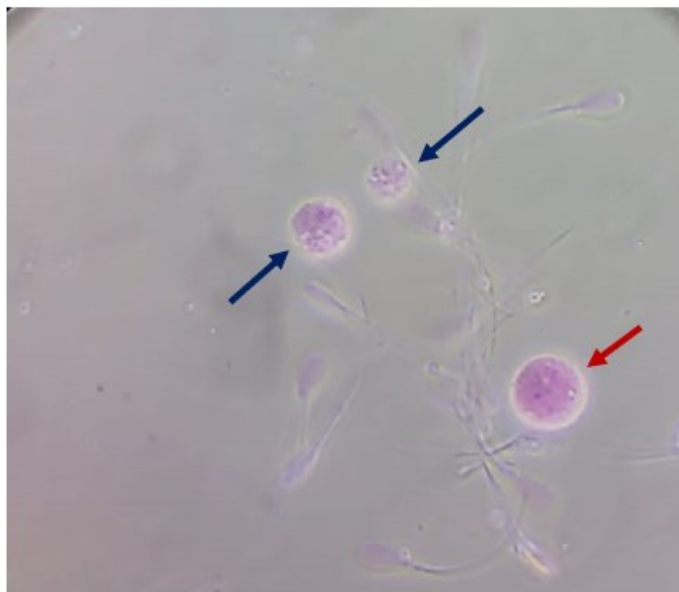


Figura 6. Presença de dois leucócitos degenerados (seta azul) e um macrófago (seta vermelha) na lâmina de sêmen puro, corado com Rosa Bengala (aumento de 400x). Fonte: arquivo dos autores.

4. Exame por Via Transretal

O exame das glândulas anexas por via transretal segue o protocolo do exame andrológico preconizado por Barth (2013) e Koziol & Armstrong (2018). O foco principal nesse exame são as glândulas vesiculares, próstata e as ampolas dos ductos deferentes. As bulbouretrais não são palpáveis devido ao músculo uretral que envolve essas glândulas. A uretra pélvica é a primeira estrutura palpada. É uma estrutura firme e tubular pulsátil ao toque graças ao forte musculo uretral circundante. O corpo da próstata é o ponto de referencia para localização das demais glândulas. Ela é firme e em forma de anel sobre o início da uretra pélvica.

As glândulas vesiculares são palpadas crânio-lateralmente á próstata (Figura 7-A). Elas variam em tamanho e forma entre touros de acordo com a idade, sendo uniformes em tamanho e lobuladas, túrgidas e móveis. As ampolas podem não ser distintas à palpação, mas podem ser notadas na linha media pressionando as pontas dos dedos sobre o piso da pelve, movendo os dedos lateralmente (Figura 7-A). Essas estruturas são mistas em função: armazenam espermatozoides e produzem secreção que compõe o plasma seminal (Mullins; Saacke, 2001).

As glândulas vesiculares afetadas pela vesiculite aumentam de tamanho e perdem as lobulações; entretanto, em casos crônicos, pode haver aderências, abscessos e,

ocasionalmente, o desenvolvimento de um trato fistuloso drenando para o reto ou, raramente, o desenvolvimento de peritonite (Barth, 2013). A maioria dos touros afetados não mostram sinais de dor à palpação das glândulas vesiculares.

A patologia das ampolas não é detectável clinicamente de forma confiável. Ampolas firmes muito grandes podem estar cheias de espermatozoides saudáveis e viáveis ou podem conter espermatozoides mortos ou pus acumulados. Alguns touros podem apresentar ampolas mais espessas especialmente aqueles em repouso sexual.

Tabela 2. Itens de avaliação das glândulas vesiculares e das ampolas dos ductos deferentes.

Avaliação	Interpretação			Glândula Vesicular	
				Esquerda	Direita
Consistência	macia	firme	dura		
Sensibilidade	presente	ausente			
Lobulações	presentes	ausentes			
Mobilidade	presente	ausente			
Simetria	simétricas	assimétricas			
				Ampola do Ducto Deferente	
Consistência	macia	firme	dura		
Sensibilidade	presente	ausente			
Simetria	simétricas	assimétricas			

5. Exame Ultrassonográfico (US) Transretal

As glândulas vesiculares e demais glândulas anexas são avaliadas por US transretal. As imagens são feitas sobre as glândulas no sentido longitudinal (Figura 7-A). Para a verificação ultrassonográfica das glândulas vesiculares, próstata e das ampolas são utilizados equipamentos de ultrassonografia transretal equipados com transdutor linear com frequência de 7,5MHz (Weber et al., 1988).

Os touros são contidos adequadamente e as fezes são removidas da ampola retal por meio de palpação. Após é introduzido o transdutor no reto e realizada a localização das glândulas sexuais acessória, com movimentos sobre a superfície dorsal das glândulas, sendo possível a visualização do eixo longitudinal (Gnemmi; Levebvre, 2009).

O ponto de referencia é a visualização da uretra pélvica com sua pulsação característica do forte músculo uretral. A seguir é visualizado o corpo da próstata como uma estrutura anelar sobre o colo da bexiga. Num movimento craneal e lateral podemos observar a glândula vesicular direita e em sentido oposto a glândula vesicular esquerda.

As ampolas são observadas na linha media sobre a bexiga na sua maior porção e apenas a parte caudal é vista sobre o colo da bexiga (Gnemmi; Lefebvre, 2009).

Conforme descrito por Kastelic e Brito (2012), a glândulas vesiculares apresentam uma cápsula distinta, com lóbulos ecogênicos homogêneos, pequenas vesículas anecóicas cheias de líquido (1–4 mm) e um ducto coletor anecóico central.

Oliveira et al. (2018) descrevem as glândulas vesiculares normais com um aspecto característico ao US mostrando os lóbulos isocóicos circundados por uma camada hiperecótica ao redor, a tunica adventícia, com regiões hipoecóicas ou anecoicas representando os ductos cheios de líquido no centro dos lóbulos, conforme figura 7-B.

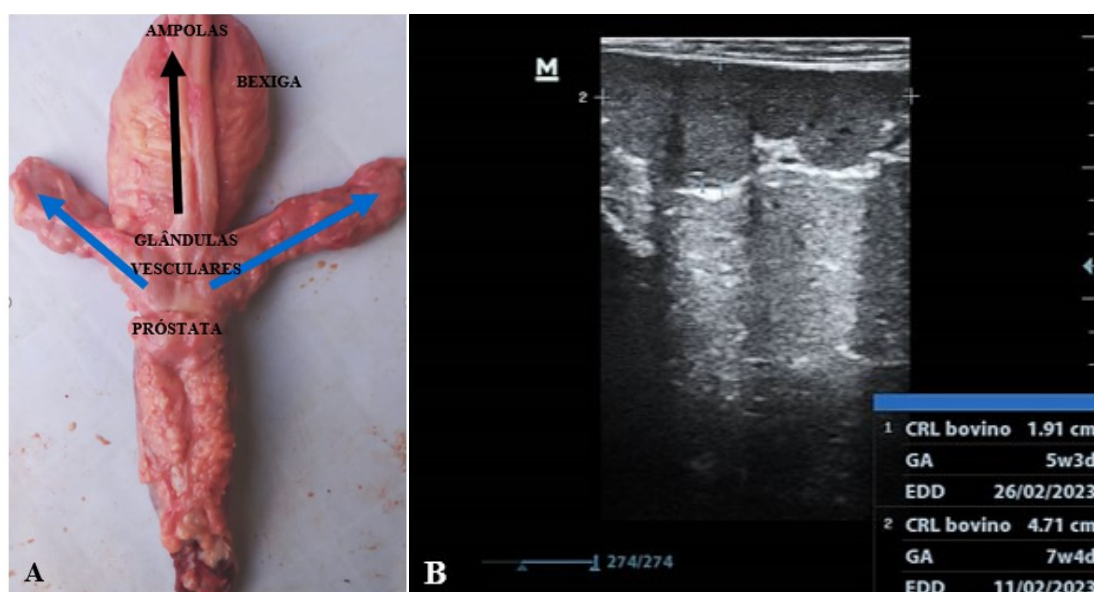


Figura 7. Vista dorsal das glândulas sexuais acessórias em A (glândulas vesiculares na seta azul) mostrando o local de posicionamento do transdutor para medidas ultrassonográficas (ampolas na seta preta). Glândula vesicular sem alteração na imagem B. Fonte: arquivo dos autores.

Tabela 3. Classificação do aspecto das glândulas vesiculares através da ultrassonografia.

Códigos	Aspecto da glândula vesicular	Resultado
1	Sem alterações na estrutura lobular e na túnica	Sem alterações
2	Áreas marcadas hiperecóicas	Suspeita
3	Áreas marcadas hiperecóicas com túnica espessada	Vesiculite aguda
4	Perda lobular com túnica espessada e cisto(s)	Ves. aguda/crônica
5	Perda lobular com túnica espessada, cisto(s) e fibrose	Vesiculite crônica

Em touros com adenite vesicular, a glândula está aumentada, com perda da estrutura lobular, a túnica está espessada e há aumento da ecogenicidade do órgão e cistos dentro da glândula (Tabela 3). Isto é de considerável relevância clínica, uma vez que a

incidência de vesiculite clínica ou subclínica pode ser alta em touros jovens (Gonzales et al., 2019).

As ampolas dos ductos deferentes são visualizadas dorsal à bexiga, passando por sua inserção sob o corpo da próstata, até seu término no lúmen uretral próximo ao colículo seminal (Weber et al., 1988). Ao corte transversal, as ampolas são redondas e estreitamente justapostas na porção caudal, embora suas bordas adjacentes sejam bem demarcadas. Cada ampola tem em média $0,84 \pm 0,2$ cm de diâmetro (Weber et al., 1988).

Ao corte longitudinal, um lúmen anecóico de formato irregular é visível dentro de uma faixa isocóica do parênquima glandular circundante (Figura 8). As ampolas diminuem de diâmetro e apresentam tunica e parede glandular espessada quando estão inflamadas, visíveis nas imagens de US ao corte longitudinal na sua porção mais espessa (Tabela 4).

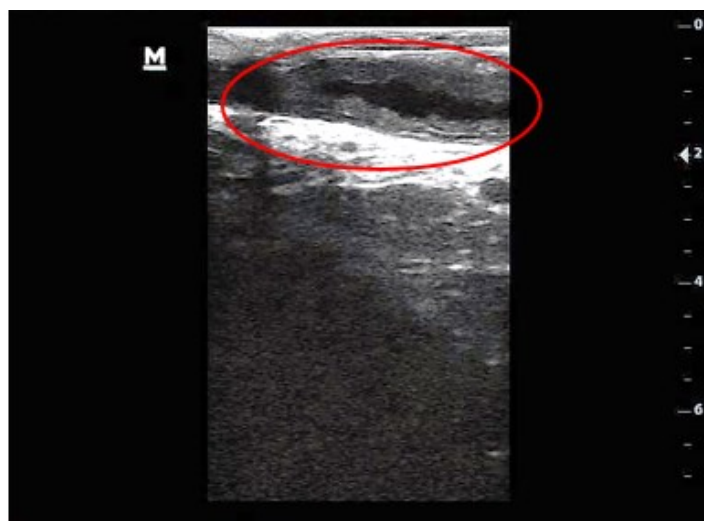


Figura 8. Imagem ultrassonográfica de uma ampola do ducto deferente espessada em touro com adenite vesicular bilateral (círculo em vermelho). Fonte: arquivo dos autores.

Tabela 4. Classificação do aspecto das ampolas através da ultrassonografia.

Códigos	Aspecto das ampolas dos ductos deferentes	Resultado
1	Lúmen presente e paredes normais	Sem alterações
2	Lúmen reduzido e paredes normais	Suspeita
3	Lúmen reduzido ou ausente e paredes espessadas	Ampolite

6. Colheita de amostra para cultura microbiológica

A colheita de amostras para cultura na tentativas de diagnosticar o agente etiológico da vesiculite podem ser feitas, mas os resultados são muitas vezes inconclusivos (Monke,

1984). As principais causas de falhas na identificação do microrganismo causador da vesiculite são: 1) técnicas impróprias de coleta de sêmen ou 2) o agente etiológico não está mais presente. Segundo Monke (1984), a incapacidade de isolar microrganismos de alguns touros afetados com vesiculite crônica, quando técnicas adequadas de colheita do líquido seminal foram utilizadas, sugere que o processo inflamatório pode persistir mesmo na ausência do agente patogênico. Este conceito é ainda corroborado pelos resultados refratários ao tratamento com antibióticos em alguns touros.

A contaminação do sêmen colhido por vagina artificial ou eletroejaculação não permite um diagnóstico adequado do agente etiológico devido à contaminação por microrganismos prepuciais ou ambientais (Monke, 1984). Uma vez obtida a amostra, ela deve ser transportada anaerobicamente até que possa ser transferida para um meio de crescimento (Dagartz et al., 1987). Para resolver o problema de contaminação da amostra, o uso da técnica de colheita do líquido seminal descrita por Parsonson et al., (1971) é o melhor procedimento.

6.1. Técnica de Parsonson et al., (1971) modificada:

- a) Tranquilizar o touro com maleato de acepromazina a 1% (Acepran 1%® Vetnil) na dose de 0,033mg/kg de peso vivo intramuscular (Eurides et al., 1981). Cortar o excesso dos pelos prepuciais e limpar o óstio prepucial com água e sabão neutro. Secar com papel toalha.
- b) Aguardar 10 minutos para o relaxamento dos músculos retratores do pênis, facilitando a exposição do órgão através do prepúcio.
- c) Fixar o pênis projetado fora do óstio segurando com gaze estéril próximo a glândula.
- d) Higienizar a glândula e a uretra irrigando com solução salina estéril; introduzir um cateter uretral estéril número 8 pela uretra até a borda de fixação.
- e) Fixar uma seringa estéril de 10 ml com embolo plástico ao cateter para colher o líquido seminal e então massagear as glândulas vesiculares, as ampolas e a próstata para liberar as secreções.
- f) Lacrar a ponta da seringa com calor, identificar, colocar no gelo reciclável e encaminhar ao laboratório para o cultivo microbiológico.

CONCLUSÕES

Há vários métodos para identificação adequada de vesiculite, utilizando um ou mais procedimentos clínicos no diagnóstico dessa afecção no bovino. O procedimento mais adequado é utilizar o CMT de uma amostra do ejaculado associado a lamina corada pelo panótico rápido para qualificar e quantificar o problema da vesiculite. A avaliação das glândulas vesiculares e ampolas dos ductos deferentes pela palpação e ultrassonografia auxilia na avaliação da extensão das lesões nos órgãos. A cultura microbiológica deve ser feita sempre no início do processo inflamatório. O tratamento mais adequado será definido a partir do diagnóstico baseado no quadro clínico agudo ou crônico da vesiculite.

REFERÊNCIAS

BARTH, AD. Bull Breeding Soundness. 3rd ed., Saskatoon: **Western Canadian Association of Bovine Practitioners**, 162:2013.

DAGARTZ, DA; MORTIMER, RG; BALL, L. Vesicular adenitis of bulls: a review. **Theriogenology**, 28(4):513-521, 1987. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90256-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90256-1)

EURIDES, D; RAISER, AG; PIPPI, NL; et al. Eficácia do maleato de acepromazina na exposição de pênis de touros da raça charolesa. **Rev Cen Cien Rur**, 11(4):237-241, 1981.

GNEMMI, R; LEVEBVRE, RC. Ultrasound Imaging of the Bull Reproductive Tract: An Important Field of Expertise for Veterinarians. **Vet Clin North Am. Food Anim**, 25(3): 767-779, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.07.006>

GONZALEZ, S.M.; ARANTES, D.C., MENEGHETTI, S.L.N.; et al. Ocorrência de Alterações das Glândulas Sexuais Acessórias de Touros de Rodeio Através do Exame Ultrassonográfico. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 43(4):809-814, 2019.

KASTELIC, J.P.; BRITO, L.F.C. Ultrasonography for Monitoring Reproductive Function in the Bull. **Repr Dom Anim**, 47(Suppl. 3):45-51, 2012; doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02042.x

KOZIOL, JH; ARMSTRONG, CL. Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls. 2nd edition, **Society for Theriogenology (SFT)**, USA, 147:2018.

LEITE, RC. Emprego do California Mastite Teste CMT para diagnóstico precoce da vesiculite de reprodutores bovino. **Tese mestrado, UFMG**, 1983.

MARTINEZ, MF; ARTEAGA, AA; BARTH, AD. Intraglandular injection of antibiotics for the treatment of vesicular adenitis in bulls. **Anim Reprod Sci**, 104(2-4):201-211, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.09.009>

MONKE, DR. Bovine Seminal Vesiculitis. **Proc 10th Tech Conf AI Reprod**, 54-61, 1984.

MULLINS, KJ; SAACKE, RG. Illustrated Anatomy of the Bovine Male and Female Reproductive Tracts. **NAAB-Germinal Dimension, Inc.**, 79:2003.

OLIVEIRA, RPL; FAVARO, PC; PEREIRA, GR; et al. Ultrassonografia no auxílio do diagnóstico de vesiculite seminal em touros de corte. **Pesq Vet Bras**, 38(6):1038-1042, 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5414>

PARSONSON, IM; HALL, IE; SETTERGREN, I. A method for the collection of bovine seminal vesicle secretions for microbiologic examination. **J Am Vet Med Assoc**, 158:175-177, 1971.

ROVAY, H; BARTH, AD; CHIRINO-TREJO, M; MARTINEZ, MF. Update on Treatment of Vesiculitis in Bull. **Theriogenology**, 70(3):495–503, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.002>

ZART, AL; JURGIELEWICZ, VCL; FERNANDES, CE. Seminal leucocytary profile in beef bulls. **Reprod Dom Anim**, 49:719–724, 2014. <https://doi.org/10.1111/rda.12353>

WEBER, JA; HILT, CJ; WOODS, GL. Ultrasonographic appearance of bull accessory sex glands. **Theriogenology**, 29(6):1347-1355, 1988. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90015-5)


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Reitoria

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais

 Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 02 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8658 - www.comissoes.propp.ufu.br/ceua - ceua@propp.ufu.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Tratamento da adenite vesicular em touros com aplicação de células-tronco mesenquimais intraglandular”**, protocolo nº **23117.051597/2022-62**, sob a responsabilidade de **Renata Lançoni** – que envolve a produção, manutenção e/ou 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **23 de setembro de 2022**.

(We certify that the project entitled **“Tratamento da adenite vesicular em touros com aplicação de células-tronco mesenquimais intraglandular”** protocol **23117.051597/2022-62**, under the responsibility of **Renata Lançoni** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was **approved** for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of **september 23th, 2022**).

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Início: 01/10/2022 Término: 30/03/2023
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Bovino
Número de animais	40 animais
Peso / Idade	900kg/ 2 a 10 anos
Sexo	Macho
Origem / Local	Centrais de processamento e criopreservação de sêmen bovino (Alta Genetics, Uberaba, MG; Central Bela Vista, Botucatu, SP)
Local onde serão mantidos os animais:	Centrais de processamento e criopreservação de sêmen bovino (Alta Genetics, Uberaba, MG; Central Bela Vista, Botucatu, SP)



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Fernando Moreira Izidoro, Coordenador(a)**, em 26/09/2022, às 13:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3949243** e o código CRC **029FE062**.