

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

VITÓRIA CAROLINE ABDALA DE MENDONÇA SIQUEIRA

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM
PARÊNQUIMA TESTICULAR EQUINO – CARACTERÍSTICAS
HISTOPATOLÓGICAS**

UBERLÂNDIA

2025

VITÓRIA CAROLINE ABDALLA DE MENDONÇA SIQUEIRA

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM
PARÊNQUIMA TESTICULAR EQUINO – CARACTERÍSTICAS
HISTOPATOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Profa. Dra. Renata Lançoni

UBERLÂNDIA

2025

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

S618 Siqueira, Vitória Caroline Abdalla de Mendonça, 2002-
2025 Aplicação de Células Tronco Mesenquimais alogênicas no
parênquima testicular de equinos - Características
histopatológicas [recurso eletrônico] / Vitória Caroline Abdalla
de Mendonça Siqueira. - 2025.

Orientadora: Renata Lançoni.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade
Federal de Uberlândia, Graduação em Medicina Veterinária.

Modo de acesso:
Internet. Inclui bibliografia.

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2: Gizele Cristine Nunes do
Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

VITÓRIA CAROLINE ABDALLA DE MENDONÇA SIQUEIRA

**APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ALOGÊNICAS EM
PARÊNQUIMA TESTICULAR EQUINO – CARACTERÍSTICAS
HISTOPATOLÓGICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Área de concentração: Reprodução Animal

Uberlândia, 16 de setembro de 2025

Banca Examinadora:

Renata Lançoni – Doutorado (FMVZ - UFU)

Marcelo Emilio Beletti – Pós- Doutorado (FMVZ – UFU)

Vivian Alonso Goulart – Pós-Doutorado (IBTEC-UFU)

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso

Para eles que permitiram essa realização:

Manoel e Márcia

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus por sempre ter tanto cuidado e planos maravilhosos para mim e especialmente por desde pequeninha ter colocado o sonho de ser uma Médica Veterinária em mim bem antes de saber andar ou falar.

Agradeço com o fundo do meu coração, à minha avó, Márcia Abdalla, por incontáveis coisas que não conseguiria citar mesmo se utilizasse todas as folhas deste manuscrito. Em especial, obrigada por permitir que todos os meus sonhos se tornassem realidade, eu te vivo e sou eternamente grata a tudo.

Agradeço ao meu avô, Manoel Mendonça, por sempre estimular o meu crescimento profissional e pessoal. Por tornar em “ações” todas as oportunidades que tive durante a minha graduação, além de claro, ser o motivo da realização desse sonho aqui em Uberlândia. “Nós daremos um jeito”, ele sempre diz e graças a esse “jeito” finalizo meu curso.

Obrigada tia Vanessa por sempre estar do meu lado e por me ter como sua “filha postiça” mesmo que tenha causado uma infância turbulenta para o seu filho (risos).

Um agradecimento especial ao meu primo Gabriel, por nunca ter me desmentido quando falava para todo mundo que o meu aparelho auditivo tinha o super poder de traduzir os sons dos animais e que por isso eu conversava com todos eles.

Obrigada a todos meus amigos, em especial para a Isabella Cristina, Júlia Augusta, Pâmella Lima e Lara Pieshko por fazerem acreditar que tudo irá dar certo, que para tudo há um tempo para as coisas, que não preciso me desesperar que tudo irá dar certo.

Um agradecimento ao meu namorado, Jonas Camargo, que apareceu na minha vida nos últimos capítulos dessa fase chamada Faculdade e que me mostrou o quão a vida é mais colorida quando compartilhada a dois, e que sim, um futuro em que tenha “algo” além de uma profissão é sim, algo muito bom (e necessário).

Um agradecimento ao Diretório Acadêmico (2022-2024) por ter me moldado como aluna e pessoa para enfrentar as adversidades, muito obrigada Ana Caroline por todo suporte e ajuda em todas as situações de desespero e medo que me encontrou durante a graduação.

E claro, obrigada Professora Renata por ter visto aquela menina que chegou na sua sala lá no 3º período com os olhinhos brilhando pela Reprodução Animal e ter aceitado o desafio que é orientar, obrigada por todos puxões de orelhas, obrigada por me preparar para o que virá a frente como uma futura mestrande, obrigada por tantas oportunidades na aérea de Andrologia Animal desde viagens, visitas a centrais e estágios. Sempre terei orgulho de falar que fui sua orientada.

Agradeço a Tessa (*in memorian*), Pingulinha (*in memorian*) e ao Abdull (*in memorian*) pelos poucos meses que vivemos juntos, vocês me fazem uma grande falta e foi uma perda muito dolorosa no final dessa trajetória.

Pois só quem sonha consegue alcançar
- Luan Santana

RESUMO

O efeito terapêutico promissor das células-tronco mesenquimais (CTM) alogênicas vem sendo observado em diversos setores da medicina veterinária incluindo o campo reprodutivo. Tal efeito é atribuído à sua capacidade de produzir citocinas, fatores de crescimento e outras quimiocinas, que tem efeitos parácrinos no tecido, desempenhando um papel importante na imunomodulação, contribuindo assim para a recuperação e regeneração de outros tipos de células e tecidos do organismo, sendo um potencial tratamento de patologias testiculares em equinos. O presente trabalho tem por objetivo avaliar o efeito e a segurança da aplicação das CTMs alogênicas, derivadas de tecido adiposo, no parênquima testicular de equinos jovens. Para isto foram utilizados 9 animais jovens, com idade entre 3 e 7 anos de raças variadas na região de Uberlândia-MG. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: tratado (aplicação intra-testicular de 3×10^6 CTM), controle (não foi aplicado nada) e grupo shan (aplicação intra-testicular de 3 mL de Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline - DPBS, mesma solução de diluição das CTM). Após 20 a 40 dias da aplicação, os animais foram orquitequiotomizados e nos corpos dos testículos realizaram-se, com bisturi, cortes transversais, com 0,5 cm de espessura entre eles sem seccioná-los por completo e em seguida foram mantidos em formol tamponado a 10%, posteriormente em álcool 70%, e por fim, inclusos em parafina. Para a avaliação histopatológica, os blocos de tecidos foram cortados em micrótomo na espessura de 5 μ m, esses fragmentos foram colocados sobre lâmina e corados por hematoxilina e eosina. Para avaliação, cada lâmina foi dividida por 4 quadrantes e em cada foi medido o diâmetro (em micrômetros) e quantidade, sendo avaliadas as variáveis área do túbulo seminífero, altura do epitélio do túbulo seminífero e quantidade de vasos sanguíneos. Para a análise estatística, os dados foram inicialmente testados quanto às pressuposições de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett). As variáveis que não atenderam a essas condições, mesmo após transformações, foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com a interpretação baseada nas medianas. Já as variáveis que atenderam aos critérios foram avaliadas por análise de variância (ANOVA). Na variável área dos túbulos seminíferos, foi indicado diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$), com mediana superior no grupo controle (0,126), seguido por CTM (0,101) e PBS (0,099), com todos os grupos estatisticamente distintos. Para a altura do epitélio, observou-se diferença significativa ($p < 0,001$), sendo o grupo CTM (0,009) superior aos grupos controle (0,008) e DPBS (0,007), os dois últimos não diferiram entre si. Já a quantidade de vasos

sanguíneos não evidenciou diferença significativa entre os grupos ($p = 0,920$). Visto que nenhum animal apresentou reações adversas pode concluir que a aplicação de CTMs no parênquima testicular de equinos é segura. Os dados também sugerem que o tratamento com CTMs pode estar associado à aceleração da maturação testicular, evidenciada por aumento significativo da altura epitelial, o que pode indicar o potencial regenerativo e imunomodulador das células-tronco mesenquimais em terapias reprodutivas para a espécie equina, sendo necessários mais estudos para tais confirmações.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais; eficiência reprodutiva; garanhão; testículo.

ABSTRACT

The promising therapeutic effect of allogeneic mesenchymal stem cells (MSCs) has been observed in several fields of veterinary medicine, including reproductive medicine. This effect is attributed to their ability to produce cytokines, growth factors, and other chemokines, which exert paracrine effects on tissues, playing an important role in immunomodulation and thus contributing to the recovery and regeneration of other cell and tissue types in the organism. Consequently, MSCs represent a potential therapeutic approach for testicular pathologies in stallions. The present study aimed to evaluate the effect and safety of allogeneic adipose tissue-derived MSC application into the testicular parenchyma of young stallions. A total of nine young animals, aged between 3 and 7 years and of different breeds, located in the region of Uberlândia, Minas Gerais (Brazil), were used. The animals were allocated into three experimental groups: treated (intratesticular application of 3×10^6 MSCs), control (no application), and sham (intratesticular application of 3 mL Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline – DPBS, the same dilution vehicle used for MSCs). Between 20 and 40 days post-application, the animals underwent orchiectomy. Transverse cuts, 0.5 cm thick and not completely sectioned, were made with a scalpel in the testes, which were then fixed in 10% buffered formalin, transferred to 70% ethanol, and subsequently embedded in paraffin. For histopathological evaluation, tissue blocks were sectioned at 5 μ m using a microtome, mounted on slides, and stained with hematoxylin and eosin. Each slide was divided into four quadrants, within which seminiferous tubule diameter (in micrometers), seminiferous tubule area, seminiferous epithelium height, and the number of blood vessels were measured. For statistical analysis, data were initially tested for normality assumptions (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variances (Bartlett's test). Variables that did not meet these assumptions, even after transformation, were analyzed using the non-parametric Kruskal–Wallis test, with interpretation based on medians. Variables that met the assumptions were analyzed using analysis of variance (ANOVA). For seminiferous tubule area, a significant difference was observed between groups ($p < 0.001$), with the control group showing the highest median value (0.126), followed by MSC (0.101) and DPBS (0.099), with all groups being statistically distinct. For epithelial height, a significant difference was also detected ($p < 0.001$), with the MSC group (0.009) being superior to both control (0.008) and DPBS (0.007) groups, which did not differ from each other. The number of blood vessels did not differ significantly among groups ($p = 0.920$). As no animal exhibited adverse reactions, it can be concluded that intratesticular application of MSCs in stallions is safe. The data further suggest that MSC treatment may be

associated with accelerated testicular maturation, as evidenced by the significant increase in epithelial height, which may indicate the regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells in reproductive therapies for the equine species. Further studies, however, are required to confirm these findings.

Keywords: mesenchymal stem cells; reproductive efficiency; stallion; testis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração do trato reprodutivo de garanhão.....	10
Figura 2 - Testículo do garanhão e suas estruturas anexas	12
Figura 3 - As glândulas sexuais acessórias do garanhão.....	13
Figura 4 - Etapas da espermatogênese em ciclos.....	14
Figura 5 - Divisões realizadas pela espermatogônia.....	15
Figura 6 - Maturação dos espermatócitos.....	15
Figura 7 - Fotografia de microscopia eletrônica onde CD são os espermatozoides sendo lançados no lúmen testicular.....	16
Figura 8 - Lâminas histológicas do interstício entre túbulos seminíferos e células de Leydig em diferentes idades, no meio (a,c,e) ou início (b,d,f) da estação de monta.....	17
Figura 9 - Classificação do epitélio seminífero com base no lúmen, em potros utilizando a escala de LS1 a LS7, onde LS1 é o menos desenvolvido e LS7 se assemelha ao túbulo seminífero de um garanhão.....	19
Figura 10 - Concentração de LH e Testosterona	20
Figura 11 - Estrutura do parênquima testicular em jumentos jovens (A) , adultos (B) e idosos (C).....	21
Figura 12 - Aplicação de CTMs no testículo direito.....	25
Figura 13 - Esquema demonstrando a análise das lâminas por quadrantes e seus scores...	25
Figura 14 - Análises realizadas nas lâminas.....	28
Figura 15 - Altura de epitélio seminífero nos diferentes grupos experimentais.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (\pm desvio padrão) e mediana das variáveis histológicas testiculares de equinos: área do túbulo seminífero (μm^2) e altura do epitélio seminífero (μm), analisadas por testes não paramétricos (Kruskal-Wallis), conforme atendimento às pressuposições estatísticas....	29
Tabela 2 - Médias (\pm desvio padrão) da variável histológica quantidade de vasos sanguíneos (μm^2) analisadas por testes paramétricos (ANOVA) conforme atendimento às pressuposições estatísticas.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFU	Universidade Federal de Uberlândia
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
CTMS	Células Tronco Mesenquimais
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 Trato reprodutivo masculino.....	9
2.1.2 Testículo do equino.....	10
2.1.3 Epidídimo.....	11
2.1.4 Glândulas sexuais acessórias	12
2.2 Espermatogênese	13
2.2.1 Histologia do parênquima testicular	16
2.3 A puberdade em equinos	18
2.4 Principais patologias que acometem os testículos de equinos	21
2.4.1 Criptorquidismo	21
2.4.2 Degeneração testicular	22
2.4.3 Neoplasias testiculares	23
3 METODOLOGIA	24
3.1 Animais	24
3.2 Aplicação de CTMs nos testículos	24
3.3 Clivagem	26
3.4 Preparação das lâminas histopatológicas	26
3.5 Análise das lâminas	27
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura é um setor que, no Brasil, possui plantel que supera o número de 5 milhões de cabeças, movimentando assim mais de 16 bilhões de reais ao ano e gera cerca de 3,6 milhões de emprego de forma direta e indireta (Goretti, 2021). Sendo assim, a conduta do Médico Veterinário na Reprodução equina é essencial para que esse setor continue em crescimento, isso porque ele pode atuar nas seguintes áreas: ginecologia, endocrinologia, obstetrícia, neonatologia, pediatria e andrologia (Goretti, 2021). O sistema reprodutor masculino é composto por dois testículos, epidídimo, ducto deferente, glândulas sexuais acessórias, uretra masculina, pênis, escroto e prepúcio (Baljit, 2021). O testículo de garanhões são duas estruturas ovais de tamanhos similares, localizado horizontalmente dentro de uma estrutura semelhante a uma bolsa, chamada escroto e são separados por meio de um septo escrotal (Septimus, 1975), histologicamente eles são compostos por: células intersticiais (denominadas de células de Leydig), essas células são mais dominantes no equino do que em outras espécies ocupando 7% do volume testicular. Também são compostos por túbulos seminíferos, ou seja, túbulos que possuem dois principais tipos celulares básicos: células de Sertoli e células da linhagem germinativa. As de Sertoli nutrem, protegem e sustentam as células espermatogênicas que também fagocitam os espermatozoides degenerados. Já as células espermáticas são distribuídas de formas distintas e realizam o desenvolvimento e diferenciação dos espermatozoides (Souza, 2024).

Nesse contexto, a eficiência reprodutiva dos garanhões deve ser adequada para ser pontual e certa, garantindo assim boas taxas de concepção e menores gastos por parte dos criadores. Sendo assim, alterações na fertilidade como a degeneração testicular desses animais podem ter um efeito negativo em todo o mercado, assim como no aproveitamento de genéticas importantes para determinadas raças. A enfermidade mais comum que afeta a fertilidade nos machos domésticos, incluindo o garanhão, é a degeneração testicular que consiste no processo de deterioração do parênquima do testículo com consequente perda de sua função (Sancler da Silva, 2021). Histopatologicamente, os testículos degenerados apresentam vacuolização citoplasmática, perda da arquitetura do epitélio seminífero, diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, pode também haver presença de células espermáticas imaturas no lúmen dos túbulos, em casos mais graves há um aumento da perda de células germinativas do túbulo, fibrose e calcificação do parênquima testicular (Turner, 2007).

As células tronco mesenquimais (CTMs) caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir vários tipos celulares necessários num processo de reparação, como osteoblastos, condroblastos, células musculares, medula, tendão/ligamento e tecido adiposo (Pittenger et al., 1999). Além disso, um estudo recente demonstrou que, sob condições específicas de cultura, essas células também podem se diferenciar em hepatócitos, neurônios, células musculares cardíacas e até mesmo em astrócitos (Berebichez-Fridman; Montero-Olvera, 2018). As CTMs expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com as demais células (Huss, 2000; Bobis et al., 2006). Essas moléculas atuam modulando a resposta inflamatória, angiogênese e mitose das células envolvidas no processo de reparação tecidual (Wan et al., 2008; Caplan, 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais alogênicas, derivadas de tecido adiposo, no parênquima testicular de equinos, de raças variadas com idades entre 3 e 7 anos, por meio de análises histopatológicas da área do túbulo seminífero, altura do epitélio, presença do lúmen e quantidade de vasos sanguíneos.

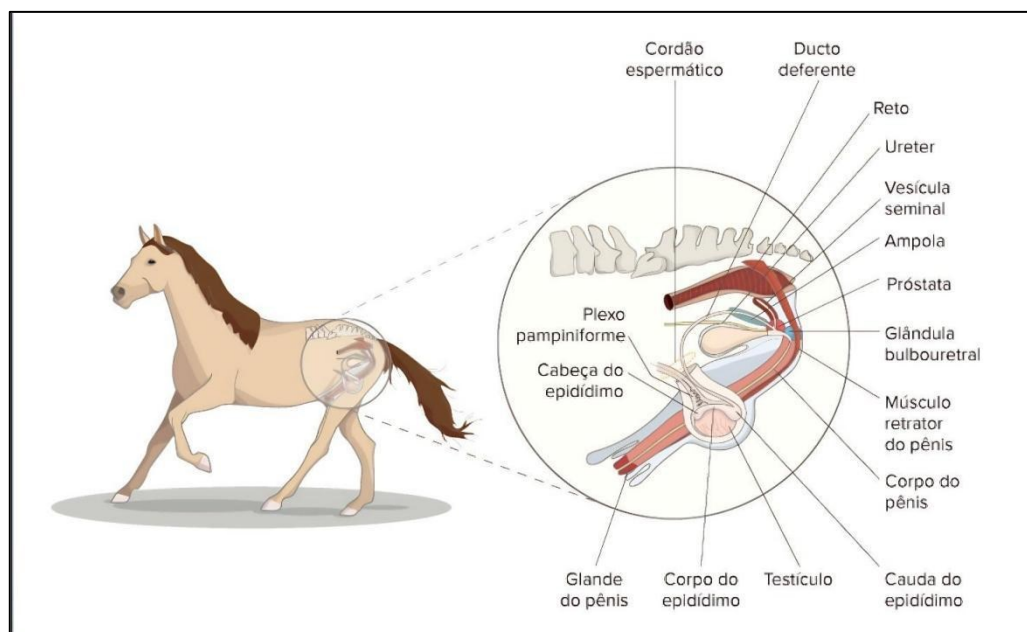
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Trato reprodutivo masculino

O sistema reprodutor masculino possui órgãos responsáveis pelo desenvolvimento, amadurecimento, transporte e armazenamento dos gametas masculinos (Köning, 2021).

Os órgãos do trato reprodutivo masculino consistem em dois testículos, cada um suspenso por um cordão espermático e, externamente, pelo músculo cremaster, dois epidídimos, dois ductos deferentes cada um com uma ampola, glândulas vesiculares pareadas com a próstata e glândulas bulbouretrais, pênis associado com a uretra, corpo cavernoso peniano e músculo retrator do pênis [Figura 1] (Amann, 2011).

Figura 1 - Ilustração do trato reprodutivo masculino de garanhão



Fonte: Lançoni, 2011

2.1.2 Testículo do equino

Gônadas masculinas pares que se iniciam embriologicamente no primórdio gonadal na face medial do mesonefro. Posteriormente, essas gônadas precisam migrar de dentro da cavidade abdominal para a camada do processo vaginal, que está recoberto pelo escroto (Köning, 2016).

Em alguns cavalos jovens, antes de descer diretamente para o processo vaginal, eles permanecem na região inguinal (Arighi, 2007). A descida total dos testículos para a cavidade escrotal é imprescindível para a produção fisiológica da espermatogênese, devido a temperatura que cai quando comparado a abdominal, a condição que leva a ausência da descida de um ou dos dois testículos é denominada criptorquidismo (Köning, 2016).

O testículo no equino, se localiza na região pubiana. Eles ficam em uma direção dorso ventral quando são puxados pelo músculo cremaster, também estão ligados à camada parietal do processo vaginal e pela cauda do epidídimo (Souza, 2024), sua posição ideal é dada quando ao apalpar essa estrutura, é apalpado também a cauda do epidídimo. (Septimus, 1975).

Histologicamente, fazem parte da estrutura dos testículos: as células intersticiais e os túbulos seminíferos. Essas células são compostas pelas células de Leydig (Delmann, 1982), sua função é secretar testosterona (Abrahamsohn, 2023). Os túbulos seminíferos são túbulos

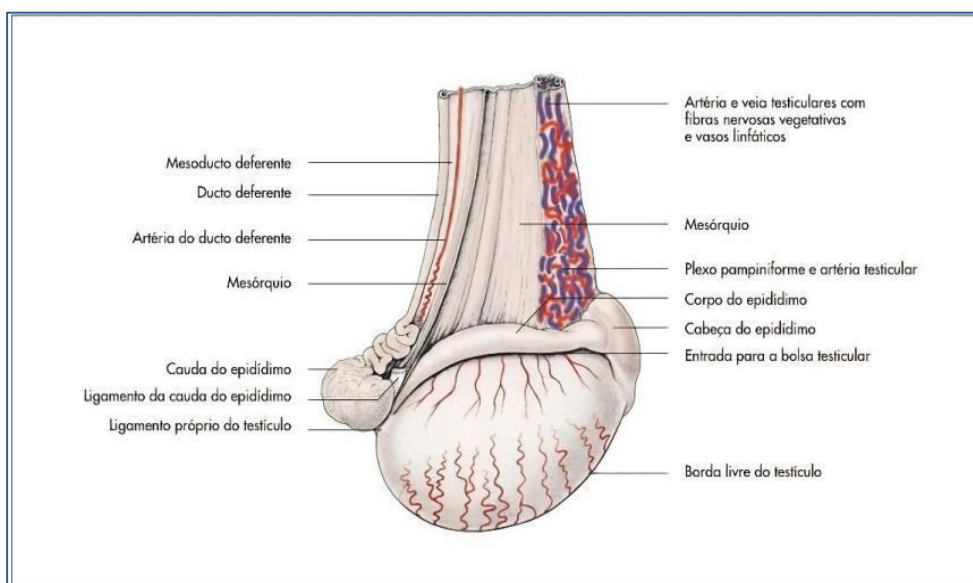
contorcidos e é lá que ocorrem toda espermatogênese que levam a formação dos espermatozoides (Abrahamsohn, 2023) e são compostos por dois tipos celulares: células de Sertoli, que dão sustentação e possui função protetiva e nutritiva das células da linhagem espermática, além de fagocitarem os espermatozoides degenerados e as células germinativas que fazem todo o processo de desenvolvimento e diferenciação até os espermatozoides (Delmann, 1982).

2.1.3 Epidídimo.

O epidídimo é dividido anatomicamente em três partes: cabeça, corpo e cauda [Figura 2]. A cabeça se curva ao redor do testículo e lateralmente, é plena e possui um formato semelhante a letra “J” sendo intimamente ligada ao testículo. Já o corpo do epidídimo é cilíndrico e liga dorsalmente a superfície do epidídimo, por fim, a sua cauda é grande e bulbosa, associada ao polo caudal do testículo (Köning, 2021).

Quanto a sua função, suas três partes trabalham de formas conectadas: o ducto do epidídimo (composto pela cabeça, corpo e cauda) faz o amadurecimento dos espermatozoides, absorvem o fluido testicular, os fragmentos celulares sofrem fagocitose e nutrientes são secretados para os espermatozoides por meio de vesículas chamadas epidimossomos, que transferem proteínas e outras moléculas essenciais para a sua capacitação (Sullivan, 2013). Por fim, é na porção da cauda que os espermatozoides são armazenados até o momento da ejaculação. Todo o epidídimo em equinos mede de aproximadamente 72 (setenta e dois) a 81 (oitenta e um) metros. (Köning, 2021)

Figura 2 - Testículo de garanhão e suas estruturas anexas



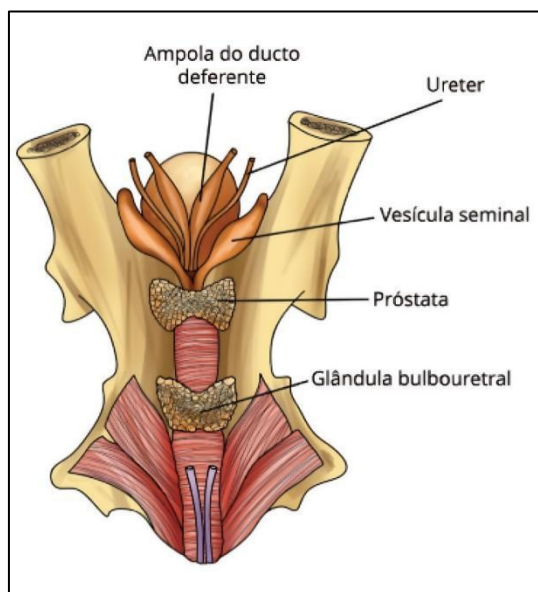
Fonte: Köning, 2016.

2.1.4 Glândulas sexuais acessórias

O equino possui todas as glândulas acessórias [Figura 3], sendo elas: próstata, bulbouretral, ampola e glândulas vesiculares. Todas juntas contribuem para a formação do plasma seminal (Amann, 2011).

As ampolas estão presentes em pares: seu ducto excretor se une ao ducto deferente e forma o chamado ducto ejaculatório (Köning, 2016). Todas essas glândulas possuem fibras musculares inervadas pelo sistema autônomo, o que possibilita a expulsão da secreção, que, ao final, se torna o plasma seminal (Köning, 2016). Cada uma delas secreta uma quantidade de proteínas essencial para a fertilidade dos espermatozoides (Amann, 2011).

Figura 3 - As glândulas sexuais acessórias no garanhão.

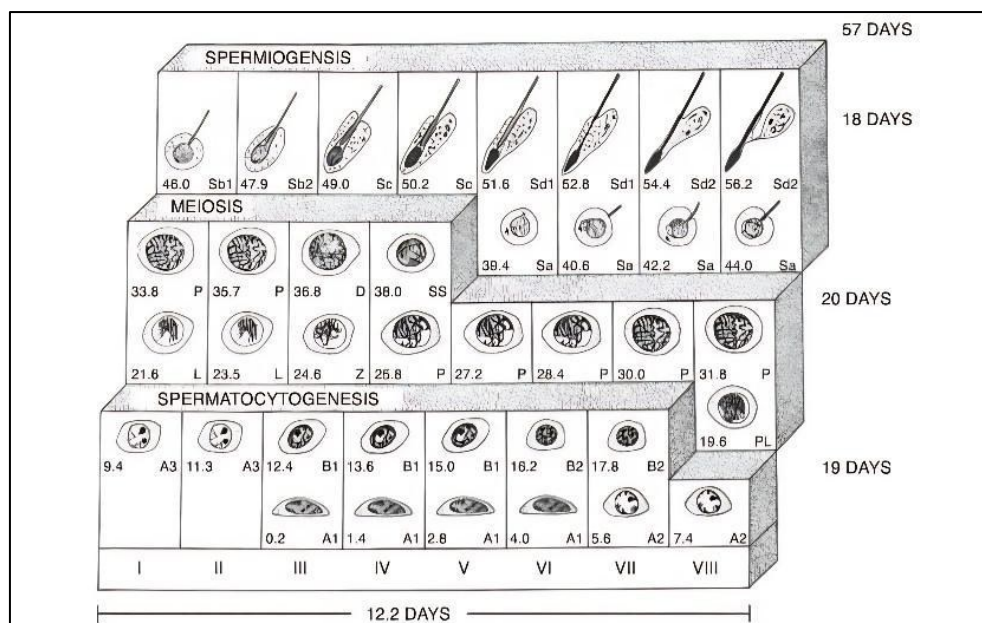


Fonte: Souza, 2024

2.2. Espermatogênese

O processo de divisão e diferenciação que ocorre no túbulo seminífero, formando os espermatozoides [Figura 4] é chamado de Espermatogênese (Johnson,1997). Ela é essencial para a necessidade reprodutiva de cada animal, é regulada pelo eixo-hipotalâmico-hipofisário-gonodal.

Figura 4 - Etapas das espermatogêneses em ciclos



Legenda: A ilustração representa o ciclo espermatogênico, em que cada quadrado indica uma fase do desenvolvimento celular, desde as espermatogônias até a formação das espermátides.

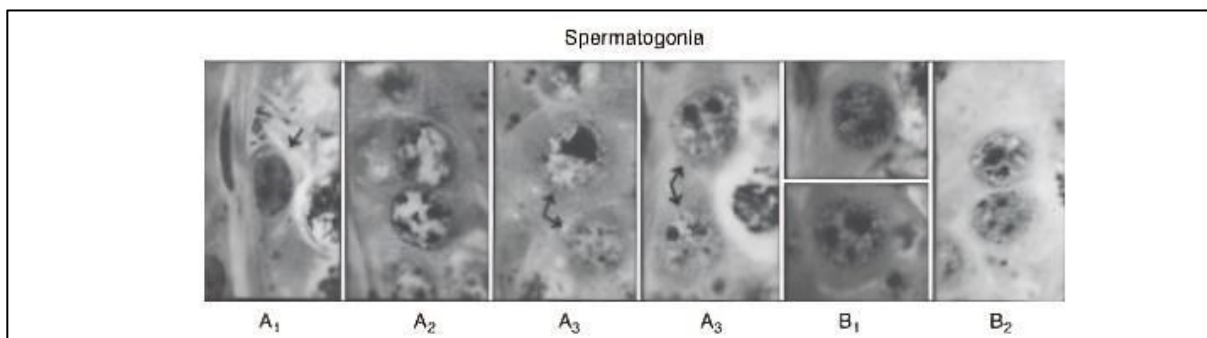
Fonte: Varner; Johnson, 2011

Todo esse processo é de extrema complexidade porque envolve a proliferação das células germinativas, diferenciação e apoptose dessas células (Varner e Johnson, 2011).

O ciclo espermatogênico, que acontece no epitélio seminífero, representa uma série de mudanças que é dividida em estágios (Abo-Elmaksoud, 2005). A avaliação de cada estágio (chamado de ciclos espermatogênicos) fornece a eficiência espermatogênica do animal que está sendo avaliado (Johnson, 1995).

Cada ciclo é necessário para a diferenciação de uma célula diploide em uma célula haploide altamente diferenciadas (Varner, 1991). Além disso, ocorrem muitas mudanças transcricionais nas células (Johnson, 1991). Sendo assim, temos uma primeira célula (espermatogônia) denominada A1, que por meio de mitoses, se divide em A2, A3, depois em B1 e B2 [Figura 5] (Varner e Johnson, 2011).

Figura 5- Divisões realizadas pela espermatogônia



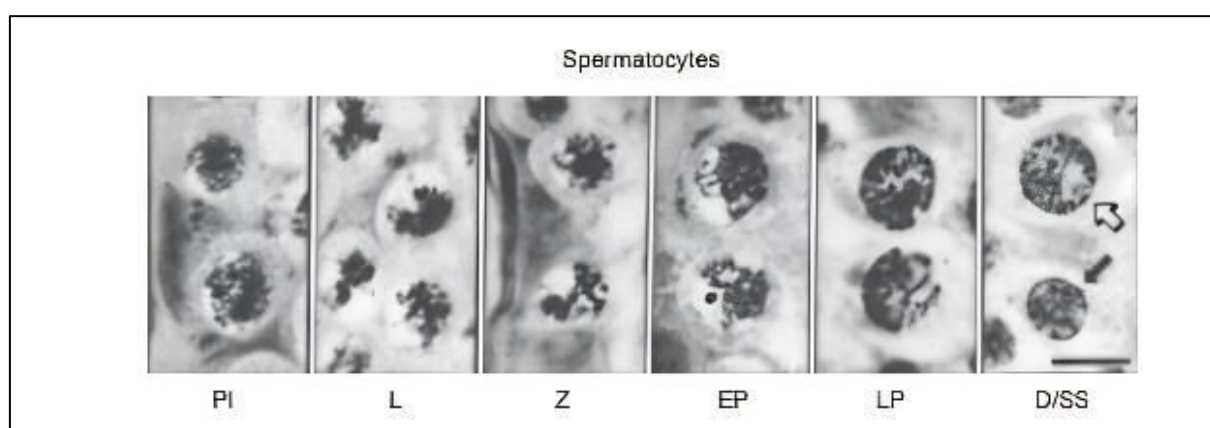
Legenda: Na figura mostra as fases da espermatogônia onde temos a espermatogônia A₁ que irá por meio de mitoses, tornar, respectivamente, A₂, A₃, B₁ e B₂.

Fonte: Varner; Jonhson, 2011

Após se tornar uma espermatogônia B₂, a próxima fase é a espermiogênese em que a célula passa por processo de meiose. Posteriormente, acontecem os processos mais críticos da maturação espermática, incluindo a remodelação nuclear por meio da condensação da cromatina, a formação do flagelo, o desenvolvimento do acrossomo e a eliminação de uma porção significativa do citoplasma (Varner; Johnson, 2011).

Logo após essa primeira fase, as espermatogônias entram em uma fase meiótica em que se tornam espermatídes. E é durante esse processo as espermatídes [Figura 6] tornam espermatozoides (Varner; Jonhson, 2011).

Figura 6- Maturação dos espermatócitos



Legenda: A ilustração demonstra as fases da primeira fase da meiose, denominada de Prófase 1, onde nas siglas: Preleptóteno (PI), leptóteno (P), zigóteno(Z), paquíteno inicial (EP), paquíteno tardio (LP)

Fonte: Varner; Jonhson, 2011

Os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos [Figura 7] (Varner; Jonhson, 2011) para dar continuidade a todo trajeto e mudanças até a chegada dos espermatozoides com o plasma seminal na cauda do epidídimo.

Figura 7- Fotografia de microscopia eletrônica de varredura onde CD são os espermatozoides.



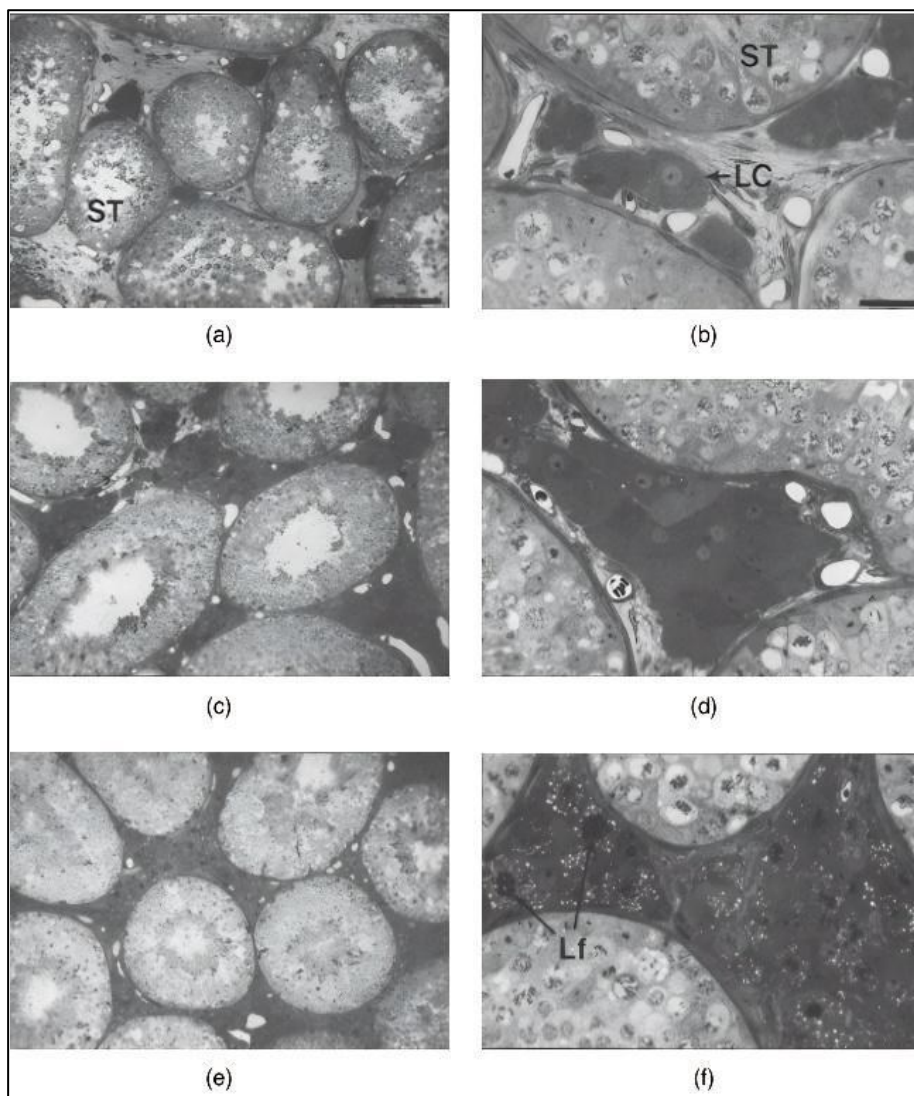
Fonte: Johnson, 2011

2.2.1 Histologia do parênquima testicular

Histologicamente, o parênquima testicular é composto por túbulos que possuem um epitélio estratificado com dois tipos celulares principais: célula de Leydig, que ocupam os espaços entre os túbulos seminíferos e células de Sertoli, que possuem função nutritiva, protetora, fagocítica (Dellmann, 1982). Adicionalmente são responsáveis por controlar a maturação e migração das células germinativas e por regular a secreções entre compartimentos tubulares e intersticiais estabelecendo a barreira hemato-testicular (Monteiro CD; Bicudo SD; Toma HS, 2010).

Em um corte transversal [Figura 8], nota-se que o testículo é composto pela túnica albugínea (TA), parênquima testicular (TP), veia central com tecido conjuntivo (CV), diversos túbulos seminíferos enrolados (ST) com células de Sertoli (SC), com diversas células germinativas (espermátogônias – Sg; espermátócitos primários – T; espermátides primárias – Sa; espermátides secundárias-Sd2). Pelo interstício, entre os túbulos seminíferos, possui células de

Figura 8 - Lâminas histológicas do interstício entre túbulos semíferos e células de Leydig em diferentes idades, no meio (a,c,e) ou início (b,d,f) da estação de monta.



Legenda: As siglas significam, respectivamente, túnica albugínea (TA), parênquima testicular (TP), veia central com tecido conjuntivo (CV), diversos túbulos seminíferos enrolados (ST) com células de Sertoli (SC), com diversas células germinativas (espermatogônias – Sg; espermatócitos primários – T; espermátides primárias – Sa; espermátides secundárias-Sd2). Pelo interstício, entre os túbulos seminíferos, possui células de Leydig (LC), vasos sanguíneos (BV), células mioides (MC) e vasos linfáticos (LV).

Fonte: Jonhson,1981

2.3 A puberdade em equinos

A puberdade se inicia, aproximadamente, aos 6 meses de vida do cavalo onde ele começa a ter mudanças hormonais e comportamentais que irão o torná-lo apto para uma vida reprodutiva (Amann, 2011).

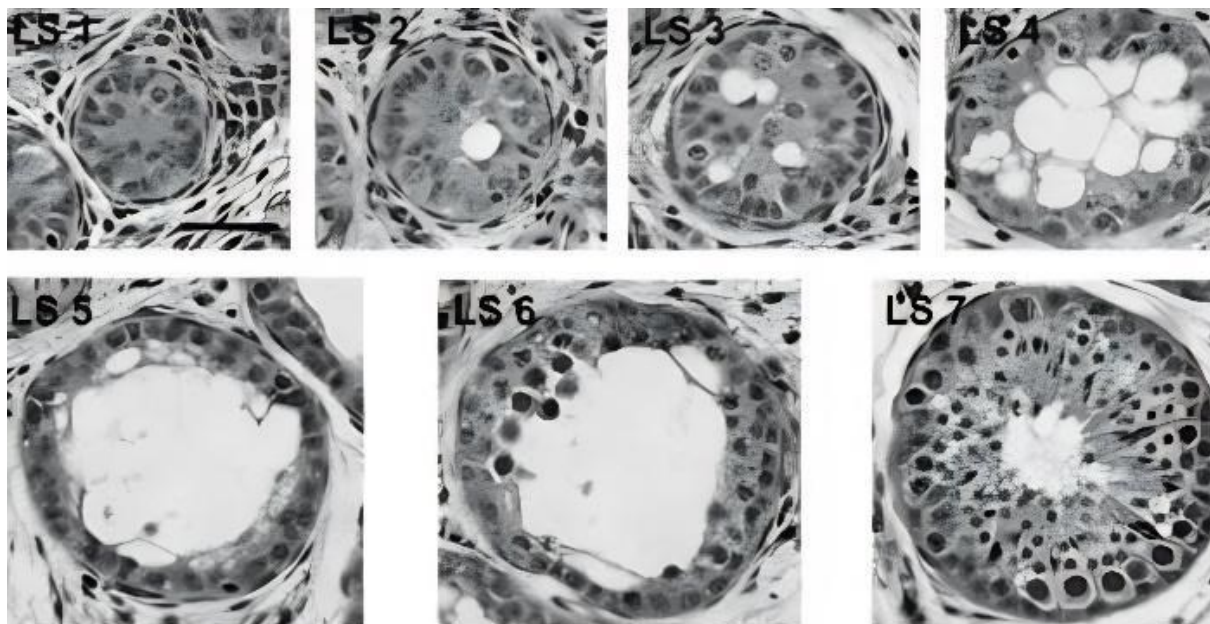
O final, do que seria, a fase infantil nos equinos é caracterizada pelo declínio do número de gonócitos devido a ação da gonadotrofina que estimula a hipófise anterior a secretar LH (Hormônio luteinizante) e FSH (Hormônio folículo estimulante), no qual LH vai agir diretamente sobre a célula de Leydig, estimulando a produzir testosterona dando assim início a espermatogênese (Amann,1981).

Entretanto, a idade em que o cavalo se torna de fato um garanhão, é individual para cada animal, alguns só estão aptos para uma iniciar a vida reprodutiva, considerando a qualidade do ejaculado, comportamento de monta aos 2 anos, já outros atingem a maturidade sexual aos 4 anos (Amann, 2011).

Devido à ausência de estudos a respeito da ação do eixo-hipotalâmico-hipofisário exclusivamente em equinos, suas atividades nessa espécie são deduzidas a partir de informações nas outras espécies como touros e carneiros (Lacroix,1977).

Antes de atingir a maturidade sexual, o eixo secreta pouco LH enquanto FSH e testosterona são estimulados, em maior concentração, na fase transicional entre a fase infantil e puberdade, chamada de fase pré-púbere (McCarthy,1979). Nessa fase, histologicamente, a avaliação da espermatogênese se dá com base no diâmetro do lúmen no túbulo seminífero [Figura 9] (Heninger,2004).

Figura 9 - Classificação do epitélio seminífero com base no lúmen, em potros. utilizando a escala de LS1 a LS7, onde LS1 é o menos desenvolvido e LS7 se assemelha ao túbulo seminífero de um garanhão.



Legenda: Em “LS 1”, o túbulo seminífero possui apenas gonócitos/espermatogônias, enquanto as células de Sertoli estão espalhadas aleatoriamente pelos túbulos e aparentemente sem vacúolos. Na figura “LS 2” o túbulo está com gonócitos/espermatogônias e células de Sertoli localizadas centralmente, significando que houve uma migração para a parte mais basal. Ao lado, temos “LS 3” que diferentemente do que foi encontrado anteriormente, o túbulo possui espermatócitos iniciais, vários vacúolos aleatórios e isolados. Já em “LS 4” foi visto o túbulo com vários vacúolos agregados, com presença de espermatócitos avançados. Na avaliação seguinte, identificada por “LS 5” foi encontrado túbulo com um lúmen aberto, epitélio seminífero baixo apenas contendo espermatogônias e células de Sertoli. Antes da última caracterização, em “LS 6” o túbulo foi caracterizado por um lúmen repleto de células por células germinativas e, por fim, em “LS 7” foi caracterizado todas as células germinativas e agora pode ser definido como epitélio seminífero, de uma forma semelhante ao que é encontrado em cavalos adultos.

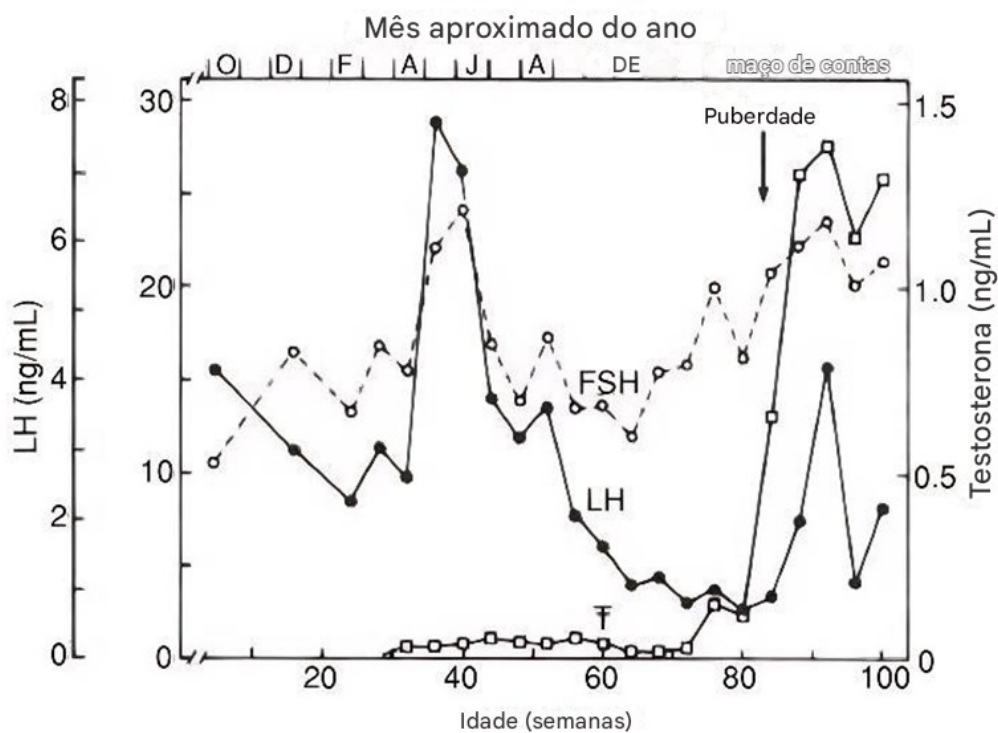
Fonte: Heninger, 2004.

Entretanto, a interação entre as células de Leydig e o epitélio seminífero também são desconhecidas para os garanhões (Amann, 2011), mas em outras espécies, os gonócitos devem ser expostos à ação do FSH para ter estimulação androgênica para se diferenciar em células de Sertoli e serem capazes de passar pela espermatogênese (Amann, 2011).

Um estudo dosou as concentrações dos hormônios coletando sangue da jugular de 10 cavalos [Figura 10] e mostraram que a estimulação de andrógenos são fornecidas pelo meio

intratesticular na idade de 1 ano e 4 meses, enquanto a capacidade de ejaculação contendo espermatozoides acontecem, em média, na idade 1 ano e 6 meses (Amann, 2011).

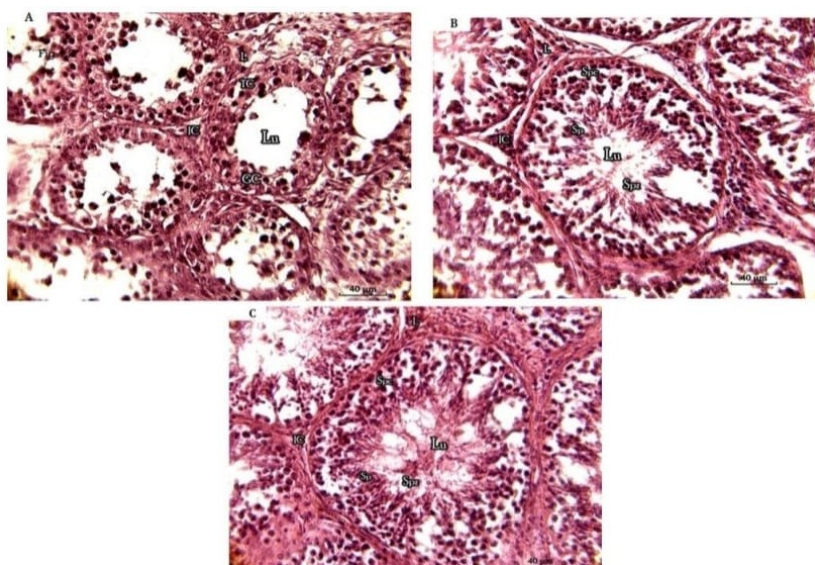
Figura 10 - Concentração de LH e Testosterona



Fonte: Adaptado de Amann, 2011

Em um estudo cujo objetivo foi a comparação dos parâmetros histológicos de jumentos (*Equus asinus*) localizados na Argélia, país no Norte da África, ao longo das estações do ano e também em animais de diferentes idades [Figura 11], foi observado que, em animais muito jovens, o lúmen estava vazio e os túbulos seminíferos apresentavam algumas células germinativas. Por outro lado, em animais mais velhos, foi observado um maior diâmetro tubular, com maior espessura de células germinativas e o lúmen repleto de espermatozoides (Aissanou e Ayad, 2022).

Figura 11: Estrutura do parênquima testicular em jumentos jovens (A), adultos (B) e idosos(C)



Legenda: Em jumentos jovens (A) observou-se o túbulo seminífero com poucas células germinativas e um lúmen sem presença de espermatozoides, já em jumentos adultos (B) o túbulo seminífero está repleto de células germinativas, com uma espessura maior e o lúmen está repleto de espermatozoide, por fim, em jumentos idosos (C) a mesma observação foi vista em comparação aos jumentos adultos, porém com uma maior concentração de células.

Fonte: Aissanou e Ayad, 2022.

2.4 Principais patologias que acometem os testículos de equinos

As principais patologias que acometem os testículos dos garanhões são, respectivamente, criptorquidismo, degeneração testicular e neoplasias testiculares (Nascimento, 2021).

2.4.1 Criptorquidismo

Se trata da ausência de um ou ambos testículos na bolsa testicular, essa patologia se dá devido a não migração do testículo da cavidade abdominal para a bolsa escrotal (Nascimento, 2021) que tem relação direta com o aumento de gonadotrofinas (Arighi, 2007).

Diferente dos demais animais domésticos, nos equinos é esperado que ocorra a descida dos testículos para o escroto no período de 30 dias antes do nascimento ou 10 dias após o parto

(Amman,1981), fazem parte desse processo três estruturas anatômicas: processo vaginal, gubernáculo e canal inguinal (Arighi, 2011).

O processo vaginal se trata de uma invaginação na região inguinal, ela sai da parede abdominal pelo canal inguinal e passa para o escroto. O gubernáculo ajuda a passagem dos testículos do processo vaginal para o escroto (Arighi, 2011). Após 5 meses de gestação o gubernáculo se alarga e força a passagem do testículo por ele e no 8º mês de gestação a abertura do gubernáculo diminui (Sisson, 1975).

Foi relatado uma incidência alta de criptorquidismo em cavalos da raça Quarto de Milha, entretanto, caso tenha apenas um testículo retido (criptorquidismo unilateral) eles são férteis, desde que a espermatogênese aconteça normalmente no testículo localizado na bolsa testicular (Leipold, 1986).

Histologicamente, os diâmetros dos túbulos seminíferos foram significativamente maiores nos testículos escrotais do que nos testículos retidos (Samper, 2007), enquanto a análise das células espermatogênicas dos testículos retidos foram estatisticamente maiores nos testículos escrotais (Samper, 2007).

2.4.2 Degeneração testicular

Contribui para diminuição da fertilidade nos animais (Nascimento, 2021), nos garanhões a principal causa de degeneração testicular (DT) é após algum trauma testicular (degeneração testicular traumática) ou ainda devido a envelhecimento do garanhão (degeneração testicular idiopática- DTI), entretanto, o tratamento da última precisa ser estudada (Turner, 2019).

No ejaculado de garanhões com degeneração testicular, observam-se alterações sutis no número de espermatozoides, aumento da quantidade de células espermáticas imaturas e alterações endocrinológicas detectadas por meio de análises sanguíneas coletadas da veia jugular. Além disso, verifica-se maior frequência de defeitos morfológicos nos espermatozoides, associada a concentrações elevadas de FSH e LH e níveis reduzidos de estradiol (Turner, 2007).

Em estudo no qual a degeneração testicular foi induzida por hipertermia escrotal, utilizando uma bolsa térmica acoplada a um secador elétrico, observou-se, por meio de biópsias testiculares, significativa perda estrutural nos túbulos seminíferos em comparação ao grupo controle (Silva, 2017). As análises histopatológicas revelaram diminuição acentuada da espermatogênese, ausência de espermatozoides na luz tubular, desorganização acentuada da

arquitetura dos túbulos, adelgaçamento da parede, presença de vacúolos moderados e edema de intensidade moderada (Silva, 2017).

2.4.3 Neoplasias testiculares

As neoplasias mais frequentes são nas células de Sertoli (Sertolioma), células de Leydig (leydigocitoma) e células seminiais (seminoma), sendo os cavalos criptorquidas aqueles com maior predisposição a esses tumores (Nascimento, 2021).

2.5 Células tronco mesenquimais alogênicas

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;) e do endométrio de éguas (Falomo et al., 2015; Navarrete et al., 2020; Tongu et al., 2021) com resultados promissores.

Dessa forma, a literatura evidencia a necessidade de avanços relevantes sobre a histologia do testículo equino de animais saudáveis, a respeito das principais patologias que comprometem a fertilidade desses animais, em especial a degeneração testicular apresenta avanços em seus estudos. Além disso, observa-se que as células-tronco mesenquimais têm se mostrado uma alternativa promissora no tratamento de afecções reprodutivas por sua capacidade regenerativa e imunomoduladora. No entanto, ainda há poucos estudos quanto ao uso dessas células no parênquima testicular de animais, em especial de equinos, principalmente em relação à segurança da aplicação e aos efeitos sobre a maturação testicular. Nesse contexto, o presente estudo busca contribuir para a elucidação desse tema, avaliando os efeitos histopatológicos da aplicação de células-tronco mesenquimais alogênicas no testículo equino, oferecendo subsídios para futuras aplicações clínicas na reprodução animal.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

A amostra do presente estudo consistiu em 18 testículos de nove equinos, com faixa etária de 3 a 7 anos, oriundos de procedimentos de orquiectomia em propriedades rurais da região de Uberlândia sem raça definida.

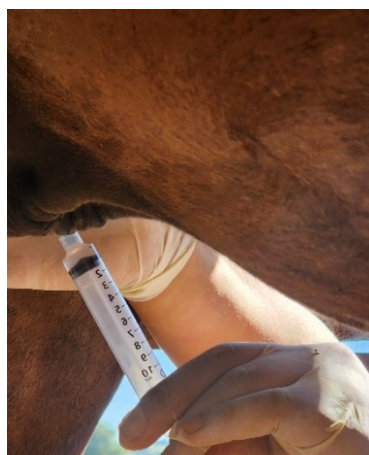
3.2 Aplicação de CTMs nos testículos

Primeiramente, foi feita a identificação e levantamento de dados de cada animal com as informações: idade, raça, escore de condição corporal, palpação dos testículos, avaliação ultrassonográfica para descartar qualquer afecção já pré-existente. Em seguida foram realizadas as aplicações de CTMs onde aplicou-se 3×10^6 células Tronco Mesenquimais suspensas em 3 mL de DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) no testículo direito, utilizando uma agulha hipodérmica BD® 25 \times 0,6 mm. O procedimento foi executado na região medial da curvatura testicular, entre a cabeça e a cauda do epidídimo, após aplicação tópica de pomada anestésica à base de lidocaína e realização da antisepsia prévia. O testículo esquerdo foi considerado como grupo controle, recebendo apenas avaliação e manipulação sem aplicação de substâncias. Em dois animais, realizou-se aplicação de 3 mL DPBS no testículo esquerdo, compondo o grupo sham. e após 20 a 40 dias, das aplicações, os animais foram submetidos a orquiectomia, e seus respectivos testículos (Figura 12) foram cortados transversalmente (para

ruptura da túnica albugínea e penetração dos fixadores), coletados e armazenados durante 24h em formol Salino 10%. Após 24h, eles foram transferidos para potes contendo Álcool 70% até o dia da clivagem. A realização do trabalho seguiu o esquema demonstrado a seguir (Figura 13).

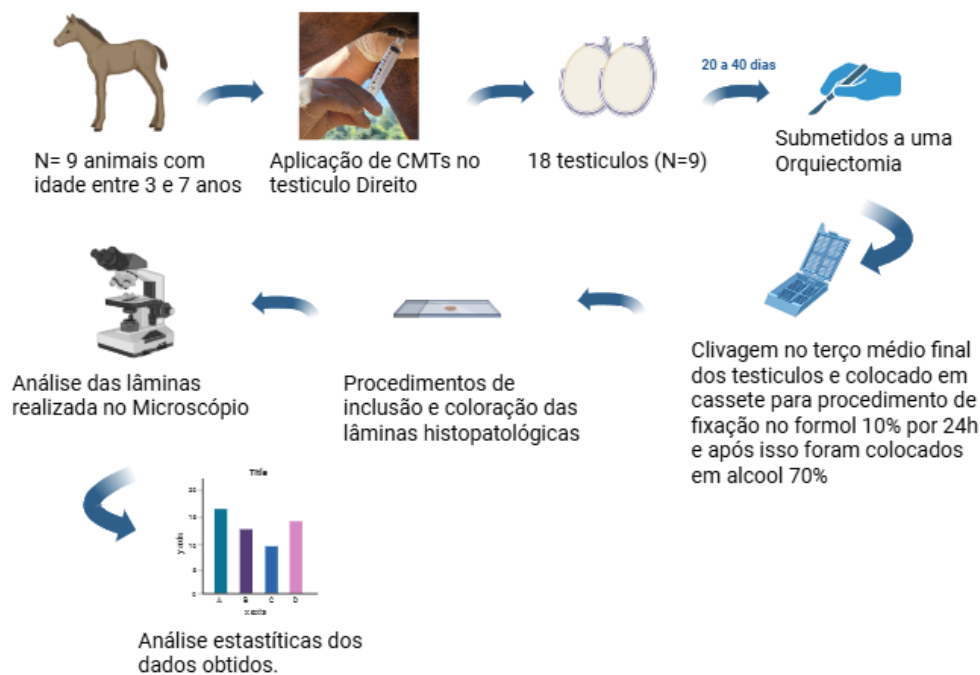
O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo de número 23117.018883/2023-05.

Figura 12: Aplicação de CTMs no testículo direito



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 13: Esboço das ações realizadas neste estudo.



Fonte: Própria Autoria

3.3 Fragmentação dos cortes histológicos

Para a fragmentação, utilizaram-se 42 cassetes, uma pinça anatômica e lâminas próprias para a realização dos cortes de tecidos, que foram analisados quanto às suas características histopatológicas. No terço médio final de cada testículo, realizou-se um corte vertical de aproximadamente 2 mm e, em seguida, outro corte, de modo que o tamanho ficou ideal para o cassete. Identificou-se cada cassete com as três primeiras letras do nome do animal e, ao lado, a letra “D” ou “E” fazendo referência ao antímero do testículo.

3.4 Preparação das lâminas histopatológicas

No Laboratório de Técnicas Histológicas realizou-se o preparo e corte das lâminas. Primeiramente, realizou-se a inclusão do tecido, com os cassetes contendo tecidos do parênquima testicular, que passaram por uma série de processamentos, nesta ordem:

1. Álcool 85% por 30 minutos;
2. Álcool 95% por 30 minutos;
3. Álcool absoluto 1 por 1 hora;
4. Álcool absoluto 2 por 1 hora;
5. Álcool absoluto 3 por 1 hora;
6. Xilol 1 por 1 hora;
7. Xilol 2 por 1 hora;
8. Parafina 1 por 30 minutos;
9. Parafina 2 por 1 hora.

No dia seguinte, com o tecido já incluído na parafina, efetuaram-se cortes no micrótomo e, assim, foram confeccionadas 1 lâmina de cada testículo, corado com Hematoxilina Eosina (HE). Posteriormente, realizou-se a retirada das parafinas das lâminas, mergulhando-as por um intervalo de tempo, o primeiro grupo que recebeu a coloração HE seguiu o seguinte protocolo:

1. Xilol III por 15 minutos;
2. Xilol II por 15 minutos;
3. Xilol I por 15 minutos;
4. Álcool absoluto III por 1 minuto;
5. Álcool absoluto II por 1 minuto;
6. Álcool absoluto I por 1 minuto;

7. Álcool 95% por 1 minuto;
8. Álcool 85% por 1 minuto;
9. Álcool 75% por 1 minuto.

Após a retirada da parafina das lâminas, realizou-se a coloração das mesmas, da forma que elas foram “mergulhadas” em:

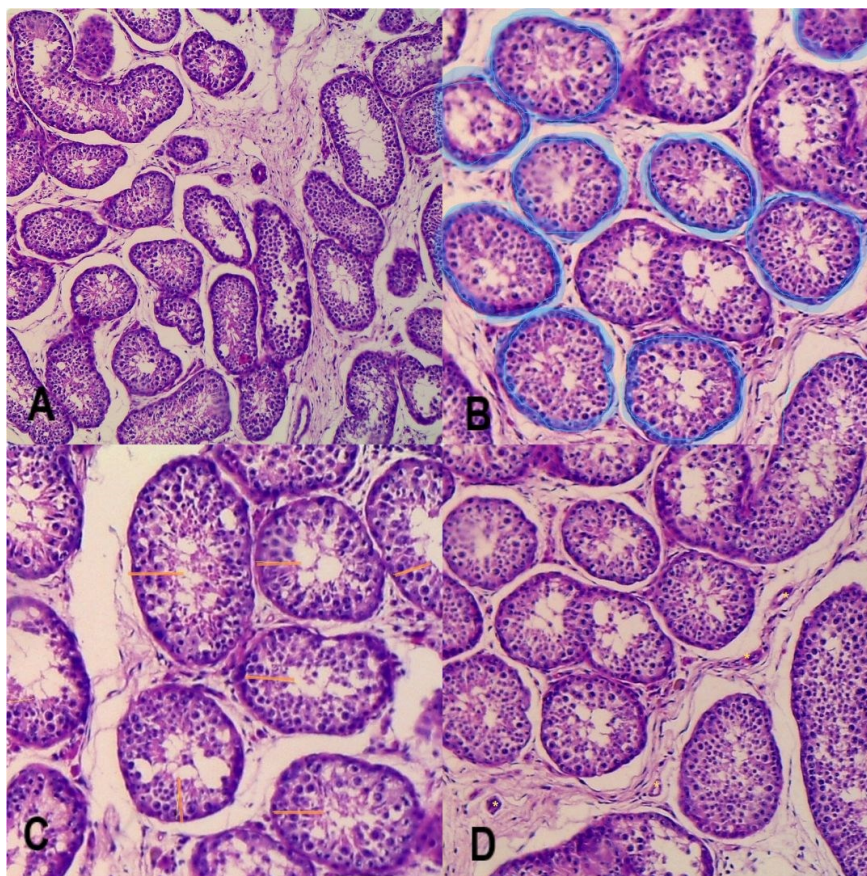
1. Corante Hematoxilina de Harry por 4 minutos;
2. Enxágue em torneira semiaberta por 10 minutos;
3. Eosina amarelada por 30 segundos;
4. Enxágue em torneira semiaberta por 10 minutos.

Depois de coradas, foi colado lamínula com a Goma de Damar e as lâminas foram colocadas na estufa para secarem, após a secagem o parênquima testicular está apto para a análise.

3.5 Análise das lâminas

Para a avaliação da segurança do uso de Células Tronco Mesenquimais no parênquima testicular de equinos, foi analisado as seguintes características: área do túbulo seminífero, altura do epitélio e quantidade de vasos sanguíneos (Figura 14). Essa análise foi feita por meio do programa IMAGE J para analisar medidas como: área do túbulo seminífero, quantidade de vasos sanguíneos, altura do epitélio seminífero. A medida desses parâmetros foi realizada por meio de pixels convertidos para micrômetros, onde 740 pixels equivalem a 50 micrometros (Fonzar, 2010)

Figura 14: Análises histopatológicas das características: área do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero realizadas nas lâminas do testículo equino



Legenda: Fotos retiradas de lâminas de um testículo tratado com CTMs, (A) visão geral do testículo; (B) medição de áreas dos túbulos seminíferos; (C) medida de área da altura do epitélio do tubúlo semífero e por fim, (D) contagem de quantidade de vasos sanguíneos.

Fonte: Própria Autoria

3.6 Análise Estatística

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 e reavaliados, ou submetidos à análise não paramétrica. As diferenças entre tratamentos foram obtidas por meio do teste de Tukey (paramétrica) ou Kruskal-Wallis (não-paramétrica). Todas as análises foram realizadas pelo software R. A probabilidade de $P \leq 0.05$ foi considerada como diferença significativa. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (D.P.) e mediana.

4 RESULTADOS

As variáveis histológicas analisadas demonstraram respostas distintas entre os grupos avaliados. A área dos túbulos seminíferos juntamente com a altura do epitélio seminífero (Tabela 1) foi analisada por meio do teste de Kruskal-Wallis, uma vez que não atenderam às pressuposições de normalidade e homogeneidade das variâncias.

Tabela 1– Média (\pm desvio padrão) e mediana das variáveis histológicas testiculares de equinos: área do túbulo seminífero (μm^2) e altura do epitélio seminífero (μm), analisadas por testes não paramétricos (Kruskal-Wallis), conforme atendimento às pressuposições estatísticas.

Variável histológica	Controle		Tratado		DPBS	
	Média (\pm DP)	Mediana	Média (\pm DP)	Mediana	Média (\pm DP)	Mediana
Área do Túbulo Seminífero (μm^2)	0,129043 (0,037689)	0,126 ^a	0,114567 (0,043919)	0,101 ^b	0,10419 (0,043919)	0,099 ^c
Altura do Epitélio seminífero (μm^2)	0,008493 (0,003232)	0,008 ^b	0,011863 (0,007823)	0,009 ^a	0,009703 (0,00755)	0,007 ^b

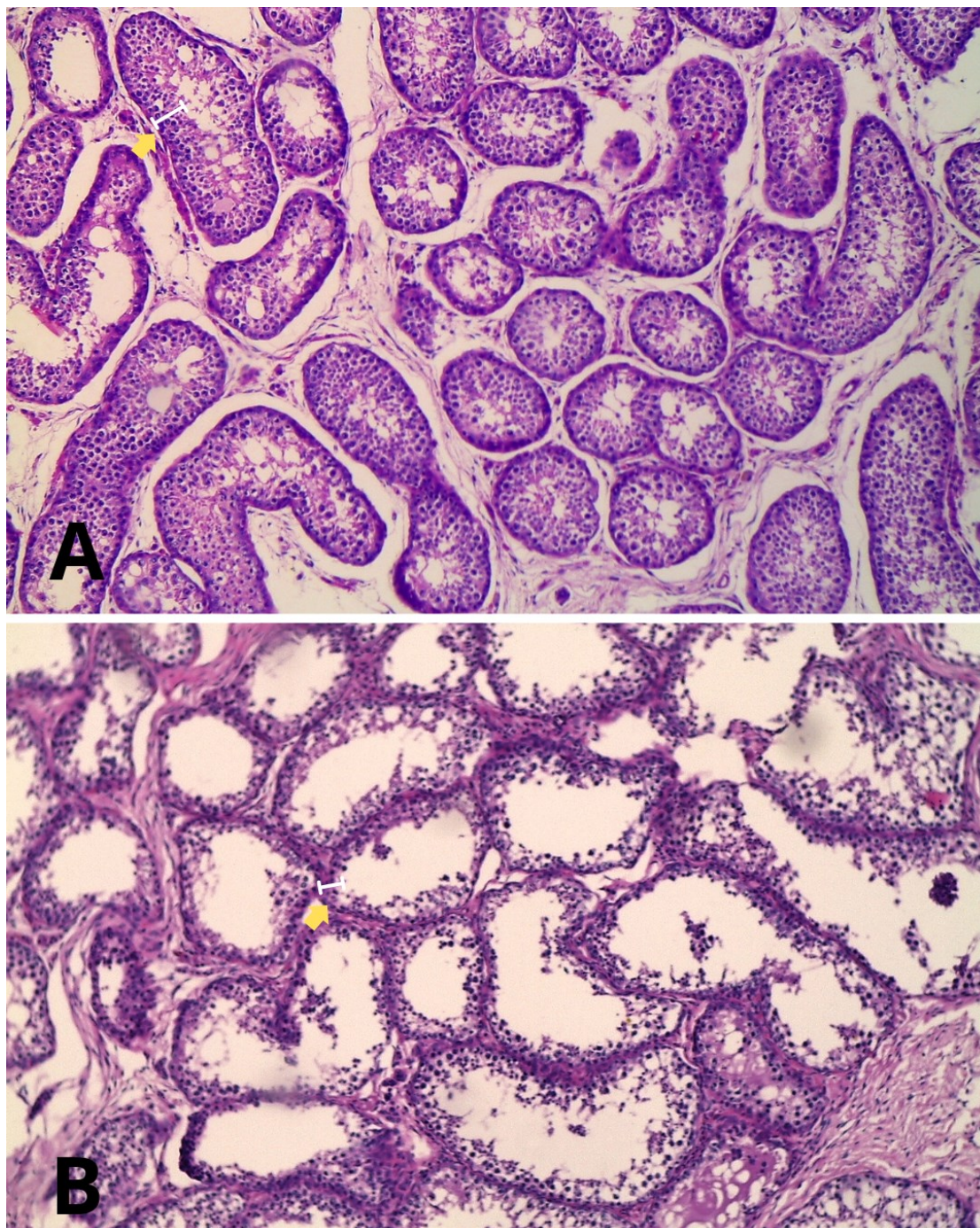
Legenda: As letras (^a, ^b, ^c) distintas indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos, enquanto as letras (^b) iguais indicam que não houve diferença estatística com base na mediana pelo teste Kruskal-Wallis . O grupo CTM apresentou mediana significativamente superior ao controle e ao grupo PBS, os quais não diferiram entre si.

Os dados da área dos túbulos seminíferos apresentaram diferenças estatisticamente significativa entre os tratamentos. A mediana foi maior no grupo controle (0,126 mm), seguida pelos grupos CTM (0,101 mm) e PBS (0,099 mm, com todos os grupos diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,001$).

Ao avaliar os resultados obtidos na altura do epitélio seminífero observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), sendo a mediana mais elevada no grupo CTM (0,009 mm), enquanto os grupos controle (0,008 mm) e DPBS (0,007 mm) apresentaram valores inferiores e não diferiram entre si. Esse achado sugere que o tratamento

com células-tronco mesenquimais pode estar associado a um estímulo na atividade epitelial, possivelmente relacionado à maturação testicular (Figura 15).

Figura 15: Altura de epitélio seminífero nos diferentes grupos experimentais



Legenda: Representação da altura do epitélio seminífero nos diferentes grupos experimentais. (A) Grupo CTM, evidenciando epitélio mais espesso; (B) Grupo Sham, com epitélio reduzido. As setas amarelas indicam a altura do epitélio seminífero, variável que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Fonte: Própria autoria

Em relação à quantidade de vasos sanguíneos (Tabela 2), os resultados não indicaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,920$), embora variações numéricas tenham sido observadas. Portanto, não é possível afirmar que houve influência da CTM ou do PBS sobre a vascularização testicular no presente estudo.

Tabela 2 – Médias (\pm desvio padrão) da variável histológica quantidade de vasos sanguíneos (μm^2) analisadas por testes paramétricos (ANOVA) conforme atendimento às pressuposições estatísticas.

Variável histológica	Controle	Tratado	DPBS
Quantidade de vasos sanguíneos (μm^2)	13,333 ($\pm 9,291573$) ^a	10,5 ($\pm 5,07116$) ^a	13 (± 0) ^a

Legenda: As letras iguais (^a) indicam ausência de diferença significativa pela análise da ANOVA (Análise de Variância)

5 DISCUSSÃO

A histopatologia do parênquima testicular é ferramenta essencial para diagnosticar possíveis alterações que comprometam a fertilidade dos equinos. Contudo, a literatura ainda apresenta lacunas quanto à caracterização histológica dos testículos em cavalos jovens e saudáveis.

Os resultados obtidos neste estudo foram comparados com dados da literatura, possibilitando a análise crítica das características histológicas observadas em relação às previamente descritas. A comparação entre os grupos revelou achados relevantes: ausência de reações adversas nos animais tratados, evidenciada também pela não manifestação dos sinais cardinais da inflamação (calor, rubor, tumor, dor e perda de função); aumento significativo da altura do epitélio seminífero no grupo tratado; e diferenças estatísticas na área dos túbulos seminíferos entre todos os grupos.

Aissanou e Ayad (2022) em estudo com jumentos, observou que células germinativas no interstício aumentam com a idade, achado compatível com os resultados obtidos em cavalos entre 3 e 7 anos neste trabalho.

Um diferencial deste estudo foi a aplicação de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas diretamente no parênquima testicular, estratégia ainda pouco explorada em equinos. As CTMs apresentam reconhecida capacidade de modular respostas inflamatórias, estimular angiogênese e favorecer processos de regeneração tecidual (Karp; Teo, 2009).

No presente trabalho, a aplicação mostrou-se segura, sem evidências de degeneração testicular, como aumento da temperatura escrotal, febre, edema ou hipoplasia testicular, corroborando achados de segurança descritos na literatura (Turner, 2007). Além disso, os resultados sugerem possível efeito benéfico sobre a maturação testicular. Embora o grupo tratado tenha apresentado área dos túbulos seminíferos reduzida em comparação aos controles, tal achado pode refletir um estágio inicial de remodelação tecidual, não necessariamente associado à perda funcional, mas possivelmente relacionado a mecanismos adaptativos induzidos pela terapia celular.

Contrariando expectativas teóricas (Caplan, 2009; Karp ; Teo, 2009), a análise do número de vasos sanguíneos não demonstrou efeito angiogênico entre 20 e 40 dias pós-aplicação, sugerindo que a resposta vascular pode demandar mais tempo ou métodos mais sensíveis para sua detecção.

Em síntese, os resultados indicam que a aplicação de CTMs constitui uma possibilidade terapêutica para afecções testiculares, como a degeneração testicular idiopática ou traumática. Futuros estudos devem contemplar períodos mais longos de acompanhamento, avaliação funcional da espermatogênese e análise de parâmetros hormonais para elucidar o impacto da terapia na fertilidade de garanhões.

6 CONCLUSÃO

A aplicação intra-testicular de células-tronco mesenquimais (CTMs) alogênicas, derivadas de tecido adiposo, demonstrou segurança em equinos jovens, não sendo observadas reações adversas clínicas ou histológicas no período avaliado. O tratamento com CTMs promoveu um aumento significativo na altura do epitélio seminífero, o que sugere um efeito positivo na maturação testicular. Considerando a importância da reprodução equina, futuras pesquisas devem abordar avaliações funcionais da espermatogênese, análise hormonal detalhada e testes de fertilidade para validar a aplicabilidade clínica dessa terapia celular na recuperação da função testicular.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSOHN, P. Sistema Masculino. *In*: CARNEIRO, L. C. ; JUNQUEIRA, J. (ed.). **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2023. p. 447-467
- AMANN, R. P. A review of stallion anatomy and physiology. **Journal of equine veterinary science**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.83-105,1981.
- AMANN, RP, GANJAM, VK. Effects of Hemicastration or hCG treatment on steroids in the testicular and jugular vein blood of stallions. **Journal of Andrology**, [s.l.], v. 2, p. 132-139, 1981.
- AMMAN, R. P. Fisiologia e Endocrinologia. *In*: MKINNON, A. *et al.* (ed.). **Reprodução Equina**. Hoboken, NJ, EUA: Wiley-Blackwell, 2011. p. 881-909.
- AISSANOUS, S.; AYAD, A. Histomorphometric changes of testicular tissues by season and age of Algerian local donkeys (*Equus asinus*). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v.44 , e55775, 2022.
- ARIGHI, M. Descida testicular e criptorquidia. *In*: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F, MCKINNON, A. O. (ed.). **Terapia atual na reprodução equina**. St Louis: Saunders, 2007. p.185-194.
- BEREBICHEZ-FRIDMAN, Roberto; MONTERO-OLVERA, Pablo R. Sources and clinical applications of mesenchymal stem cells: State-of-the-art review. **Sultan Qaboos University medical journal**, v. 18, n. 3, p. e264-277, 2018.
- BERGMANN, M. Histologia e Tese. **Journal für Urologie and Urogynäkologie**, [s.l.], n. 3, p. 5-12, 2007.
- CAPLAN, A.I. **Why are MSCs therapeutic? New data: new insight**. *Journal of Pathology*, 217:318-324, 2009.
- CEQUIER, A; SANZ, C; RODELLAR, C; BARRACHINA, L. The Usefulness of Mesenchymal Stem Cells beyond the Musculoskeletal System in Horses. **Animals**, 11:931, 2021.
- CHARNY, C. W. Testicular biopsy. *In*: JOEL, C. A.; BOTELLA-LLUSIÁ, J. (ed.) **Fertility Disturbances in Men and Women**. [S.l.] Karger, 2015. p. 135-145.
- CLERMONT, Y. Quantitative analysis of rat spermatogenesis: a revised model for spermatogonial renewal . **Am J Anat**, [s.l.], v. 111, 1962.?
- DELLMANN, H. D.; WROBEL, K. H. Sistema reprodutor masculino. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1982.

FALAMO, ME; FERRONI, L; TOCCO, I; GARDIN, C; ZAVAN, B. Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. **BioMed Res. Int.**, 2015.

FONZAR, José Francisco. **Avaliação qualitativa e quantitativa do reparo ósseo por imagens processadas pelos programas “Image J” e “ODR”**. [S.l.]: Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2010.

GIMBLE, JM; KATZ, AJ; BRUNNELL, BA. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circ. Res.**, 100(9):1249-1260, 2007.

GORETTI, R. G. Empreendedorismo na reprodução equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, [s.l.], n. 4, p. 500–501, 2021.

HENINGER, N. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. **Theriogenology**, [s.l.], v. 62, n. 1–2, p. 283–297, 2004.

JOHNSON, L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal reproduction science**, [s.l.], v. 60–61, p. 471–480, 2000.

JOHNSON, L.; HARDY, V. B.; MARTIN, M. T. Estadiamento de túbulos seminíferos equinos pela óptica de Normarski em cortes histológicos não corados e em túbulos montados in toto para revelar a onda espermatogênica. **Anat Rec**, [s.l.], v. 227, p. 167–174, 1990.

JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions . **Biology of reproduction**, [s.l.], v. 24, n. 3, p. 703–712, 1981.

JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L. Variação sazonal e relacionada à idade na produção diária de espermatozóides da população de células de Sertoli e nas concentrações séricas de hormônio folículo-estimulante, hormônio luteinizante e testosterona em garanhões. **Biol Reprod**, [s.l.], v. 29, p. 777–789, 1983.

KARP, JM; TEO, GSL. Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. **Cell Stem Cell**, 4:206-216, 2009.

KÖNING, H. Órgãos genitais masculinos. In: KÖNIG, H. G. L. **Anatomia dos Animais Domésticos**. Porto Alegre: Artmed, 2016. p.413-449.

LACROIX, A. *et al.* Temporal fluctuations of plasma LH and testosterone in Charolais calves during the first year of life . **Annales de biologie animale, biochimie, biophysique**, [s.l.], v. 17, n. 6, p. 1013–1019, 1977.

LEIPOLD, H. W. *et al.* Cryptorchidism in the horse: genetic implications . Em: **Proceedings of 31st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**. Toronto, Canada: [s.n.]. p. 579–590.

ORISTAGLIO TURNER, R. M. Pathogenesis, diagnosis and management of testicular degeneration in stallions. **Clinical techniques in equine practice**, [s.l.], v. 6, n. 4, p. 278–284, 2007.

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.

MCLACHLAN, E.; KRETZER, N. E. Avaliação histológica do testículo humano - abordagens para otimizar o valor clínico da avaliação: mini revisão, reprodução Humana. v. 22, [s.d.].

MONTEIRO, Claudia Dias; BICUDO, Sony Dimas; TOMA, Hugo Shisei. O papel das células de Sertoli na espermatogênese. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 8, n. 15, jul. 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/140284>. Acesso em: 22 set. 2025.

MURPHY, MB; MONCIVAIS, K; CAPLAN, AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental and Molecular Medicine**, 45, e54, 2013.

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.

PITTENGER, M.F. et al. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells**. Science, 284:143-147, 1999.

SANCLER S., Y.F.R. **Atualidades na abordagem da degeneração testicular em garanhões**. Rev Bras Reprod Anim, 45 (4): 267-278, 2021.

SINGH, B. Pelve e Sistemas Reprodutivos dos equinos. In: SINGH, B. (ed.). **Tratado de Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: GEN, 2019. p. 551–573.

SISSON, S. **The Anatomy of the Domestic Animal**. Toronto: W.B. Saunders Co, 1975. v. 1

SNIFFEN, R. C. O testículo. I. O testículo normal. Arco Pathol (chique) 50.259-284. testículo. **Fertil Esteril**, [s.l.], v. 61, p. 367–375, 1950.

SOUZA, F. fisiologia e endocrinologia do sistema reprodutor do garanhão. **Reprodução animal**: equinos, v. 3, p. 128–139, 2024.

SULLIVAN, Robert; SAEZ, Fabrice. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. R21-35, 2013.

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.

TURNER, R. M. Declining testicular function in the aging stallion: Management options and future therapies. **Animal reproduction science**, [s.l.], v. 207, p. 171–179, 2019.

TURNER, R.M. **Pathogenesis, Diagnosis, and Management of Testicular Degeneration in Stallions**. **Clin Tech Equine Pract**, 6: 278-84, 2007.

VARNER, D. D. **Diseases and management of breeding stallions**. Londres, England: Mosby, 1991.