

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

GIOVANA CORBUCCI DANTI REZENDE

EFEITO DO TRATAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS
AO QUIMIOTERÁPICO CICLOFOSFAMIDA: AVALIAÇÃO DA
FERTILIDADE, DESEMPENHO REPRODUTIVO, GESTAÇÃO
E PROGÊNIE

CAMPO GRANDE

2019

GIOVANA CORBUCCI DANTI REZENDE

**EFEITO DO TRATAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS EM CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS
AO QUIMIOTERÁPICO CICLOFOSFAMIDA: AVALIAÇÃO DA
FERTILIDADE, DESEMPENHO REPRODUTIVO, GESTAÇÃO
E PROGÊNIE**

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

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE - MS

2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

GIOVANA CORBUCCI DANTI REZENDE

EFEITO DO TRATAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS EM CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS AO QUIMIOTERÁPICO CICLOFOSFAMIDA: AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE, DESEMPENHO REPRODUTIVO, GESTAÇÃO E PROGÊNIE

Resultado: _____

Campo Grande (MS), ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira (Permanente)

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Marciana Sanabria (Permanente)

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Mônica Cristina Toffoli Kadri (Permanente)

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Dr. Adrivanio Baranoski (Suplente)

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pelo Seu infinito amor, graça e misericórdia.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Sílvia Corbucci Danti,

Por ser a primeira a me amar, lutar por mim, acreditar e sonhar junto comigo.

Ao meu pai, Edmilson José Rezende e ao meu irmão, Gustavo Rezende,

Por todo apoio, ensinamento e amor.

Aos meus avós,

Por toda palavra de sabedoria, paciência e amor.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira,

Pela oportunidade em desenvolver o meu projeto de mestrado e por acreditar no meu trabalho.

A Prof^ª. Dra. Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli Silva,

Por possibilitar que eu exercesse minhas atividades junto ao laboratório CeTroGen.

Aos membros da banca,

Pela disponibilidade em participar desse momento marcante da minha vida e por toda contribuição ao meu trabalho e ao meu crescimento pessoal.

À Prof. Dra. Larissa Correa Hermeto,

Pelas oportunidades oferecidas e aprendizado na área de terapia celular.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Duenhas Monreal,

Pelo apoio no desenvolvimento do ensaio *in vivo* ao disponibilizar o espaço do
laboratório Biocapri.

Ao Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio,

Pelo suporte na realização dos ensaios da qualidade espermática.

À Prof. Dra. Sarah Alves Auharek,

Pelo suporte na realização da avaliação histológica.

**Aos amigos do Laboratório CeTroGen: Luana, Raíssa, Ana Paula, Verônica,
Lucas, Edwin, Bruno, João Renato, Igor, Andreza, Laynna, Yasmin, Bruna,
Juliana, Gean, Sílvia, Vivianne e Thais,**

Pelo suporte durante a execução do projeto, pela amizade e descontração.

Ao meu amigo e co-autor, Bruno Ivo Pelizaro,

Seu apoio foi essencial para a realização desse projeto.

À minha família canina, Lola, Glorinha, Don, Tinkerbelle e Blueberry,

Por todas as vezes que vocês “me sorriram latindo”.

Aos camundongos utilizados durante o estudo,

Por, através das suas vidas, permitirem a realização desse projeto.

Às Agências Financiadoras, CAPES, FUNDECT e CnPQ, pelo apoio financeiro.

“Esperei com paciência no Senhor, e ele se inclinou para mim, e ouviu o meu clamor. Tirou-me de um lago horrível, de um charco de lodo; pôs os meus pés sobre uma rocha, firmou os meus passos; e pôs um novo cântico na minha boca, um hino ao nosso Deus; muitos o verão, e temerão, e confiarão no Senhor.”

Salmos 40:1-3

“A religião sem a ciência é manca, e a ciência sem religião é cega.”

Albert Einstein

RESUMO

Rezende, G. C. D. **Efeito do tratamento de células-tronco mesenquimais em camundongos Swiss expostos ao quimioterápico ciclofosfamida: avaliação da fertilidade, desempenho reprodutivo, gestação e progênie.** [Dissertação de Mestrado]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2019.

A terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) pode promover a restauração da função reprodutiva após tratamento antineoplásico em modelos animais. A presente pesquisa avaliou os efeitos da terapia celular no desempenho reprodutivo de camundongos machos adultos tratados com ciclofosfamida e, de modo inédito, o desenvolvimento embriofetal da sua progênie. Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: Controle Negativo (CN) – 6 administrações de água de injeção via intraperitoneal (i.p.) e 2 administrações de solução tampão fosfato (PBS) via intravenosa (i.v.); Controle Positivo (CP) – 6 administrações de ciclofosfamida (150 mg/kg, i.p.) e duas administrações de PBS (i.v.); e Células-Tronco Mesenquimais (CTM) – 6 administrações de ciclofosfamida (150 mg/kg, i.p.) e 2 transplantes de CTM ($1,0 \times 10^6$ células, i.v.). Após o período de indução, ocorreu o acasalamento (1 macho: 1 fêmea) seguido da eutanásia do machos. Acompanhou-se a gestação até a eutanásia das fêmeas no 18^o dia gestacional. Os resultados comprovaram que a terapia celular promoveu o aumento da viabilidade da membrana plasmática e da integridade genética dos espermatozoides dos animais expostos ao quimioterápico, todavia, não foi capaz de reverter as baixas taxas de fertilidade. Diante do exposto, considera-se que a terapia celular, de acordo com o presente delineamento, não promoveu a recuperação da função reprodutiva dos animais, no entanto, os resultados permitem sugerir recuperação da viabilidade e integridade genética dos gametas, fatores chave nos tratamentos contra a infertilidade, abrindo perspectivas para futuras pesquisas com terapias celulares.

Palavras-chave: terapia celular, tecido adiposo, câncer, infertilidade, antineoplásico, medicina reprodutiva.

ABSTRACT

Rezende, G. C. D. **Effects of the mesenchymal stem cells treatment in mice exposed to cyclophosphamide chemotherapeutic: assess of fertility, reproductive performance, pregnancy, and progeny outcome.** [Masters Dissertation]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2019.

Mesenchymal stem cells' (MSCs) therapy can promote the restoration of the reproductive function after chemotherapy in animal models. The present research assessed the effects of cell therapy derived from fat tissue in the reproductive performance and, in an unprecedented manner, the progeny's embryo development of male mice exposed to cyclophosphamide. The animals were distributed into 3 experimental groups (n= 10): Negative Control (NC) - 6 intraperitoneal (i.p.) administrations of sterile water and 2 intravenous (i.v.) administrations of phosphate-buffered saline solution (PBS); Positive Control (PC) - 6 administrations of cyclophosphamide (150 mg/kg, i.p.) and 2 administrations of PBS solution (i.v.); and Mesenchymal stem cells group (MSCs) - 6 administrations of cyclophosphamide (150 mg/kg, i.p.) and 2 administrations of MSCs (1×10^6 cells, i.v.). After induction's period, occurred animals mating (1 male: 1 female) followed by males' euthanasia. We accompanied the gestational period through females' euthanasia, in the 18th gestational day. Results showed that cell therapy statistically enhanced sperm's plasmatic membrane viability and DNA integrity of animals exposed to the chemotherapy, though the persistence of low fertility rates. Gathering the data obtained, we can infer that MSC's therapy did not promote the restoration of reproductive parameters, nonetheless, it induced the reestablishment of sperm's plasmatic membrane viability and genetic material integrity, important key-factor for infertility's treatments, thus opening the perspective to future cell therapy research.

Keywords: cell therapy, adipose tissue, cancer, infertility, antineoplastic, reproductive medicine.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito - Tabela 1. Parâmetros biométricos de camundongos machos <i>Swiss</i> tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM	64
Manuscrito - Tabela 2. Parâmetros biométricos de fêmeas acasaladas com camundongos machos <i>Swiss</i> tratados com ao quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM.....	65
Manuscrito - Tabela 3. Parâmetros reprodutivos de fêmeas <i>Swiss</i> acasaladas com os machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não transplante de CTM	66
Manuscrito - Tabela 4. Relação e frequência de malformações externas dos fetos resultantes do acasalamento de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> com machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não a transplante de CTM.....	67
Manuscrito - Tabela 5. Relação e frequência de malformações viscerais dos fetos resultantes do acasalamento de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> com machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não a transplante de CTM.....	68
Manuscrito - Tabela 6. Relação e frequência de malformações esqueléticas dos fetos resultantes do acasalamento de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> com machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não a transplante de CTM.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos da exposição à ciclofosfamida durante os diferentes estágios da espermatogênese.....22

Manuscrito - Figura 1. Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação de CTM derivadas de tecido adiposo de camundongo. A) cultura indiferenciada de CTM com células com aspecto fibroblástico; B) cultura de CTM submetidas à diferenciação adipogênica, com vacúolos lipídeos corados com Oil-red-O; C) cultura de CTM submetidas à diferenciação osteogênica com depósitos de cálcio corados com Alizarina Vermelha; e D) cultura de CTM submetidas à diferenciação condrogênica, com matrizes extracelulares de glicosaminoglicanos coradas com Azul de Alcian e E) Caracterização imunofenotípica, demonstrado que as CTM foram positivas para os marcadores CD29 e CD90 e negativas para os marcadores CD34 e CD11b.....71

Manuscrito - Figura 2. Evolução do ganho de peso durante o período gestacional em camundongos fêmeas *Swiss* acasaladas com machos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM.....72

Manuscrito - Figura 3. Avaliação da viabilidade, do potencial de membrana mitocondrial e da integridade genética de espermatozoides de camundongos machos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM. A e B - gráficos representando a porcentagem de espermatozoides em que houve penetração do IP (mortos) e nos em que não houve (vivos); C e D - gráficos representando a porcentagem de espermatozoides coradas com *MitoStatus* (alto potencial de membrana) e não coradas (baixo potencial de membrana); e E e F - gráficos representando a porcentagem de espermatozoides incubados em Laranja de Acridina, com material genético íntegro (corados em verde) e fragmentado (corados em vermelho).....73

Manuscrito - Figura 4. Figura 4. Cortes histológicas de túbulo seminífero dos animais dos grupos experimentais CN (A), CP (B) e CTM (C). Os animais dos grupos CN e CTM não apresentaram alterações histológicas, enquanto que nos animais do grupo CP observou-se a depleção do tecido germinativo (asterisco).....74

Manuscrito - Figura 5. Avaliação da integridade do material genético materno de camundongos fêmeas *Swiss* acasaladas com machos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM. A - Presença de micronúcleo em eritrócito de sangue periférico e B - frequência de micronúcleos em sangue periférico.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CTM	Células-tronco mesenquimais
DMEM	Meio Dulbecco's modified eagle's
SFB	Soro fetal bovino
PBS	Tampão fosfato-salina
DMSO	Dimetilsulfóxido
IP	Iodeto de propídeo
i.v.	Intravenoso(a)
i.p.	Intraperitoneal
p.c.	Peso corporal
d.g.	Dia gestacional
EPM	Erro padrão da média
g	Gramas
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mg/mL	Miligramas por mililitro
M	Molaridade
Mm	Massa molar
mmol/L	Milimoles por litro
APIP	Adequação do peso à idade da prenhes
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
OMS	Organização Mundial da Saúde
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
LH	Hormônio luteinizante
FSH	Hormônio folículo estimulante
R123	Rodamina 1
MITO	Mito tracker green FI
JC-1	Iodeto de 5,5', 6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
TUNEL	Marcação de quebras no DNA por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase
SCD	Dispersão de cromatina espermática
CXCL12	Fator derivado de células estromais 1

CXCR4	Receptor de quimiocina Tipo 4
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
IGF	Fator de crescimento insulínico
FGF2	Fator de crescimento de fibroblástico básico
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
HGF	Fator de crescimento do hepatócito
ANG1	Angiopietina 1
ANG2	Angiopietina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina-1 β
PGE2	Prostaglandina E2
IL-1RA	Antagonista de receptor IL-1
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
TGFβ	Fator de crescimento transformador- β
STNF-R	Receptor do fator de necrose tumoral
NO	Óxido nítrico
STC-1	Stanniocalcina-1
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
GDNF	Fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial
GFP	Proteína verde fluorescente

Sumário

1. Revisão de literatura.....	16
1.1. Câncer.....	16
1.2. Infertilidade.....	17
1.3. Ciclofosfamida.....	18
1.4. Células-tronco e a Terapia celular na recuperação de danos reprodutivos.....	23
1.5. Ensaio biológicos.....	26
1.5.1. Citometria de fluxo.....	26
1.5.2 Viabilidade, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA espermático.....	26
1.5.3. Integridade genética materna.....	28
1.5.4. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embrionário.....	29
2. Referências bibliográficas.....	32
3. Objetivos.....	52
3.1. Objetivo geral.....	52
3.2. Objetivos específicos.....	52
4. Manuscrito.....	53
Apêndice A - Documento de aprovação emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.....	93

1. Revisão de literatura

1.1. Câncer

Câncer é uma doença decorrente do crescimento celular anormal, com o desbalanço entre a proliferação e a morte celular, que resulta no surgimento de uma população celular distinta, com habilidade de invadir tecidos próximos e distantes (metástase), podendo ocasionar a morte do paciente acometido (RUDDON, 2007).

Anualmente, de acordo com a literatura mais recente, são registrados aproximadamente 386.000 casos de câncer entre crianças e jovens até 19 anos no mundo (STELIAROVA-FOUCHER et al., 2017). Somente no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), ocorrem cerca de 12.500 diagnósticos por ano em indivíduos entre 0 a 19 anos (INCA, 2017), classificando-o com a segunda maior causa de morte nessa faixa etária no país (BRASIL, 2014).

O câncer infantojuvenil é categorizado em 12 grupos: I) leucemias, doenças mieloproliferativas e doenças mielodisplásicas; II) linfomas e neoplasias reticuloendoteliais; III) tumores do SNC e miscelânea de neoplasias intracranianas e intraespinhais; IV) tumores do sistema nervoso simpático; V) retinoblastoma; VI) tumores renais; VII) tumores hepáticos; VIII) tumores ósseos malignos; IX) sarcomas de partes moles; X) neoplasias de células germinativas, trofoblásticas e outras gonadais; XI) carcinomas e outras neoplasias malignas epiteliais e XII) outros tumores malignos não especificados (INCA, 2016).

Dos casos registrados, os mais prevalentes entre as crianças e adolescentes são as leucemias, doenças mieloproliferativas, doenças mielodisplásicas (30,6%) (grupo I); linfomas e neoplasias reticuloendoteliais (16,6%) (grupo II) (INCA, 2016).

Ainda de acordo com o INCA, indivíduos do sexo masculino são mais acometidos pelo câncer (INCA, 2016), isso devido a exposições ambientais à agentes cancerígenos, ação de hormônios sexuais e diferenças na expressão gênica e na resposta imune entre homens e mulheres (DORAK; KARPUZOGLU, 2012).

Durante as primeiras décadas do século XX, o diagnóstico de câncer era no geral fatal para aqueles indivíduos que não possuíssem massas neoplásicas localizadas que permitissem a cura através da exérese cirúrgica (HAY; MEYER, 2014). Não obstante, mesmo com o elevado número de casos registrados de câncer, graças aos

avanços nos protocolos terapêuticos (GREEN et al., 2010), as taxas de morte causadas por essa doença regrediram desde a década de 1970, com diminuição de, aproximadamente, 65% da mortalidade (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018), demonstrando, dessa forma um grande benefício associado aos tratamentos adotados (HAY; MEYER, 2014).

Ainda assim, os protocolos antineoplásicos podem apresentar, como efeitos colaterais à longo prazo alterações urológicas, como disfunção sexual, hipogonadismo e infertilidade (SUKHU; ROSS; COWARD, 2018). Nesse sentido, uma das principais preocupações dos especialistas é o trauma psicológico associado a infertilidade na vida adulta desses indivíduos e de suas famílias, especialmente devido ao fato de que, mais 50% desses pacientes desejará ter filhos (SCHOVER et al., 2002; THOMSON et al., 2002). Desse modo, pesquisas que procuram solucionar esse efeito colateral dos protocolos quimioterápicos são amplamente realizadas (DEL VENTO et al., 2018; KAWAY; NISHIYAMA, 2018; LAMBERT et al., 2018; POURMOGHADAM et al., 2018; TRAILA et al., 2018).

1.2. Infertilidade

Infertilidade é descrita como a incapacidade de conceber após 12 meses de relações sexuais regulares sem o uso de métodos contraceptivos (FORBES; FLANNINGAN; SCHLEGEL, 2018). O fator masculino é considerado responsável pela infertilidade em 20% a 30% dos casais (AGARWAL et al., 2015).

A etiopatogenia da infertilidade masculina relaciona-se à varicocele, obstruções, alterações genéticas e ao uso de medicamentos com potencial gonadotóxico (FORBES; FLANNINGAN; SCHLEGEL, 2018), como os quimioterápicos da classe dos agentes alquilantes e dos análogos de platina (VAKALOPOULOS et al., 2015).

Com efeito, a literatura é compatível com a observação de que, pacientes submetidos a protocolos quimioterápicos possuem metade da probabilidade de engravidar suas parceiras, comparado com seus irmãos, 5 anos ou mais após o diagnóstico da doença (GREEN et al., 2010).

Tratamentos para a infertilidade aplicados atualmente, como as técnicas de reprodução assistida, uso de terapias farmacológicas e correções cirúrgicas, aumentaram o número de homens que antes inférteis, foram capazes de gerarem

descendentes, incluindo aqueles que passaram por protocolos de quimioterapia e radioterapia (POURMOGHADAM et al., 2018).

Não obstante, as terapias disponíveis ainda não são capazes de produzir resultados positivos em indivíduos incapazes de gerar gametas. Nesse sentido, encaixam-se os indivíduos pré-púberes que não possuem espermatozoides maduros para submeter-se, por exemplo, a criopreservação. Como alternativa para essa faixa etária, tem-se a retirada, conservação e posterior reimplante do tecido celular germinativo. Outrossim, pacientes neoplásicos já apresentam disfunções gonadais e anormalidades espermáticas antes do início do protocolo quimioterápico (RUEFFER et al., 2001; KU et al., 2015), tornando, por vezes, o sêmen criopreservado de baixa qualidade (JAHNUKAINEN; EHMCKE; SCHLATT, 2011). Visando estabelecer novas opções terapêuticas para esses pacientes, os estudos baseiam-se em outras modalidades de terapias celulares, como o transplante de células-tronco (SEANDEL; RAFFI, 2011; YANG et al., 2014; POURMOGHADAM et al., 2018).

1.3. Ciclofosfamida

A ciclofosfamida é um dos primeiros quimioterápicos sintetizados e ainda amplamente utilizado, mesmo décadas após sua criação (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; AHLMANN; HEMPEL, 2016).

A elaboração desse composto resultou da busca em criar um fármaco que atuasse de modo específico sobre as células neoplásicas, mediante a substituição de um anel de oxazafosforina por um grupamento metil da mostarda nitrogenada. Células neoplásicas possuem taxas mais elevadas de fosfamidases, enzimas responsáveis por clivar ligações fósforo-nitrogênio e liberar a mostarda nitrogenada, quando comparadas às células saudáveis, o que as tornaria alvos-específicos do fármaco. (FRIEDMAN; SELIGMAN, 1954; EMADI; JONES; BRODSKY, 2009).

Ainda que essa teoria inicial tenha se provado incorreta, Arnold, Bourseaux e Brock, utilizando o mesmo princípio proposto por Friedman e Seligman, sintetizaram a ciclofosfamida em 1958. Por meio de testes *in vitro* e *in vivo*, utilizando as linhagens tumorais de sarcoma de Yoshida, sarcoma de Jensen e Walker 256, os autores concluíram que se tratava de uma pró-droga com altos índices de toxicidade contra as linhagens testadas (ARNOLD; BOURSEAUX; BROCK, 1958).

As principais indicações de uso para a ciclofosfamida são no tratamento de leucemias linfocíticas crônicas, linfomas e tumores sólidos (IARC, 2012), em adição, como imunossupressor, a ciclofosfamida também é prescrita no tratamento de doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide (CHAN, 1984; GHOBADI et al., 2018), e em protocolos de transplante de órgãos, visando prevenir a ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro (STARZL et al., 1973; MIELCAREK et al., 2016).

A ciclofosfamida pode ser administrada por via oral e intravenosa e ativa-se por meio da hidroxilação pela enzima hepática CYP2B, formando a 4-hidroxíciclofosfamida e o seu tautômero, a aldofosfamida (COLVIN et al., 1976; FENSELAU et al., 1977; SLADEK, 1988; ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006; VEAL et al., 2016).

Uma vez em contato com as células tumorais, nas quais a aldofosfamida sofre clivagem, ocorre a liberação da mostarda de fosforamida e da acroleína, responsáveis, respectivamente, pela ação antineoplásica e a cistite hemorrágica, observada como efeito adverso (COLVIN et al., 1976; FENSELAU et al., 1977; SLADEK, 1988; ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006; VEAL et al., 2016).

A excreção ocorre após a oxidação enzimática, com a formação de metabólitos ativos e inativos, por meio da via renal (COHEN; JAO; JUSKO, 1971; BALIS; HOLCENBERG; BLEYER, 1983; ZHANG; TIAN; ZHOU, 2006).

A ação citotóxica da ciclofosfamida decorre da reatividade dos grupos cloro-etil ligados ao átomo central de nitrogênio, que, por meio da eliminação do cloro, formam um anel cíclico aziridina. Esse cátion altamente instável liga-se a um nucleófilo, preferencialmente na posição N7 da guanina, mas em menor escala nas posições N1, N3 e O6 da guanina, bem como, a átomos de fosfato e proteínas associadas ao DNA, formando uma ligação covalente, incorrendo, dessa forma, na inserção de uma cadeia alquil a molécula de DNA. Como resultado, o átomo de nitrogênio é liberado, tornando-se disponível para reagir com o outro grupamento cloro-etil, formando-se um novo anel aziridina, e, conseqüentemente, uma segunda ligação covalente com outro nucleófilo, resultando na formação de *crosslinks* de DNA-DNA, de DNA-proteína, e quebras de fitas-simples (HEMMINKI; KALLAMA, 1986; CROOK; SOUHAMI;

McLEAN, 1986; COLVIN; SASAKI; TRAN, 1999; VEAL et al., 2016), inclusive em espermatozoides (QIU; HALES; ROBAIRE, 1992).

O principal mecanismo que acarreta nos danos gonadotóxicos causados pela ciclofosfamida é o estresse oxidativo, devido a formação de espécies reativas de oxigênio (REZVANFAR et al., 2008; TURK et al., 2010; ONAOLAPO; OLADIPO, ONAOLAPO et al., 2017), e a redução da expressão de genes ligados a atividades antioxidantes (AGUILAR-MAHECHA; HALES; ROBAIRE, 2002). Como consequência, tem-se a diminuição da motilidade espermática e da capacidade de realizar a reação acrossomal assim como o aumento da peroxidação lipídica da membrana plasmática (GRIVEAU et al., 1995; ELANGO VAN et al., 2006; TURK et al., 2010; ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2017).

Outros efeitos associados à ciclofosfamida incluem a diminuição na contagem espermática (ELANGO VAN et al., 2006; VAISHEVA et al., 2007; REZVANFAR et al., 2008; TRIPATHI; JENA, 2008; ABIODUN et al., 2016; ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2017), alterações morfológicas (REZVANFAR et al., 2008; TRIPATHI; JENA, 2008; DELBÈS et al., 2010), danos ao material genético dos espermatozoides (VAISHEVA et al., 2007; REZVANFAR et al., 2008; TRIPATHI; JENA, 2008; DELBÈS et al., 2010; LIU; HALES; ROBAIRE, 2014), aumento do número de aneuploidias (BARTON et al., 2003), disfunção telomérica (LIU; HALES; ROBAIRE, 2014), alteração no perfil proteico da matrix nuclear (CONDRIGTON; HALES; ROBAIRE, 2007) e da expressão gênica (AGUILAR-MAHECHA; HALES; ROBAIRE, 2002), a diminuição do peso dos testículos, dos epidídimos (ELANGO VAN et al., 2006; VAISHEVA et al., 2007; REZVANFAR et al., 2008; TRIPATHI; JENA, 2008; DELBÈS et al., 2010) e da próstata (REZVANFAR et al., 2008; DELBÈS et al., 2010), alterações histopatológicas, com a formação de vacúolos (VAISHEVA et al., 2007; TRIPATHI; JENA, 2008; DELBÈS et al., 2010; ABIODUN et al., 2016), o estreitamento dos túbulos seminíferos, a perda de células germinativas (ELANGO VAN et al., 2006; VAISHEVA et al., 2007; TRIPATHI; JENA, 2008; DELBÈS et al., 2010; ABIODUN et al., 2016; ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2017), o edema (REZVANFAR et al., 2008) e o aumento do espaço intersticial (REZVANFAR et al., 2008; ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2017), a diminuição nos níveis plasmáticos de hormônio luteinizante (LH) (ELANGO VAN et al., 2006; ABIODUN et al., 2016), do hormônio folículo-estimulante (FSH) (ABIODUN et al., 2016) e da testosterona (ELANGO VAN et al.,

2006; REZVANFAR et al., 2008; ABIODUN et al., 2016; ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2017).

A manutenção da proliferação das espermatogônias-tronco após a exposição a quimioterápicos (LIU; HALES; ROBAIRE, 2014) e a capacidade dos espermatozoides com DNA fragmentado de fertilizar ovócitos secundários (AHMADI; NG, 1999; GRENIER; ROBAIRE; HALES, 2011, 2012), são fontes de grande preocupação, tendo em vista a possibilidade da perpetuação, à longo prazo, de instabilidades genéticas em descendentes de homens expostos a esses compostos (MARCHETTI et al., 2004; BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005; LIU; HALES; ROBAIRE, 2014).

Os efeitos adversos causados aos fetos de ratos pela exposição paterna a agentes tóxicos ocorrem, prioritariamente, através de alterações específicas em genes e/ou cromossomos ou na (re)programação dos embriões, por meio dos mecanismos de epigenética (alterações na expressão gênica sem a mudança da sequência de DNA), como, a metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas e a ação de RNAs não codificadores (HALES; BARTON; ROBAIRE, 2005; BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005; MOSS; WALLRATH, 2007).

Óvulos de ratos fertilizados com espermatozoides com DNA fragmentado apresentam formação de micronúcleos (BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005; GRENIER; ROBAIRE; HALES; 2011, 2012), retardo da clivagem (GRENIER; ROBAIRE; HALES, 2011), alterações no desenvolvimento dos pró-núcleos (HARROUK et al., 2000), ativação de vias de sinalização de danos e reparo de DNA (HARROUK et al., 2000; BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005), distúrbios na programação epigenética, (BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005) e morte devido a ação dos genes dominantes letais em camundongos e ratos (TRASLER; ROBAIRE; HALES, 1985; JENKINSON; ANDERSON, 1990; KELLY; ROBAIRE; HALES, 1992; MARCHETTI et al., 2004; DELBÈS et al., 2010).

Ademais, a exposição paterna à ciclofosfamida é ligada a diminuição do tamanho das ninhadas (TRASLER; ROBAIRE; HALES, 1985; JENKINSON; ANDERSON, 1990; FRANCIS et al. 1990; VAISHEVA et al., 2007) e do peso dos fetos, a malformações, como hidrocefalia, migrognatia e anasarca (TRASLER; ROBAIRE; HALES, 1985; JENKINSON; ANDERSON, 1990), a anomalias de cariótipo

(JENKINSON; ANDERSON, 1990), ao aumento da letalidade pós-natal (AUROUX et al., 1990) e a diminuição da capacidade de aprendizagem (ADAMS; FABRICANT; LEGATOR, 1981; FABRICANT; LEGATOR; ADAMS, 1983; AUROUX et al., 1990) em modelo experimental de ratos.

Os efeitos teratogênicos observados variam de acordo com o período da espermatogênese em que ocorre exposição dos gametas (HALES; BARTON; ROBAIRE, 2005) bem como da capacidade de detecção e de reparo do material genético pelo embrião (HALES, 2005).

Espermatozoides de ratos expostos quando ainda em fase de espermatogônia relacionam-se com desenvolvimento de malformações e retardos de crescimento; enquanto que aqueles expostos durante a fase de espermatócito, resultam em aumento das perdas pré-implantacionais; já quando as espermátides e espermatozoides são expostos a agentes tóxicos, por sua vez, ocorre associação com aumento das perdas pós-implantacionais (efeito de genes letais dominantes) (HALES; BARTON; ROBAIRE, 2005) (Figura 1).

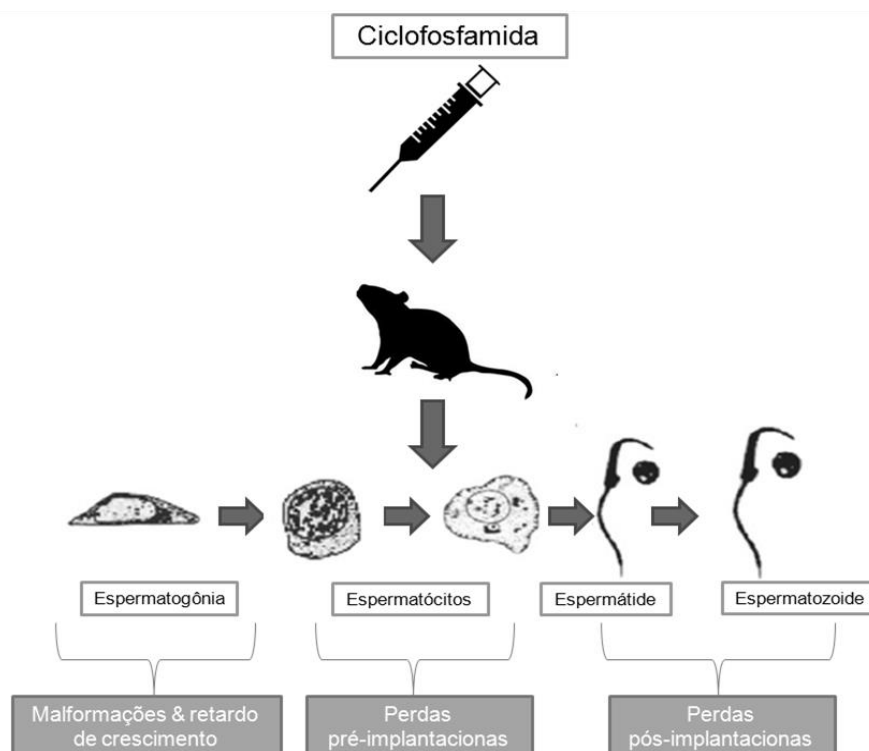


Figura 1. Efeitos da exposição à ciclofosfamida durante os diferentes estágios da espermatogênese. (Fonte: HALES; BARTON; ROBAIRE, 2005 - adaptado).

O estresse genotóxico ocasionado pelo material genético paterno resulta em parada em *check points* do ciclo celular, na ativação de mecanismos de reparo do

DNA e, caso não ocorra restauração da integridade do material genético, na indução da apoptose. Desse modo, o destino desses embriões é dado pelo balanço do dano genético e a capacidade de repará-lo (HALES, 2005).

1.4. Células-tronco e a Terapia celular na recuperação de danos reprodutivos

Em razão da alta e permanente capacidade de proliferação e diferenciação das células-tronco, a terapia celular é considerada como um dos mais promissores tratamentos para muitas doenças atualmente incuráveis (VOLAVERIC et al., 2014; POURMOGHADAM et al., 2018). Outrossim, as células-tronco são capazes de originar gametas masculinos (NAYERNIA et al., 2006) e femininos (HUBNER et al., 2003) *in vitro*, reforçando o seu potencial para o uso na medicina regenerativa de reprodução.

Em humanos, as células-tronco podem ser encontradas em diversos estágios do desenvolvimento. Em células embrionárias, encontram-se células-tronco totipotentes, chamadas de células-mãe, bem como células-tronco pluripotentes, obtidas da massa interna de blastocistos. Células totipotentes diferenciam-se em todos os tecidos do corpo humano enquanto que, as células pluripotentes, apesar de também possuírem grande plasticidade, não se diferenciam em anexos embrionários e em tecidos placentários. Em tecidos adultos, como os do mesenquima e extraembrionários, encontram-se células-tronco adultas ou multipotentes, com plasticidade limitada, podendo originar alguns subgrupos de linhagens celulares. Ainda há as células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) que, apesar de serem obtidas de tecidos adultos, possuem as mesmas propriedades de diferenciação que as células-tronco embrionárias (VOLAREVIC et al., 2014; DALEY, 2015).

Atualmente, as pesquisas estão voltadas para o uso de células-tronco mesenquimais, células iPS, e espermatozônios-tronco (POURMOGHADAM et al., 2018). Células-tronco embrionárias, apesar de também possuírem a capacidade de produzir células gaméticas (HUBNER et al., 2003), apresentam alto risco de malignidade (VOLAREVIC et al., 2014).

Brinster e Avarbock (1994), Brinster e Zimmermann (1994), Zhu et al. (2012), Cai et al. (2013) e Mouka et al. (2017) utilizaram células iPS, conseguindo gerar células do tecido germinativo masculino. A utilização de células pluripotentes induzidas (iPSC), além das vantagens de plasticidade, possuem benefícios como

menor envolvimento em questões éticas envolvendo dogmas religiosos, comitês de éticas em experimentação humana e legislações nacionais (REZENDE; REZENDE, 2009), e podem ser de fonte autóloga, permitindo que os indivíduos tratados possam gerar descendentes com a sua carga genética (FANG et al., 2018). Ainda assim, esse tipo celular ainda requer maiores pesquisas para um futuro uso clínico (ZHANG et al., 2014; VOLAREVIC et al., 2014; FANG et al., 2018).

Ogawa et al. (2000), Hermann et al. (2012) e Azizollahi et al. (2016), por outro lado, utilizaram o transplante de espermatogônias-tronco, células diplóides localizadas próximo a membrana basal dos túbulos seminíferos (VOLAREVIC et al., 2014), obtendo resultados promissores, com a retomada da espermatogênese em modelos animais azoospermicos. Porém, a eficiência na colonização das células transplantadas é baixa, devido principalmente, a alterações no microambiente testicular (MEHRABANI et al., 2015; KADAM; VAN SAEN; GOOSSENS, 2017). Nesse sentido, as células-tronco mesenquimais (CTM), destacam-se já que possuem atividade parácrina e podem atuar na modulação do microambiente testicular (KADAM; VAN SAEN; GOOSSENS, 2017).

As CTM são células estromais não hematopoéticas, multipotentes, podendo ser originadas de órgãos e tecidos pós-natais, como medula óssea, tecido adiposo (ZUK et al., 2002), líquido amniótico (IN'T ANKER et al., 2003), periósteo (NAKAHARA et al., 1991), tecidos fetais (CAMPAGNOLI et al., 2001), e polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000). De acordo com a Sociedade Internacional em Terapia Celular, para serem classificadas como CTM, as células devem apresentar como características aderência ao material plástico das garrafas de cultivo, formato fibroblastoide, formação *clusters* celulares durante o cultivo *in vitro*, ostentar antígenos de superfície específicos, como o CD29, CD44, CD105 e CD90 e, ausência para outros antígenos de superfície, como o CD31, o CD34, o CD45, o CD117 e o CD11b e, por fim, a possuírem a capacidade de diferenciarem-se em células das linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica (DOMINICI et al., 2006; KOLF; CHO; TUAN, 2007; STEWART; STEWART, 2011).

Dentre as diferentes fontes citadas para obter-se as CTM, sobressai-se o tecido adiposo, devido a facilidade para a sua obtenção e rapidez para a proliferação em cultivo, possuindo inclusive, maior potencial de diferenciação quando comparado a medula óssea (WEI et al., 2016).

Lue et al. (2007), Monfesi et al. (2013) e Zhang et al. (2014) utilizaram em seus estudos CTM extraídas a partir de medula óssea, Yang et al. (2014), Chen et al. (2015) a partir de material de cordão umbilical, enquanto que Cakici et al. (2013), Mehrabani et al. (2015) obtiveram as células de tecido adiposo e, independentemente do material a partir do qual se extraiu as células-tronco, os autores relataram recuperação dos danos estruturais do tecido e do peso testicular, bem como da fertilidade.

Uma vez transplantadas as CTM, inicia-se uma ação parácrina, ou seja, ocorre a liberação de moléculas sinalizadoras que agem sob células próximas, realizando efeitos tróficos e imunomodulatórios. Essas ações dão-se pela atividade de promotores de migração celular, como o fator derivado de células estromais 1 (CXCL12) e o receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4); promotores de proliferação celular, como o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), o fator de crescimento insulínico (IGF), o fator de crescimento de fibroblástico básico (FGF-2), o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); promotores de angiogênese, como o VEGF, o fator de crescimento do hepatócito (HGF), a angiopoietina 1 e 2 (ANG-1, ANG-2) o FGF-2 e o PDGF; promotores de imunomodulação, como as interleucinas 6, 8 e 10 (IL-6, IL-8 e IL10), a prostaglandina E-2 (PGE-2), o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1RA) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), fator de crescimento transformador- β (TGF- β), receptor do fator de necrose tumoral (TNF-R), óxido nítrico (NO) e o HGF; promotores de ação antioxidante, como a stanniocalcina-1 (STC-1), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e o fator neurotrófico derivado de linhagem de célula glial (GDNF) (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013; KADAM; VAN SAEN; GOOSSENS, 2017).

Adicionalmente, as células transplantadas sofrem transdiferenciação em espermatogônias, e em outras células do tecido germinativo, tais como células de Sertoli e células de Leyding, como relatado pelos autores Nayernia et al. (2006), Lue et al. (2007), Cakici et al. (2013), Monfesi et al. (2013), Chen et al. (2015) e Kadam, Van Saen & Goossens (2017). Cakici et al. (2013) demonstraram inclusive a presença de CTM com o gene marcador fluorescente (proteína verde fluorescente - GFP) na progênie desses animais, sugerindo que as células transplantadas diferenciarem-se formando espermatozoides com capacidade fecundante.

1.5. Ensaio biológicos

1.5.1. Citometria de fluxo

O citômetro de fluxo é um equipamento que permite a análise simultânea e multiparamétrica de células e partículas que estejam em suspensão, a partir do direcionamento de um ou mais feixes de luzes sob o fluxo das amostras, que são imediatamente registrados por um sistema óptico-eletrônico. A partir do seu uso é possível avaliar a morfologia e a fisiologia celular, a expressão de proteínas intracelulares e extracelulares, o estabelecimento do perfil imunofenotípico e a expressão gênica (IBRAHIM; VAN DEN ENGH, 2007).

A determinação do perfil imunofenotípico através desse aparelho é especialmente indicada na avaliação de CTM já, para esse tipo celular, faz-se necessário a identificação simultânea de múltiplos antígenos e, com o uso desse aparelho é possível identificar-se até 17 antígenos em uma única célula (MARTINS et al., 2009; NERY et al., 2013).

Ainda, a citometria de fluxo é recomendada para a avaliação andrológica, tendo em vista que diferentemente das análises espermáticas de rotina, é capaz de inferir sobre o nível de fertilidade dos espermatozoides, pois examina alterações de padrões metabólicos ou bioquímicos, modificações estruturais latentes e a capacidade de interação dos mesmos com o ambiente externo (HOSSAIN et al., 2011).

1.5.2. Viabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação do DNA espermático

A viabilidade do espermatozoide relaciona-se à integridade da sua membrana plasmática, já que esta é essencial para que ele possa manter a homeostase, interagir com os demais tipos celulares e com o ambiente, inclusive com o epitélio de revestimento do trato vaginal e o complexo *cumulus*-oócito. A avaliação da integridade estrutural da membrana plasmática dá se utilizando marcadores permeáveis, marcadores impermeáveis, ou ainda, uma associação de ambos (HOSSAIN et al., 2011).

Um dos marcadores mais utilizados para essa avaliação é o Iodeto de Propídeo, na qual têm-se os espermatozoides com membrana plasmática intacta com fluorescência verde, enquanto que, quando não há integridade da membrana, ocorre

o influxo do iodeto de propídeo e, conseqüentemente, fluorescência vermelha (HOSSAIN et al., 2011).

O *status* da membrana mitocondrial do espermatozoide e, conseqüentemente, a sua capacidade energética para manutenção do metabolismo e mobilidade, pode também ser fortemente correlacionado com a capacidade de fertilização (ST. JOHN; JOKHI; BARRATT, 2005).

Entre os corantes marcadores fluorescentes utilizados na avaliação desse parâmetro por citometria de fluxo destacam-se a Rodamina 123 (R123), o Mito Tracker Green FM (MITO), o Iodeto de 5,5', 6,6' Tetracloro 1,1,3,3' Tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1) e o MitoStatus Red. Esses marcadores são internalizados em maior escala por mitocôndrias que apresentam potencial de membrana inalterado, quando comparado a mitocôndrias com alteração no seu potencial de membrana, dessa forma, os espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana emitem maior e menor fluorescência, respectivamente (HOSSAIN et al., 2011).

A ciclofosfamida ocasiona a formação de *crosslinks* e a fragmentação do DNA e, desse modo, torna-se pertinente a avaliação desse parâmetro, tendo em vista que este correlaciona-se com a diminuição da fertilidade, (AHMADI; NG, 1999) e, com a transmissão de alterações genéticas para a progênie (BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005; LIU; HALES; ROBAIRE, 2014).

A técnica de SCSA (teste da estrutura da cromatina no espermatozoide), desenvolvida por Evenson, Darzynkiewicz e Melamed (1980), é amplamente utilizada nas pesquisas de fragmentação do material genético de espermatozoides (SELVAM; AGARWAL, 2018). Com o auxílio de citômetro de fluxo, o SCSA avalia a sensibilidade da fita de DNA para a desnaturação na presença de solução ácida ou do aumento da temperatura, o que ocorre em maior extensão quando o material genético se encontra fragmentado (AGARWAL et al., 2016). Após a desnaturação, o material é incubado em Laranja de Acridina, que se liga a cromatina fragmentada, emitindo fluorescência vermelha-alaranjada, enquanto que, a cromatina íntegra emite fluorescência verde, já que o corante não se liga a ela (SELVAM; AGARWAL, 2018). Nesse sentido, partir do SCSA, é possível classificar os espermatozoides em cinco populações, com base na integridade do DNA e a estrutura da cromatina: I) Fragmentação de DNA não

mensurável; II) Fragmentação de DNA moderada; III) Alto índice de fragmentação; IV) índice total (% de moderados + % de altos índices), denominado DNA “*fragmentation index*” (% DFI) (EVENSON, 2011).

Outros ensaios utilizados para quantificação da fragmentação do DNA são os testes Laranja de Acridina, Anilina Azul, Cromomicina A3, Azul de Toluidina, TUNEL (Marcação de quebras no DNA por dUTP e deoxinucleotidil terminal transferase), SCD (Dispersão de cromatina de espermática) e o do Cometa (AGARWAL et al., 2016).

1.5.3. Integridade genética materna

Ratos machos expostos a ciclofosfamida apresentam esse composto em seu ejaculado, sendo capazes de transmiti-los as fêmeas quando se acasalam por meio da absorção via parede vaginal. Como resultado, têm-se a sua transmissão também para os embriões, ocorrendo o aumento das perdas pré-implantacionais (efeito dos genes dominantes letais) (HALES; SMITH; ROBAIRE, 1986).

Um método eficiente para a detecção de outros efeitos tóxicos que não os relacionados a fertilidade, como a ação direta sobre a fêmea, é o teste do micronúcleo, considerado o ensaio para avaliação de genotoxicidade *in vivo* mais amplamente utilizado pelos pesquisadores (HAYASHI, 2016), sendo eficiente para detecção de quebras de cromossomos e disfunções do fuso mitótico (TORRES-BUGARIN et al., 2015).

O primeiro teste para avaliação de micronúcleos foi desenvolvido por Boller e Schmid (1970) e, posteriormente, Hayashi, Sofuni e Ishidate (1983) desenvolveram uma técnica utilizando como corante a Laranja de Acridina que, quando em contato com micronúcleos presente em eritrócitos do sangue periférico, emite fluorescência verde (HAYASHI, 2016).

A formação de micronúcleos se dá durante a fase mitótica do ciclo celular, quando fragmentos cromossômicos (efeito clastogênico) ou ainda cromossomos inteiros não finalizam a migração anafásica (efeito aneugênico), tornando-se incapazes de incorporar-se aos núcleos das células-filhas (TORRESBUGARIN et al., 2015).

1.5.4. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal

Gestantes são constantemente expostas a medicamentos. Em estudos realizados no Brasil, constatou-se que 67,9% das mães brasileiras sofrem com a exposição inadequada de fármacos (COSTA; COELHO; SANTOS, 2017), inclusive de forma indireta, por meio dos seus parceiros sexuais (HALES; SMITH; ROBAIRE, 1986).

O uso seguro e/ou a exposição à medicamentos durante o período gestacional tornou-se uma preocupação dos profissionais de saúde somente após a década de 1960, quando, devido ao uso da talidomida, um sedativo utilizado como antiemético, registraram-se inúmeros casos de malformações fetais (MATTHEWS; McCOY, 2003; OSÓRIO-DE-CASTRO; PAUMGARTTEN; SILVER, 2003).

Antes desse período, acreditava-se que a placenta impedia ações farmacológicas sobre os conceptos, não havendo riscos teratológicos associados ao uso ou a exposição às drogas. Estudos posteriores, entretanto, revelaram que, devido as particularidades da metabolização fetal, há, inclusive, um maior risco de danos serem causados em decorrência do uso inadvertido de medicamentos (BERGLUND et al., 1984).

A fim de mensurar os efeitos de fármacos sob o sistema reprodutivo e o desenvolvimento embriofetal deve-se realizar estudos com modelos animais (roedores e lagomorfos) que abranjam todos os estágios de vida ou ainda, fases específicas, quando à exposição a substância-teste é limitada a períodos pontuais (ICH, 2017).

O desenho experimental mais utilizado é composto pela junção de três estudos, que avaliam a) fertilidade e desenvolvimento fetal precoce, b) desenvolvimento pré e pós-natal e a habilidade materna e c) desenvolvimento embriofetal (ICH, 2005).

Estudos que avaliam a fertilidade e o desenvolvimento fetal revelam alterações no ciclo estral, libido, maturação espermática, transporte dos oócitos pela tuba uterina, desenvolvimento pré-implantacional e implantação (ICH, 2005).

Estudos que analisam o desenvolvimento pré e pós-natal e a habilidade materna indicam mortes pré e pós-natais e alterações no crescimento e

desenvolvimento da geração F1, incluindo os efeitos sobre o seu sistema reprodutivo (ICH, 2005).

Por fim, estudos que investigam o desenvolvimento embriofetal são aqueles que possibilitam a avaliação da morte embriofetal, das alterações estruturais e de distúrbios de crescimento. Nesse modelo experimental, a gestação é mantida até a véspera do parto, quando se realiza a eutanásia da fêmea, seguida de laparotomia (abertura da cavidade abdominal), histerectomia (retirada do útero), histerotomia (abertura do útero) para a retirada dos fetos e onfalectomia (ressecção do umbigo dos fetos). Realiza-se a contagem do número de corpos lúteos, de implantações, de fetos vivos e de fetos mortos e sexagem dos animais. Os fetos e as placentas são pesados e analisados quanto a alterações estruturais externas. Finalmente, a ninhada é dividida pela metade, sendo 50% dos fetos destinados para a avaliação de malformações esqueléticas e, os outros 50%, destinados para a avaliação de malformações viscerais (ICH, 2005).

A partir dos dados coletados é possível ainda determinar a viabilidade fetal (n° de fetos vivos $\times 100 / n^{\circ}$ de implantes), a taxa de perdas pós-implantacionais (n° de implantes - n° de fetos vivos $\times 100 / n^{\circ}$ de implantações), o número de reabsorção; a taxa de reabsorção (n° de reabsorções $\times 100 / n^{\circ}$ de implantes), a taxa de fertilidade (n° de fêmeas prenhes $\times 100 / n^{\circ}$ de fêmeas acasaladas), a taxa de falsos-positivos (n° de fêmeas não prenhes em que se detectou *plug* vaginal $\times 100 / n^{\circ}$ de fêmeas acasaladas), o índice placentário (peso placentário / peso fetal), e a adequação do peso à idade da prenhes (APIP) (fetos com peso adequado para a idade de prenhez são aqueles que possuem peso entre a média $\times 1,7 \pm$ desvio padrão) (SOULIMANE-MOKTHAR et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2014; ISHIKAWA et al., 2018).

Como já citado anteriormente, todos esses parâmetros são alterados pela exposição paterna a ciclofosfamida, tornando, portanto, o modelo animal, especialmente o que avalia o desenvolvimento embriofetal, extremamente preditivo quanto aos efeitos de terapias que visam diminuir tais alterações, como o transplante de CTM.

Outros testes com uso de linhagens celulares, tecidos, órgãos ou culturas de organismos podem ser usados em associação com os testes *in vivo*, permitindo a redução do número de animais utilizados nos experimentos. Não obstante, esses

testes não atingiram, até o momento, a complexidade do processo de concepção e desenvolvimento gestacional, não podendo prever, com segurança, a ação de substâncias sobre a reprodução, tornando imperativo o uso de modelos *in vivo* para a avaliação da toxicidade de compostos-teste (ICH, 2005; ICH, 2017).

2. Referências bibliográficas

ABIODUNA, A. O.; ESTHERA, O. O.; CHRISTIANA, I. E.; ADERONKEA, A. K.; AYOWOLE, O. A. Neuro-endocrine effects of aqueous extract of *Amaranthus viridis* (Linn.) leaf in male Wistar rat model of cyclophosphamide-induced reproductive toxicity. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 608-619, 2016.

ADAMS, P. M.; FABRICANT, J. D.; LEGATOR, M. S. Beta-Endorphin: Possible Involvement in the Antihypertensive Effect of Central Alpha-Receptor Activation. **Science**, v. 211, p. 80-82, 1981.

AGARWAL, A.; MULGUND, A.; HAMADA, A.; CHYATTE, M. R. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive Biology and Endocrinology**, p.13-37, 2015.

AGARWAL, A.; MAJZOUN, A.; ESTEVES, S. C.; KO, E.; RAMASAMY, R.; ZINI, A. Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. **Translational Andrology and Urology**, v. 5, n. 6, p. 935-950, 2016.

AGUILAR-MAHECHA, A.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Chronic Cyclophosphamide Treatment Alters the Expression of Stress Response Genes in Rat Male Germ Cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1024-1032, 2002.

AHLMANN, M.; HEMPEL, G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 78, n. 4, p.661-671, 2016.

AHMADI, A.; NG, S-C. Fertilizing Ability of DNA-Damaged Spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 284, p. 696-704, 1999.

ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Chemotherapeutic Action of a Cyclic Nitrogen Mustard Phosphamide Ester (B518-ASTA) in Experimental Tumours of the Rat. **Nature**, v. 181, n. 4613, p. 931, 1958.

AUROUX, M.; DULIOUST, E.; SELVA, J.; RINCE, P. Cyclophosphamide in the F0 male rat: physical and behavioral changes in three successive adult generations. **Mutation Research**, v. 229, p. 189-200, 1990.

AZIZOLLAHI, S.; AFLATOONIAN, R.; GILANI, M. A. S.; BEHNAM, B.; TAJIK, N.; ASGHARI-JAFARABADI, M.; ASGARI, H. R.; KORUJI, M. Alteration of spermatogenesis following spermatogonial stem cells transplantation in testicular torsion-detorsion mice. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 6, p. 771-781, 2016.

BALIS, F. M.; HOLCENBERG, J. S.; BLEYER, W. A. Clinical Pharmacokinetics of Commonly Used Anticancer Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 8, p. 202-232, 1983.

BARTON, T. S.; WYROBEK, H. J.; HILL, F. S.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Numerical Chromosomal Abnormalities in Rat Epididymal Spermatozoa Following Chronic Cyclophosphamide Exposure. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1150-1157, 2003.

BARTON, T. S.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 102, n. 22, p. 7865–7870, 2005.

BERGLUND, F.; FLODH, H.; LUNDBORG, P.; PRAME, B.; SANNERSTEDT, R. Drug use during pregnancy and breast-feeding – A classification system for drug information. **Acta Obstreticia et Gynecologia Scandinavica - Supplement**, v. 126, p. 1-55, 1984.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemische Mutagenese beim Sauger, Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als *in vivo*-test system, Haematologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. **Humangenetik**, v.11, p. 35–54, 1970.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). Disponível em: <http://svs.aids.gov.br/cgiae/sim/>. 2014.

BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, v. 91, p. 11303-11307, 1994.

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PNAS**, v. 91, p. 11298–11302, 1994.

CAI, H.; XIA, X.; WANG, L.; LIU, Y.; HE, Z.; GUO, Q.; XU, C. *In vitro* and *in vivo* differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 433, p. 286–291, 2013.

CAKICI, C.; BUYRUKCU, B.; DURUKSU, G.; HALILOGLU, A. H.; AKSOY, A.; NISJK, A.; ULUDAG, O.; USTUN, H.; SUBASJ, C.; KARAOZ, E. Recovery of Fertility in Azoospermia Rats after Injection of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Sperm Generation. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-18, 2013.

CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I. A. G.; KUMAR, S.; BENNETT, P. R.; BELLANTUONO, I.; FISK, N. M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v.98, n.8, p. 2396-2402, 2001.

CHAN, M. K. Cyclophosphamide: A Drug Profile. **Journal of the Association of Pediatric Oncology Nurses**, v. 1, n. 3, p. 30-33, 1984.

CHEN, H.; TANG, Q-L.; WU, X-Y.; XIE, L-C.; LIN, L-M.; HO, G-Y.; MA, L. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 819-828, 2015.

COHEN, J. L.; JAO, J. Y.; JUSKO, W. J. Pharmacokinetics of cyclophosphamide in man. **British Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 8, p. 677-680, 1971.

COLVIN, M.; BRUNDRETT, R. B.; KAN, M-N. N.; JARDINE, I.; FENSELAU, C. Alkylating Properties of Phosphoramidate Mustard. **Cancer Research**, v. 36, p. 1121-1126, 1976.

COLVIN, M. E.; SASAKI, J. C.; TRAN, N. L. Chemical factors in the action of phosphoramidic mustard alkylating anticancer drugs: roles for computational chemistry. **Current Pharmaceutical Design**, v. 5, n. 8, p. 645-663, 1999.

CONDRIGTON, A. M.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Chronic Cyclophosphamide Exposure Alters the Profile of Rat Sperm Nuclear Matrix Proteins. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 303–311, 2007.

COSTA, D. B.; COELHO, H. L. L.; SANTOS, D. B. Utilização de medicamentos antes e durante a gestação: prevalência e fatores associados. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 2, p. 1-14, 2017.

CROOK, T. R.; SOUHAMI, R. L.; McLEAN, A. E. M. Cytotoxicity, DNA Cross-Linking, and Single Strand Breaks Induced by Activated Cyclophosphamide and Acrolein in Human Leukemia Cells. **Cancer Research**, v. 26, p. 5029-5034, 1986.

DALEY, G. Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B**, v. 370, p. 1-5, 2015.

DELBÈS, G.; VAISHEVA, F.; LUU, T.; MARCONA, L.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Reversibility of the effects of the chemotherapeutic regimen for non-Hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, on the male rat reproductive system and progeny outcome. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 332-338, 2010.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DORAK, M. T.; KARPUZOGLU, E. Gender Differences in Cancer Susceptibility: An Inadequately Addressed Issue. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 268, p. 1-11, 2012.

ELANGOVAN, N.; CHIOU, T-J.; TZENG, W-F.; CHU, S-T. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. **Toxicology**, v. 222, n. 1-2, p. 60-70, 2006.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews - Clinical Oncology**, v. 6, p. 638-647, 2009.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210 p. 1131-1133, 1980.

EVENSON, D. P. Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®): 30 Years of Experience with the SCSA®. In: Zini A., Agarwal A. (eds). **Sperm Chromatin**. New York: Springer, 2011, p. 125-149.

EVENSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 56-75, 2016.

FABRICANT, J. D.; LEGATOR, M. S.; ADAMS, P. M. Post-meiotic cell mediation of behavior in progeny of ale rats treated with cyclophosphamide. **Mutation Research**, v. 119, p. 185-190, 1983.

FANG, F.; LI, Z.; ZHAO, Q.; LI, H.; XIONG, C. Human induced pluripotent stem cells and male infertility: an overview of current progress and perspectives. **Human Reproduction**, v. 33, n. 2, p. 188-195, 2018.

FENSELAU, C.; KAN, M-N. N.; RAO, S. S.; MYLES, A.; FRIEDMAN, O. M.; COLVIN, M. Identification of Aldophosphamide as a Metabolite of Cyclophosphamide in Vitro and in Vivo in Humans. **Cancer Research**, v. 37, p. 2538-2543, 1977

FRANCIS, A. J.; ANDERSON, D.; EVANS, J. G.; JENKINSON, P. C.; GODBERT, P. Tumours and malformations in the adult offspring of cyclophosphamide-treated and control male rats - Preliminary Communication. **Mutation Research**, v. 229, 239-246, 1990.

FRIEDMAN, O. M.; SELIGMAN, A. M. Preparation of N-Phosphorylated Derivatives of Bis-Beta-chloroethylamine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 76, n. 3, p. 655-658, 1954.

FORBES, C. M.; FLANNIGAN, R.; SCHLEGEL, P. N. Spermatogonial stem cell transplantation and male infertility: Current status and future directions. **Arab Journal of Urology**, v. 16, p. 171-180, 2018.

GHOBADI, E.; MOLOUDIZARGARI, M.; ASGHARI, M. H.; ABDOLLAHI, M. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 525-536, 2018.

GREEN, D. M.; KAWASHIMA, T.; STOVALL, M.; LEISENRING, W.; SKLAR, C. H.; MERTENS, A. C.; DONALDSON, S. S.; BYRNE, J.; ROBISON, L. L. Fertility of Male Survivors of Childhood Cancer: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 2, p. 332-339, 2010.

GRENIER, L.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Paternal Cyclophosphamide Exposure Induces the Formation of Functional Micronuclei during the First Zygotic Division. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2011.

GRENIER, L.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. The Activation of DNA Damage Detection and Repair Responses in Cleavage-Stage Rat Embryos by a Damaged Paternal Genome. **Toxicological Sciences**, v. 127, n. 2, p. 555-566, 2012.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LANNOU, D. L. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 17-26, 1995.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 97, n. 25, p. 13625–13630, 2000.

HALES, B. F.; SMITH, S.; ROBAIRE, B. Cyclophosphamide in the Seminal Fluid of Treated Males: Transmission to Females by Mating and Effect on Pregnancy Outcome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 84, p. 423-430, 1986.

HALES, B. F. DNA repair disorders causing malformations. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, p. 234-240, 2005.

HALES, B. F.; BARTON, T. S.; ROBAIRE, B. Impact of Paternal Exposure to Chemotherapy on Offspring in the Rat. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 34, p. 28-31, 2005.

HARROUK, W.; CONDRINGTON, A.; VINSON, R.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Paternal exposure to cyclophosphamide induces DNA damage and alters the expression of DNA repair genes in the rat preimplantation embryo. **Mutation Research**, v. 461, n. 3, p. 229-241, 2000.

HAY, A. E.; MEYER, R. M. Balancing Risks and Benefits of Therapy for Patients with Favorable-Risk Limited-Stage Hodgkin Lymphoma: The Role of Doxorubicin, Bleomycin, Vinblastine, and Dacarbazine Chemotherapy Alone. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n.1, p. 49-63, 2014.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE Jr, M. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation Research**, v. 120, p. 241–247, 1983

HAYASHI, M. The micronucleus test - most widely used in vivo genotoxicity test -. **Genes and Environment**, v. 38, n. 18, p. 1-6, 2016.

HEMMINKI, K.; KALLAMA, S. Reactions of nitrogen mustards with DNA. **IARC Scientific Publications**, v. 78, p. 55-70, 1986.

HERMANN, B. P.; SUKHWANI, M.; WINKLER, F.; PASCARELLA, J. N.; PETERS, K .A.; SHENG, Y.; VALLI, H.; RODRIGUEZ, M.; EZZELARAB, M.; DARGO, G.; PETERSON, K.; MASTERSON, K.; RAMSEY, C.; WARD, T.; LIENESCH, M.; VOLK, A.; COOPER, D. K.; THOMSON, A. W.; KISS, J. E.; PENEDO, M. C. T.; SCHATTEN, G. P.; MITALIPOV, S.; ORWING, K. E. Spermatogonial stem cell transplantation into Rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 5, p. 715–726, 2012.

HOSSAIN, S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 406-419, 2011.

HUBNER, K.; FUHRMANN, G.; CHRISTENSON, L. K.; KEHLER, J.; REINBOLD, R., DE LA FUENTE, R.; WOOD, J.; STRAUSS III J. F.; BOIANI, M.; SCHOLER, H. R. Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells. **Science**, v. 300, p. 1251-1256, 2003.

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

IBRAHIM, S. F.; VAN DEN ENGH, G. Flow Cytometry and Cell Sorting. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 106, p. 19-39, 2007.

ICH. Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products & Toxicity to Male Fertility S5(R2), International Council for Harmonisation (ICH), 2005.

ICH. Draft ICH Harmonised Guideline Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals S5(R3), International Council for Harmonisation (ICH), 2017.

IN'T ANKER, P.S.; PIETERNELLA, S.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN DER KEUR, C.; NOORT, W. A.; CLAAS, F. H. J.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v.102, n.4, p.1548-1549, 2003.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescents e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: Inca, 2016.

ISHIKAWA, R. B.; VANI, J. M.; NEVES, S. C.; RABACOW, A. P. M.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J.; CARDOSO, C. A. L.; MONREAL, A. C. D. F.; ANTONIOLLI, A. C. M. B.; CUNHA-LAURA, A. L.; OLIVEIRA, R. J. The safe use of *Doliocarpus dentatus* in the gestational period: Absence of changes in maternal reproductive performance, embryo-fetal development and DNA integrity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 217, p. 1-6, 2018.

JAHNUKAINEN, K.; EHMCKE, J.; SCHLATT, S. Testicular function and fertility preservation in male cancer patients. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 25, p. 287-302, 2011.

JENKINSON, P. C.; ANDERSON, D. Malformed fetuses and karyotype abnormalities in the offspring of cyclophosphamide and allyl alcohol-treated male rats. **Mutation Research**, v. 229, p. 173-184, 1990.

ST. JOHN, J. C.; JOKHI, R. P.; BARRATT, C. L. R. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. **International Journal of Andrology**, v. 28 p. 65-73, 2005.

KADAM, P.; VAN SAEN, D.; GOOSSENS, E. Can mesenchymal stem cells improve spermatogonial stem cell transplantation efficiency? **Andrology**, v. 5, p. 2-9, 2017.

KAWAY, K.; NISHIYAMA, H. Preservation of fertility of adult male cancer patients treated with chemotherapy. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 5, p. 957-964, 2018.

KELLY, S. M.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Paternal Cyclophosphamide Treatment Causes Postimplantation Loss via Inner Cell Mass-Specific Cell Death. **Teratology**, v. 45, p. 313-318, 1992.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, p. 1-10, 2007.

KU, J. Y.; PARK, N. C.; JEON, T. G.; PARK, H. J. Semen Analysis in Cancer Patients Referred for Sperm Cryopreservation before Chemotherapy over a 15-Year Period in Korea. **The World Journal of Men's Health**, v. 33, n. 1, p. 8-13, 2015.

LAMBERT, G.; POIROT, C.; GUÉRIN, F.; BRUGIÈRES, L.; MARTELLI, H. Preservation of future fertility in pediatric patients with cancer. **Journal of Visceral Surgery**, v. 155, supl.1, p. 41-46, 2018.

LIU, M.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Effects of Four Chemotherapeutic Agents, Bleomycin, Etoposide, Cisplatin, and Cyclophosphamide, on DNA Damage and Telomeres in a Mouse Spermatogonial Cell Line. **Biology of Reproduction**, v. 90, n. 4, p. 1-10, 2014.

LUE, Y.; ERKILA, K.; LIU, P. Y., MA, K.; WANG, C.; HIKIM, A. S.; SWERDLOFF, R. S. Fate of Bone Marrow Stem Cells Transplanted into the Testis - Potential Implication for Men with Testicular Failure. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 899-908, 2007.

MARCHETTI, F.; BISHOP, J. B.; COSENTINO, L.; MOORE II, D., WYROBEK, A. J. Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine Their Embryonic Fate. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 616-624, 2004.

MARTINS, A. A.; PAIVA, A.; MORGADO, J. M.; GOMES, A.; PAIS, M. L. Quantification and Immunophenotypic Characterization of Bone Marrow and Umbilical Cord Blood

Mesenchymal Stem Cells by Multicolor Flow Cytometry. **Transplantation Proceedings**, v. 41, p. 943-946, 2009.

MATTHEWS, S. J.; McCOY, C. Thalidomide: A Review of Approved and Investigational Uses. **Clinical Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 342-395, 2003.

MEHRABANI, D.; HASSANSHASHI, M. A. M.; TAMADON, A.; ZARE, S.; KESHAVARZ, S.; RAHMANIFAR, F.; DIANATPOUR, M.; KHODABANDEH, Z.; JAHROMI, I. R.; TANIDEH, N.; RAMZI, M.; AQABABA, H.; KUHI-HOSEINABADI, O. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*, v. 8, n. 2, p. 103-110, 2015.

MIELCAREK, M.; FURLONG, T.; O'DONNELL, P. V.; STORER, B. E.; McCUNE, J. S.; STORB, R.; CARPENTER, P. A.; FLOWERS, M. E. D.; APPELBAUM, F. R.; MARTIN, P. J. Posttransplantation cyclophosphamide for prevention of graft-versus-host disease after HLA-matched mobilized blood cell transplantation. **Blood**, v. 127, n. 11, p. 1502-1508, 2016.

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

MOSS, T. J.; WALLRATH, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research**, v. 618, p. 163-174, 2007.

MOUKA, A.; IZARD, V.; TACHDIJAN, G.; BRISSET, S.; YATES, F.; MAYEUR, A.; DRÉVILLON, L.; JARRAY, R.; LÉBOULCH P.; MAOUCHE-CHRÉTIEN, L.; TOSCA, L. Induced pluripotent stem cell generation from a man carrying a complex chromosomal

rearrangement as a genetic model for infertility studies. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-12, 2017.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, p. 1-16, 2013.

NAKAHARA, H.; DENNIS, J. E.; BRUDER, S. P.; HAYNESWORTH, S. E.; LENNON, D. P.; CAPLAN, A. I. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. **Experimental Cell Research**, v.195, n.2, p.492 -503, 1991.

NAYERNIA, K.; LEE, J. H.; DRUSENHEIMER, N.; NOLTE, J.; WULF, G.; DRESSEL, R.; GROMOLL, J.; ENGEL, W. Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. **Laboratory Investigation**, v. 86, p. 654–663, 2006.

NERY, A. A.; NASCIMENTO, I. C.; GLASER, T.; BASSANEZE, V.; KRIEGER, J. E.; ULRICH, H. Human Mesenchymal Stem Cells: From Immunophenotyping by Flow Cytometry to Clinical Applications. **Cytometry Part A**, v. 83, n. 1, p. 48-61, 2013.

OGAWA, T.; DOBRINSKI, I.; AVARBOCK, M. R.; BRINSTER, R. L. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 29-34, 2000.

OLIVEIRA, R. J.; PESARINI, J. R.; SALLES, M. J. S.; KANNO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. S.; LEITE, V. S.; SILVA, A. F.; MATIAZI, H. J.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 111-119, 2014.

ONAOLAPO, A. Y.; OLADIPO, B. P.; ONAOLAPO, O. J. Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. **Andrologia**, v. 3, p. 1-10, 2017.

OSÓRIO-DE-CASTRO, C. G. S.; PAUMGARTTEN, F. J. R.; SILVER, L. D. O uso de medicamentos na gravidez. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 9, n. 4, p. 987-996, 2004.

POURMOGHADAM, Z.; AGHEBATI-MALEKI, L.; MOTALEBNEZHAD, M.; YOUSEFI, B.; YOUSEFI, M. Current approaches for the treatment of male infertility with stem cell therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 10, p. 1-15, 2018.

QIU, J.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Adverse effects of cyclophosphamide on progeny outcome can be mediated through post-testicular mechanism in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 926-931, 1992.

REZENDE, S. S. M.; REZENDE, A. S. M. Células-tronco embrionárias: relevâncias bioéticas e jurídicas. **HU Revista**, v. 35, n. 1, p. 53-58, 2009.

REZVANFAR, M. A.; SADRHANLOU, R. A.; AHMADI, A.; SHOJAEI-SADEE, H.; REZVANFAR, M. A.; MOHAMMADIRAD, A.; SALEHNIA, A.; ABDOLLAHI, M. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p. 901-910, 2008.

RUDDON, R. W. Characteristics of human cancer. In: RUDDON, R. W. **Cancer biology**. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2007. p. 3-16.

RUEFFER, U.; BREUER, K.; JOSTING, A.; LATHAN, B.; SIEBER, M.; MANZKE, O.; GROTHENHERMEN, F. J.; TESCH, H.; BREDENFELD, H.; KOCH, P.; NISTER-BACKES, H.; WOLF, J.; ENGERT, A.; DIEHL, V. Male gonadal dysfunction in patients with Hodgkin's disease prior to treatment. **Annals of Oncology**, v. 12, p. 1307-1311, 2001.

SCHOVER, L. R.; BREY, K.; LICHTIN, A.; LIPSHULTZ, L. I.; JEHA, S. Knowledge and Experience Regarding Cancer, Infertility, and Sperm Banking in Younger Male Survivors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 7, p. 1880-1889, 2002.

SEANDEL, M.; RAFFI, S. Reproductive biology: In vitro sperm maturation. **Nature**, v. 471, p. 453–455, 2011.

SELVAM, M. K. P.; AGARWAL, A. A systematic review on sperm DNA fragmentation in male factor infertility: Laboratory assessment. **Arab Journal of Urology**, v. 16, n. 1, p. 65-76, 2018.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 7-30, 2018.

SLADEK, N. E. Metabolism of Oxazasphosphorines. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 37, p. 301-355, 1988.

SOULIMANE-MOKHTARI, N. A.; GUERMOUCHE, B.; YESSOUFOU, A.; SAKER, M.; MOUTAIROU, K.; HICHAMI, A., KHAN, N. A. Modulation of lipid metabolism by n– 3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. **Clinical Science**, v. 109, p. 287-295, 2005.

STARZL, T. E.; GROTH, C. G.; PUTNAM, C. W.; CORMAN, J.; HALGRIMSON, C. G.; PENN, I.; HUSBERG, B.; GUSTAFSSON, A.; CASCARDO, S.; GEIS, P.; IWATSUKI, S. Cyclophosphamide for Clinical Renal and Hepatic Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 511-516, 1973.

STELIAROVA-FOUCHER, E.; COLOMBET, M.; RIES, L.; MORENO, F.; DOLYA, A.; BRAY, F.; HESSENLING, P.; SHIN, H.; STILLER, C. A. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. **Lancet Oncology**, v. 18, n. 6, p. 719-731, 2017.

STEWART, M. C.; STEWART, A. A. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 27, p. 243-261, 2011.

SUKHU, T.; ROSS, S.; COWARD, M. Urological Survivorship Issues Among Adolescent Boys and Young Men Who Are Cancer Survivors. **Sexual Medicine Reviews**, v. 3, p. 396-409, 2018.

THOMSON, A. B.; CRITCHLEY, H. O. D.; KELNAR, C. J. H.; WALLACE, W. H. B. Late reproductive sequelae following treatment of childhood cancer and options for fertility preservation. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 311-334, 2002.

TORRES-BUGARÍN, O.; MACRIZ ROMERO, N.; RAMOS IBARRA, M.L.; FLORES-GARCÍA, A.; VALDEZ ABURTO, P.; ZAVALA-CERNA, M.G. Genotoxic Effect in Autoimmune Diseases Evaluated by the Micronucleus Test Assay: Our Experience. **BioMed Research International**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2015.

TRAILA, A.; DIMA, D.; ACHIMAS-CADARIU, P.; MICU, R. Fertility preservation in Hodgkin's lymphoma patients that undergo targeted molecular therapies: an important step forward from the chemotherapy era. **Cancer Management and Research**, v. 10, n. 1, p. 1517-1526.

TRASLER, J. M.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Paternal cyclophosphamide treatment of rat causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. **Nature**, v. 316, n. 6024, p. 144-146, 1985.

TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. **Toxicology**, v. 248, p. 96-103, 2008.

TURK, G.; CERIBASI, A. O.; SAKIN, F.; SONMEZ, M.; ATESSAHIN, A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 4, p. 587-596, 2010.

VAISHEVA, F.; DELBÈS, G.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Effects of the Chemotherapeutic Agents for Non-Hodgkin Lymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (CHOP), on the Male Rat Reproductive System and Progeny Outcome. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 578-587, 2007.

VAKALOPOULOS, I.; DIMOU, P.; ANAGNOSTOU, I.; ZEGNIADOU, T. Impact of cancer and cancer treatment on male fertility. **Hormones**, v. 14, n. 4, p. 579-589, 2015.

DEL VENTO, F.; VERMEULEN, M.; MICHELE, F.; GIUDICE, M. G.; POELS, J.; RIEUX, A.; WYNS, C. Tissue Engineering to Improve Immature Testicular Tissue and Cell Transplantation Outcomes: One Step Closer to Fertility Restoration for Prepubertal Boys Exposed to Gonadotoxic Treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 286, 1-24, 2018.

VEAL, G. J.; COLE, M.; CHINNASWAMY, G.; SLUDDEN, J.; JAMIESON, D.; ERRIGTON, J.; MALIK, G.; HILL, C. R.; CHAMBERLAIN, T.; BODDY, A. V. Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 56-64, 2016.

VOLAREVIC, V.; BOJIC, S.; NURKOVIC, J.; VOLAREVIC, A.; LJUJIC, B.; ARSENIJEVIC, N.; LAKO, M.; STOJKOVIC, M. Stem Cells as New Agents for the Treatment of Infertility: Current and Future Perspectives and Challenges. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

WEI, Y.; FANG, J.; CAI, S.; LV, C.; ZHANG, S.; HUA, J. Primordial germ cell–like cells derived from canine adipose mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 49, p. 503-511, 2016.

World Health Organization (2016). International Childhood Cancer Day: Much remains to be done to fight childhood cancer.

YANG, R-F.; LIU, T-H.; ZHAO, K.; XIONG, C-L. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, p. 698–704, 2014.

ZHANG, J.; TIAN, Q.; ZHOU, S-F. Clinical Pharmacology of Cyclophosphamide and Ifosfamide. **Current Drug Therapy**, v. 1, p. 55-84, 2006.

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

ZHU, Y.; HU, H-L.; LI, P.; YANG, S.; ZHANG, W.; DING, H.; TIAN, R-H.; NING, Y.; ZHANG, L-L.; GUO, X-Z.; SHI, Z-P.; LI, Z.; HE, Z. Generation of male germ cells from

induced pluripotent stem cells (iPS cells): An in vitro and in vivo study. **Asian Journal of Andrology**, v. 4, p. 574–579, 2012.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p. 4279–4295, 2002.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos do tratamento com CTM em camundongos *Swiss* expostos ao quimioterápico ciclofosfamida no que se refere à fertilidade, desempenho reprodutivo, gestação e progênie.

3.2. Objetivos Específicos

- Obter, isolar e expandir as CTM derivadas do tecido adiposo de camundongos;
- Induzir e diferenciar as CTM em tecido adiposo, condrogênico e osteogênico;
- Avaliar os efeitos do quimioterápico e/ou da terapia celular sobre os espermatozoides;
- Avaliar os efeitos do quimioterápico e/ou da terapia celular sobre os parâmetros reprodutivos;
- Avaliar os efeitos do quimioterápico e/ou da terapia celular sobre progênie por meio de ensaios de teratogênese.

4. Manuscrito

A presente pesquisa forneceu dados para a elaboração do artigo científico intitulado “Avaliação dos efeitos da terapia celular com células-tronco mesenquimais no desempenho reprodutivo de camundongos machos tratados com ciclofosfamida e no desenvolvimento embrionário de suas proles”, que será submetido para a publicação no periódico *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, que possui *fator de impacto de 4.089* e é classificado como *Qualis Capes A1 interdisciplinar*.



Edited By: Rui L. Reis

Impact factor: 4.089

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2017: 27/161 (Biotechnology & Applied Microbiology)

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2017: 7/24 (CELL & TISSUE ENGINEERING)

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2017: 69/190 (Cell Biology)

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2017: 10/78 (Engineering, Biomedical)

Online ISSN: 1932-7005

© John Wiley & Sons Ltd



LATEST ISSUE >

Volume 12, Issue 12
December 2018

Avaliação dos efeitos da terapia celular com células-tronco mesenquimais no desempenho reprodutivo de camundongos machos tratados com ciclofosfamida e no desenvolvimento embrionário de suas proles

Giovana Corbucci Danti Rezende^{1,2}, Bruno Ivo Pelizaro^{1,3}, Breno Fernandes Barreto Sampaio^{4,5,6}, Raiza Rocha Pereira⁵, Antonio Carlos Duenhas Monreal^{6,7}, Sarah Alves Auharek⁸, Andréia Conceição Milan Brochado Antonioli-Silva^{1,2}, Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2,9*}.

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

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

³Programa de Pós-graduação em Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Laboratório Multiuso de Reprodução, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁵Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁶Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁷Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁸Faculdade de Medicina do Mucuri, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e do Mucuri–UFVJM, Teófilo Otoni, MG, Brasil

⁹Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas - CCB, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

Resumo

A terapia celular com células-tronco mesenquimais (CTM) pode promover a restauração da função reprodutiva após tratamento antineoplásico em modelos animais. A presente pesquisa avaliou os efeitos da terapia celular no desempenho reprodutivo de camundongos machos adultos tratados com ciclofosfamida e, de modo inédito, o desenvolvimento embrionário da sua progênie. Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: Controle Negativo (CN) – 6 administrações de água de injeção via intraperitoneal (i.p.) e 2 administrações de solução tampão fosfato (PBS) via intravenosa (i.v.); Controle Positivo (CP) – 6 administrações de ciclofosfamida (150 mg/kg, i.p.) e duas administrações de PBS (i.v.); e Células-Tronco Mesenquimais (CTM) – 6 administrações de ciclofosfamida (150 mg/kg, i.p.) e 2 transplantes de CTM ($1,0 \times 10^6$ células, i.v.). Após o período de indução, ocorreu o acasalamento (1 macho: 1 fêmea) seguido da eutanásia dos machos. Acompanhou-se a gestação até a eutanásia das fêmeas no 18º dia gestacional. Os resultados comprovaram que a terapia celular promoveu o aumento da viabilidade da membrana plasmática e da integridade genética dos espermatozoides dos animais expostos ao quimioterápico, todavia, não foi capaz de reverter as baixas taxas de fertilidade. Diante do exposto, considera-se que a terapia celular, de acordo com o presente delineamento, não promoveu a recuperação da função reprodutiva dos animais, no entanto, os resultados permitem sugerir recuperação da viabilidade e integridade genética dos gametas, fatores chave nos tratamentos contra a infertilidade, abrindo perspectivas para futuras pesquisas com terapias celulares.

Palavras-chave: terapia celular, tecido adiposo, câncer, infertilidade, antineoplásico, medicina reprodutiva.

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial da Saúde, anualmente, são diagnosticados 215.000 casos de câncer em indivíduos entre 0 e 19 anos (WHO, 2016). Nos Estados Unidos da América previa-se que, somente no ano de 2018, cerca de 10.590 crianças e pré-adolescentes até 14 anos seriam diagnosticadas com essa doença (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). No entanto, apesar da alta incidência, os avanços nos protocolos terapêuticos de quimioterapia, desde os anos 1970 até o presente, possibilitaram a redução de aproximadamente 65% da mortalidade causada pelo câncer nessa faixa etária (GREEN et al., 2010; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018). No entanto, associado ao aumento da expectativa de vida desses indivíduos estão os efeitos colaterais do uso de quimioterápicos e, dentre eles, cita-se a infertilidade na vida adulta (TRAILA, 2018).

Tratamentos contra a infertilidade, como as técnicas de reprodução assistida, de reposição hormonal e intervenções cirúrgicas aumentaram o número de homens que, antes inférteis, foram capazes de gerarem descendentes (POURMOGHADAM et al., 2017). Porém, essas terapias não são indicadas para indivíduos incapazes de produzir gametas ou que os produzem deficientemente devido à ação citotóxica de fármacos antineoplásicos que causam extenso comprometimento das reservas de espermatogônias-tronco (FORBES; FLANNIGAN; SCHLEGEL, 2018). Além desses indivíduos ainda se destacam crianças e jovens pré-púberes, que ainda não produzem espermatozoides maduros e, que, portanto, não são elegíveis à criopreservação do sêmen (SEANDEL; RAFFI, 2011) mas que foram expostos aos quimioterápicos. Desse modo, outros protocolos terapêuticos para atender a esses pacientes fazem-se necessários e, por essa razão, estudos que lançam mão de terapias celulares ganham espaço entre a comunidade científica (MEHRABANI et al., 2015; LORZADEH; KAZEMIRAD, 2018).

As características intrínsecas das células-tronco mesenquimais (CTM) de auto-renovação, proliferação e diferenciação em diferentes tipos celulares adultos, torna a terapia uma possibilidade concreta para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos no campo da medicina regenerativa (RA et al., 2011) e, em especial, na área de reprodução (POURMOGHADAM et al., 2017). A comprovação da eficácia da terapia com CTM na recuperação do epitélio germinativo masculino já foi reportada em modelos experimentais com camundongos (CHEN et al., 2015; KADAM; VAN SAEN;

GOOSSENS, 2017), ratos (CAKICI et al., 2013; MONFESI et al., 2013; YANG et al., 2014; ZHANG et al., 2014; MEHRABANI et al., 2015) e hamsters (VAHDATI et al., 2017). Nesse contexto, esse estudo avaliou os efeitos das CTM derivadas de tecido adiposo no desempenho reprodutivo de camundongos machos expostos à ciclofosfamida e, de modo inédito, no desenvolvimento embriofetal da sua progênie.

2. Material e método

2.1. Animais

Utilizou-se 70 camundongos *Mus musculus* da variedade *Swiss*, com peso médio de 30 g, adultos, em idade reprodutiva, machos (n= 30) e fêmeas (n= 40), do mesmo grupo de contemporâneos, cedidos pelo Biotério Central da UFMS. O período de adaptação antes do início do experimento deu-se durante 7 dias.

Manteve-se os animais em caixas de polipropileno, isolados no caso dos machos e em dupla no caso das fêmeas, identificadas e forradas com cepilho sob condições padronizadas de climatização em *rack* ventilada Alesco® (com temperatura mantendo-se em torno de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $55 \pm 10\%$) e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*.

Obteve-se a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais para a realização do presente estudo junto à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o protocolo #920/2017.

2.2. Delineamento Experimental

Distribuiu-se os animais em dois lotes, sendo o primeiro, composto por 10 fêmeas doadoras do tecido adiposo para a obtenção das CTM e, o segundo, composto pelos demais animais. Alocou-se aleatoriamente os machos em três grupos experimentais (n=10): Controle Negativo (CN) - animais tratados com água de injeção, na proporção de 0,1mL/10g de peso corporal (p.c.) por via intraperitoneal (i.p.), durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as administrações e, duas administrações de solução tampão fosfato (PBS), livre de Ca^{+2} e Mag^{+2} com pH 7,4, por via intravenosa (i.v.), com intervalo de 10 dias, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico; Controle Positivo (CP) – animais tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg (p.c.;i.p) (Genuxal - Baxter®, CAS / 2638B5063, Lote 6/138) durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as administrações (DRUMOND et al., 2011) e, duas administrações de PBS (i.v.), com intervalo de 10

dias, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico; e Células-Tronco Mesenquimais (CTM) - animais tratados com ciclofosfamida na dose de 150 mg/kg (p.c.;i.p) durante 30 dias, com intervalo de 5 dias entre as administrações e, dois transplantes de 1×10^6 CTM (i.v.) de acordo com CAKICI et al. (2013), com modificações, com intervalo de 10 dias e, iniciando-se 24h após a última aplicação do quimioterápico.

Entre o 55^o e 59^o dias experimentais, os machos foram alocados *overnight* junto as fêmeas nulíparas, na proporção de 1 macho : 1 fêmea. Avaliou-se a presença do *plug* vaginal diariamente, para que se estabelece o dia zero gestacional (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013, 2014; DE DAVID et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). No 60^o dia experimental, submeteu-se os machos à pesagem, eutanásia por deslocamento cervical e retirada de órgãos (coração, pulmões, fígado, baço, rins, epidídimos e testículos). Acompanhou-se o período gestacional das fêmeas, com pesagens a cada 72 horas, até o 18^o dia gestacional, quando se realizou a eutanásia por deslocamento cervical e, posteriormente, laparotomia, histerectomia, histerotomia e onfalectomia, para a retirada dos fetos e de órgãos (OLIVEIRA et al., 2009; GONÇALVES et al., 2013, 2014; DE DAVID et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

2.3. Explante e cultivo das CTM

Explantou-se as CTM segundo o protocolo de Hermeto et al. (2016), com modificações. Obteve-se amostras de tecido adiposo da região abdominal/inguinal de camundongos fêmeas adultas após eutanásia por deslocamento cervical. Sucintamente, acrescentou-se meio DMEM *Low Glucose* (DMEMLG) (Sigma-Aldrich®, lote SLBS0097V, número de catálogo D5523), na proporção de 2 mL de meio para cada grama de tecido adiposo. Suplementou-se o meio com Colagenase tipo A1 (Gibco®, lote 1879368, número de catálogo 17100017) na proporção de 2 mg de colagenase para cada mL do meio DMEMLG. Manteve-se o material biológico em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, *overnight*. A inativação da atividade enzimática deu-se pela adição de meio de cultivo DMEMLG suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich®, lote SPBB2353V, número de catálogo F2561), na mesma quantidade de meio utilizado com colagenase anteriormente citado. Em seguida, centrifugou-se o material a 300 g durante 10 minutos. Ressuspendeu-se o *pellet* de células e plaqueou-se o material em garrafas de cultivo celular de 25 cm² com meio DMEMLG suplementado com 10% de SFB. Manteve-se as células em cultivo em

estufa a 37°C, com 5% de CO₂ até que essas atingissem cerca de 80% de confluência, quando realizou-se a tripsinização das células com solução a 0,025% de tripsina (LCG Biotecnologia, lote 11014AB, número de catálogo BR30042-01). Em seguida fez-se a contagem do número de células em câmara de Neubauer e o replaqueamento em frascos de 75 cm² de área de cultura. Esse processo de cultivo foi repetido até a 4ª passagem, quando se empreendeu o transplante das CTM.

2.4. Diferenciação das CTM

2.4.1. Diferenciação adipogênica

Realizou-se a diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica das CTM em 4ª passagem de acordo com o protocolo de Pesarini et al. (2017), com modificações. Um total de 1x10⁵ células foram semeadas em placas de cultivo de 6 poços e após adesão celular cultivou-se as células com os respectivos meios indutores.

O meio indutor adipogênico foi composto por 0,714 mL de insulina (Insunorm R®, Aspen Pharma/Aspen Brazil, 0,5 mg/mL), 100 mM de indometacina (0,0447 g de Indometacina, Sigma® número de catálogo I7378, diluída em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 3,5 mM rosiglitazona (0,0089 g de rosiglitazona, Sigma® número de catálogo R2408, em 5 mL de DMSO) e 10⁻⁵M de dexametasona (Sigma® número de catálogo D4902) para cada 1 mL de meio DMEMLG suplementado com 20% de SFB (ref?).

O meio indutor adipogênico foi composto por 79,0 mL de meio DMEMLG suplementado com 10% de SFB, 100 mL de solução ácida de ácido ascórbico (50 mg de ácido ascórbico 2-fosfato, Sigma® número de catálogo A8960, diluída em 10 mL de meio DMEMLG), 100 mL de solução estoque de beta-glicerofosfato (630 mg de beta-glicerofosfato, Sigma® número de catálogo G9891 diluída em 20 mL de meio DMEMLG) (ref?).

O meio indutor condrogênico foi adquirido comercialmente (kit *STEMPRO chondrogenic differentiation* - Gibco® Life Technologies, número de catálogo A1007101).

As trocas de meio ocorreram a cada 72 horas até o 14º dia (meios adipogênico e osteogênico) e 21º dia (meio condrogênico).

A cultura adipogênica foi fixada com formol 10%, lavada em isopropanol 60% e incubada com *Oil-Red-O* (Sigma® número de catálogo O0625) durante 20 minutos a temperatura ambiente. A cultura osteogênica foi fixada em formol 10%, lavada em solução tampão fosfato e incubada com Alizarina Vermelha (Sigma®, número de catálogo A5533) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A cultura condrogênica foi fixada com paraformaldeído 4%, lavada em solução tampão fosfato e incubada com Azul de Alcian (Neon Commercial®, Brazil, número de catálogo 74240) durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Observou-se com auxílio de microscópio Leica DMI8 e software LAS X, o acúmulo lipídico intracelular, os depósitos de cálcio e matriz extracelular rica em glicosaminoglicanos presente, respectivamente, nas culturas adipogênica, osteogênica e condrogênica.

2.5. Imunofenotipagem das CTM

Após a tripsinização das CTM em cultivo de 4^a e 5^a passagens, contou-se 2 x 10⁵ células em câmara de Neubauer e, posteriormente, incubou-se as células durante 30 minutos a 4°C junto aos anticorpos para os marcadores celulares CD29, CD34, CD44 e CD11b (Pharmingen® BD, San Diego, CA, EUA). Analisou-se 10⁴ eventos das amostras em citômetro FACSCalibur (laser a 488nm) (Becton Dickinson®, San Diego, CA, EUA) e software CellQuest. Construiu-se os histogramas por meio do Software in MDI 2,8 (SCHWEICH et al., 2017).

2.6. Preparação e transplante das CTM

Submeteu-se as células em 4^a passagem ao processo de tripsinização (Tripsina-EDTA, 0,025%), em seguida, lavou-se as células em solução tamponada de PBS a exaustão (homogeneização em 5 mL de PBS seguido de centrifugação a 300 g por 10 min, até que o *pellet* ficasse completamente limpo e o sobrenadante transparente) para o transplante.

Sujeitou-se os animais do grupo CTM à anestesia inalatória (Isoflurano - BioChimico®, Brasil, CAS/401. 4238-3, Lote/007070). Em seguida, transplantou-se 1x10⁶ CTM preparadas em solução de PBS (pH 7,4) por i.v., num volume máximo 100 µL, com auxílio de cateter intravenoso 24 G (Solidor®, Brasil, Lote/011606G). Repetiu-

se esse procedimento por mais uma vez, com intervalo de 10 dias entre as duas aplicações (CAKICI et al., 2013) e, aguardou-se 15 dias para iniciar os acasalamentos.

2.6. Avaliação da viabilidade da membrana plasmática, do potencial de membrana mitocondrial e da integridade genética de espermatozoides

Realizou-se as análises espermáticas citometria de fluxo (CytoFlex®, Beckman Coulter, Indianapolis, IN, EUA), a partir de espermatozoides obtidos após a eutanásia, quando os epidídimos foram retirados e divididos em fragmentos com auxílio de pinça e tesoura. Examinou-se 10^3 células por amostra e analisou-se os dados no *software* CytExpert® (versão 2.1 Beckman Coulter).

Diluí-se uma alíquota da amostra contendo 1×10^7 de espermatozoides/mL em TALP-PVA modificado (100 mmol/L NaCl; 3,1 mmol/L KCl; 25,0 mmol/L NaHCO₃; 0,3 mmol/L NaH₂PO₄; 21,6 mmol/L DL-lactato de sódio; 2,0 mmol/L CaCl₂; 0,4 mmol/L MgCl₂; 10,0 mmol/L HEPES sem BSA; 1,0 mg/mL álcool polivinílico e 25 mg/mL gentamicina) (PARRISH et al., 1988). Para a identificação das células e, exclusão de detritos celulares durante a passagem pelo citômetro, adicionou-se 70 nmol/L de Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA).

Aferiu-se a viabilidade da membrana plasmática pela sonda fluorescente iodeto de propídio (PI – Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA). Para o preparo da solução de estoque diluí-se 25 mg de iodeto de propídio (Sigma P4170) em 1 ml de DMSO. Adicionou-se a solução de trabalho às amostras (2 µL da solução estoque e diluída em 998 µL de TALP) em uma concentração de 15 nmol/L. As células com membrana intacta não ocorre a entrada do PI, enquanto que aquelas em que apresentam lesão são coradas em vermelho (HOSSAIN et al., 2011).

Na mesma amostra usada para a avaliação da viabilidade da membrana plasmática, analisou-se o potencial de membrana mitocondrial pela sonda MitoStatus Red (BD Pharmingen). Para o preparo da solução de estoque diluí-se 50 µg de MitoStatus Red (BD 564697) em 460 µL de DMSO. Adicionou-se a solução de trabalho às amostras (1 µL da solução estoque diluída em 99 µL de DMSO) em uma concentração 20 nmol/L. Considerou-se apenas as células negativas para a coloração PI, ou seja, apenas as células com membrana plasmática íntegra, para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Por meio do MitoStatus Red dividiu-se as células em duas populações, uma com alto potencial de membrana mitocondrial, coradas, e

outra com baixo potencial de membrana mitocondrial, não coradas pela sonda fluorescente (HOSSAIN et al., 2011).

A fim de realizar a passagem no citômetro de fluxo das amostras utilizadas para a aferição da viabilidade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial preparou-se duas alíquotas contendo 2×10^6 espermatozoides diluídos em 400 μL de TALP. Adicionou-se 50 μL da solução de trabalho de Hoechst, 2 μL da solução de trabalho de iodeto de propídio e 2 μL da solução de trabalho do Mitostatus Red às alíquotas e incubou sê-as a 37°C por 20 minutos ao abrigo da luz.

Avaliou-se a fragmentação da cromatina espermática com o auxílio da sonda fluorescente Laranja de Acridina (LA). Antes da adição da LA, as células foram tratadas por 30 segundos com uma solução detergente (pH 1,2) contendo 0,1% de Triton X-100, 0,15 M de NaCl e 0,08 M de HCl e, em seguida, realizou-se a centrifugação e retirada do sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* de células em 500 μL de solução de LA (0,6mg de LA diluídos em 100 mL de PBS) e 100 μL de solução de trabalho de Hoeschst. Decorridos 5 minutos de incubação a 5°C , avaliou-se as amostras pelo citômetro de fluxo em uma velocidade que não ultrapassassou 300 espermatozoides/segundo.

A solução de baixo pH tem a função de desnaturar o DNA que está danificado facilitando a ligação com a sonda fluorescente. As células que apresentaram a cromatina intacta, ou seja, as fitas duplas de DNA sem alteração mostraram coloração verde enquanto que aquelas que possuíam fragmentação na cromatina, apresentaram coloração vermelha (EVENSON, LARSON e JOST, 2002).

2.7. Análise histológica

No 60^o dia experimental submeteu-se os animais à eutanásia, quando realizou-se a retirada e fixação dos testículos através da imersão em solução de Bouin (75 mL de solução saturada de ácido pícrico, 25 mL formaldeído puro e 5 mL de ácido acético glacial) durante 24 horas. Após a fixação, desidratou-se e embebeu-se as amostras em parafina. Obteve-se os cortes histológicos com o auxílio do microtomo Leica RM2255 e corou-se as lâminas confeccionadas com entellan com o corante hematoxilina e eosina. Realizou-se as análises utilizando-se microscópio Leica DM1000 com câmera MC120HD (ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2018).

2.7. Desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal

Utilizou-se as fêmeas acasaladas com machos tratados com ciclofosfamida e, submetidos ou não ao transplante de CTM, para avaliação do desempenho reprodutivo e desenvolvimento embriofetal. Os parâmetros reprodutivos avaliados foram o número de implantes, o número de fetos vivos, a viabilidade fetal (n° de fetos vivos \times 100 / n° de implantes), a taxa de perdas pós-implantacionais (n° de implantes – n° de fetos vivos \times 100 / n° de implantações), o número de reabsorções, a taxa de reabsorção (n° de reabsorções \times 100 / n° de implantes), a taxa de fertilidade (n° de fêmeas prenhes \times 100 / n° de fêmeas acasaladas), a taxa de falsos-positivos (n° de fêmeas não prenhes em que se detectou *plug* vaginal \times 100 / n° de fêmeas acasaladas), o peso placentário, o peso fetal e o índice placentário (peso placentário / peso fetal) (OLIVEIRA et al., 2014). A adequação do peso à idade da prenhes (APIP) baseou-se no estudo de Soulimane-Mokhtar et al. (2005), classificando-se os fetos com peso adequado para a idade de prenhez aqueles possuísem peso entre a média \times 1,7 \pm desvio padrão. Os fetos com baixo peso para a idade de prenhez foram aqueles que apresentaram peso menor que a média \times 1,7 menos o desvio padrão e fetos com alto peso gestacional aqueles que apresentaram peso maior que a média \times 1,7 mais o desvio padrão.

Os fetos foram coletados, sexados, pesados, medidos com auxílio de paquímetro para o estabelecimento do diâmetro da cabeça à cauda, bem como da distância urogenital e sistematicamente analisados quanto à presença de malformações externas. Por fim, distribui-se aleatoriamente os fetos em dois subgrupos, cada um com cerca de metade da ninhada.

Fixou-se os fetos do primeiro grupo em solução de Boudians (142 mL de água destilada, 50 mL de ácido acético, 50 mL de formaldeído e 785 mL de álcool 95%) e destinou-se à análise visceral por meio de microdissecção com cortes estratégicos para o estudo de tórax e abdômen (BARROW; TAYLOR, 1969) e da cabeça (WILSON, 1965; OLIVEIRA et al., 2005, 2009). Baseou-se a classificação das malformações viscerais nos estudos de Wise et al. (1997) e Makris et al. (2009). Fixou-se os fetos do segundo subgrupo em acetona absoluta e destinou-se esses animais à análise esquelética (STAPLES; SCHNELL, 1964; OLIVEIRA et al., 2009). Após a fixação, eviscerou-se e diafanizou-se os fetos em KOH (0,8%) e, por fim realizou-se a

coloração das estruturas ósseas com Alizarina Vermelha. Baseou-se as classificações das malformações esqueléticas nos estudos Wise et al. (1997) e Makris et al. (2009).

2.8. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico

Coletou-se 20µL de sangue periférico por meio da punção da veia caudal das fêmeas acasaladas com os machos dos grupos experimentais, e depositou-se a amostra em uma lâmina previamente corada com Laranja de Acridina (1mg/mL) recoberta, em seguida, com lamínula. As coletas de sangue ocorreram 24 horas após a observação da presença do *plug* vaginal (diagnóstico de gestação). Armazenou-se o material em freezer (-20°C) por um período mínimo de quinze dias. Avaliou-se a presença de micronúcleos no interior de eritrócitos por meio de microscópio de fluorescência no aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm, analisando-se 2000 células/animal (HAYASHI et al., 1990; OLIVEIRA et al., 2009).

2.9. Análise Estatística

Utilizou-se o teste ANOVA/Tukey para a avaliação dos dados paramétricos, o teste Kruskal-Wallis/Dunn para dados não paramétricos e, o teste do Qui-quadrado para comparações de frequências entre os grupos experimentais (OLIVEIRA et al., 2009). Expressou-se as variáveis da análise espermática em porcentagem mediante a transformação dos dados em arco seno ($x/100$) como sugerido por Sampaio (1998). Empregou-se o teste ANOVA/Duncan, pelo procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001) para a comparação das variáveis dependentes da análise espermática. Para todos os dados produzidos no presente estudo apresentou-se a Média \pm Erro Padrão da Média com nível de significância estabelecido em $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Comprovação da capacidade de diferenciação celular e do perfil imunofenotípico das CTM

Confirmou-se o aspecto fibroblastóide (Figura 1A) das células e a capacidade de diferenciação das mesmas em adipócitos (Figura 1B), osteócitos (Figura 1C) e condrócitos (Figura 1D) quando induzidas à diferenciação, fato evidenciado pela presença de vacúolos de lipídeos, de depósitos de cálcio e de matriz extracelular rica em colágeno, respectivamente. Adicionalmente, as células expressaram os

marcadores celulares CD29 e CD44 enquanto que não ocorreu expressão os marcadores CD34 e CD11b, (Figura 1E). Juntos, esses dados possibilitam inferir que as células cultivadas eram CTM como sugerido por Dominici et al. (2006).

3.2. Parâmetros biométricos

O peso inicial dos machos dos diferentes grupos experimentais não apresentou diferença estatística ($p > 0,05$). Entretanto, os animais do grupo CN apresentaram maior peso final e maior ganho de peso, quando comparado aos animais dos grupos CP e CTM ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Os pesos absolutos do coração, pulmão e baço não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). Os pesos do fígado e rins dos animais do grupo CTM foram inferiores aos dos grupos CN e CP ($p < 0,05$). Já o peso absoluto dos testículos dos camundongos do grupo CN foi superior aos dos demais grupos experimentais (CP e CTM) ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Os pesos relativos do coração, pulmão, rins, baço e testículos não denotaram variação entre os grupos ($p > 0,05$). Já o peso do fígado aumentou ($p < 0,05$) no grupo CP em relação aos demais (Tabela 1).

Nas fêmeas, acasaladas com os machos dos diferentes grupos experimentais, não se observou variação estatisticamente significativa ($p > 0,5$) entre o peso inicial, ganho de peso, ganho de peso líquido, peso do útero e os pesos absolutos e relativos do coração, pulmão, fígado, baço, rins e ovários (Tabela 2). Além disso, não se verificou disparidades significativas no desenvolvimento ponderal ao longo do período gestacional (Figura 2).

3.3. Viabilidade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e integridade genética de espermatozoides

A frequência de espermatozoides vivos, avaliados pela viabilidade da membrana plasmática, reduziu ($p < 0,05$) no grupo tratado com a ciclofosfamida em 2,38x em relação ao CN. Já o grupo CTM apresentou aumento da viabilidade da membrana plasmática em 2x em relação ao CN (Figuras 3A e 3B).

O tratamento com ciclofosfamida, na presença ou ausência das CTM, não acarretou em alteração no potencial de membrana mitocondrial visto que não houve variação entre os diferentes grupos experimentais ($p > 0,05$) (Figuras 3C e 3D).

Em relação à integridade genética dos espermatozoides observou-se que o tratamento com a ciclofosfamida provocou uma redução de 1,78x na frequência de células com cromatina íntegra ($p < 0,05$). Todavia, quando a ciclofosfamida foi associada à terapia com CTM não se registrou redução da frequência de células com cromatina íntegra (Figuras 3E e 3F).

3.4. Avaliação histológica

Os animais dos grupos CN e CTM apresentaram os compartimentos tubulares e intertubulares preservados (Figuras 4-A, C, D, F). Entretanto, observou-se depleção do epitélio seminífero nos animais do grupo CP, expostos à ciclofosfamida (Figuras 4 - B, E).

3.4. Avaliação dos parâmetros reprodutivos

Ocorreu menor taxa de fertilidade, bem como o aumento da taxa de falso positivo entre as fêmeas acasaladas com os machos dos grupos CP e CTM (Tabela 3).

Em relação ao número de implantes, de fetos vivos e mortos, da viabilidade fetal, número e da taxa de reabsorção, taxa de perdas pós-implantacionais, pesos fetais e placentários, índice placentário, distância cabeça-cauda e distância anogenital, nenhuma variabilidade significativa foi observada ($p > 0,05$) (Tabela 3).

A adequação da idade ao peso gestacional demonstrou que para o grupo CN 89,2% dos recém-nascidos tinham o peso adequado, 5,4% tinham peso inferior ao da idade gestacional e 5,4% tinham peso superior ao da idade gestacional (Tabela 3), não havendo diferença significativa entre os demais grupos experimentais ($p > 0,05$).

3.5. Avaliação do desenvolvimento embriofetal

As malformações externas e viscerais não diferiram de modo estatisticamente significativo entre os fetos oriundos dos diferentes grupos experimentais e, todas as malformações observadas distribuíram-se semelhantemente ($p > 0,05$) (Tabelas 4-6). Entretanto, ocorreu maior frequência de malformações esqueléticas (crânio) em fetos do grupo CP, quando comparado aos de fetos gerados por fêmeas do grupo CN e CTM ($p < 0,05$) (Tabela 6).

As malformações externas observadas foram o estiramento de membros posteriores (uni e bilaterais), a cauda em vírgula e a gastrosquise (Tabela 4).

As malformações viscerais encontradas foram a hidrocefalia, a hidronefrose e a hipoplasia de coanas (Tabela 5).

As malformações esqueléticas notadas foram a ossificação reduzida ou irregular e/ou ausência de ossos do esqueleto apendicular, a ossificação reduzida e/ou irregular do esterno, a ausência de ossos e alterações de eixo da coluna, a ossificação reduzida e a ausência de ossos da cintura pélvica e a ossificação reduzida e/ou irregular de ossos do crânio (Tabela 6).

3.6. Avaliação da integridade do material genético materno

A frequência de micronúcleos do sangue periférico não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) entre as fêmeas acasaladas com os machos dos diferentes grupos experimentais e a frequência média apresentou variação entre $2,33 \pm 0,882$ e $3,67 \pm 1,453$ (Figura 5).

Tabela 1. Parâmetros biométricos de camundongos machos Swiss tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM.

Parâmetros biométricos						
Grupos Experimentais	Peso Inicial ¹ (g)	Peso Final ¹ (g)	Ganho de Peso ² (g)			
CN	29,83±1,023 ^a	29,43±1,026 ^b	-0,40±0,439 ^b			
CP	29,20±1,429 ^a	26,21±0,854 ^a	-2,99±0,899 ^a			
CTM	28,64±1,031 ^a	25,70±0,598 ^a	-2,94±0,747 ^a			
Peso absoluto (g)						
	Coração ²	Pulmão ¹	Fígado ¹	Baço ²	Rins ¹	Testículos ²
CN	0,16±0,008 ^a	0,20±0,008 ^a	2,00±0,099 ^b	0,12±0,010 ^a	0,51±0,026 ^b	0,19±0,010 ^b
CP	0,15±0,008 ^a	0,20±0,008 ^a	2,15±0,057 ^b	0,10±0,009 ^a	0,53±0,027 ^b	0,14±0,011 ^a
CTM	0,15±0,006 ^a	0,21±0,007 ^a	1,57±0,578 ^a	0,11±0,008 ^a	0,44±0,026 ^a	0,15±0,009 ^a
Peso relativo (g)						
	Coração ¹	Pulmão ¹	Fígado ¹	Baço ¹	Rins ¹	Testículos ¹
CN	0,006±0,0003 ^a	0,007±0,0004 ^a	0,068±0,0023 ^a	0,004±0,003 ^a	0,018±0,0009 ^a	0,007±0,0050 ^a
CP	0,006±0,0003 ^a	0,008±0,0004 ^a	0,083±0,0031 ^b	0,004±0,003 ^a	0,021±0,0015 ^a	0,005±0,0005 ^a
CTM	0,006±0,0003 ^a	0,008±0,0004 ^{a,b}	0,061±0,0019 ^a	0,004±0,003 ^a	0,017±0,0010 ^a	0,006±0,0003 ^a

Legenda: g - gramas; CTM - células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: ¹ANOVA/Tukey; ²Kruskall-Wallis/Dunn, p<0,05).

Tabela 2. Parâmetros biométricos de fêmeas acasaladas com camundongos machos *Swiss* tratados com ao quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM.

Parâmetros biométricos						
Grupos Experimentais	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de Peso (g)	Útero (g)	Ganho de Peso Líquido (g)	
CN	27,61±0,822 ^a	41,63±1,527 ^a	14,02±1,306 ^a	8,99±1,317 ^a	5,03±1,289 ^a	
CP	26,77±1,75 ^a	38,13±4,517 ^a	11,36±3,255 ^a	8,34±3,095 ^a	3,02±1,430 ^a	
CTM	27,13±0,583 ^a	40,83±2,072 ^a	13,70±1,958 ^a	8,11±2,438 ^a	5,59±1,094 ^a	
Peso absoluto (g)						
	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Ovários
CN	0,14±0,009 ^a	0,22±0,018 ^a	2,14±0,13 ^a	0,15±0,022 ^a	0,34±0,020 ^a	0,06±0,012 ^a
CP	0,15±0,009 ^a	0,21±0,018 ^a	2,05±0,26 ^a	0,13±0,015 ^a	0,37±0,029 ^a	0,04±0,006 ^a
CTM	0,14±0,012 ^a	0,20±0,018 ^a	2,12±0,018 ^a	0,12±0,009 ^a	0,35±0,041 ^a	0,04±0,005 ^a
Peso relativo (g)						
	Coração	Pulmão	Fígado	Baço	Rins	Ovários
CN	0,003±0,0003 ^a	0,005±0,0006 ^a	0,052±0,0035 ^a	0,004±0,0006 ^a	0,008±0,0007 ^a	0,001±0,0003 ^a
CP	0,004±0,0006 ^a	0,006±0,0006 ^a	0,054±0,0051 ^a	0,004±0,0006 ^a	0,010±0,0015 ^a	0,001±0,0003 ^a
CTM	0,003±0,0003 ^a	0,005±0,0002 ^a	0,052±0,0051 ^a	0,003±0,0002 ^a	0,009±0,0014 ^a	0,001±0,0002 ^a

Legenda: g - gramas; CTM - células-tronco mesenquimais. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas (Teste: Kruskal- Wallis/Dunn; p>0,05).

Tabela 3. Parâmetros reprodutivos de fêmeas Swiss acasaladas com os machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não transplante de CTM.

Parâmetros reprodutivos	Grupos Experimentais		
	CN	CP	CTM
Nº de fêmeas ¹	10	10	10
Taxa de fertilidade ¹	90,00	30,00*	30,00*
Taxa de falso-positivo ¹	10,00	70,00*	70,00*
Implantes ²	9,33±1,225 ^a	8,33±2,096 ^a	9,00±2,517 ^a
Fetos vivos ²	8,22±1,321 ^a	6,67±2,906 ^a	6,67±2,404 ^a
Fetos mortos ²	0,11±0,111 ^a	0,00±0,000 ^a	0,33±0,333 ^a
Viabilidade fetal ²	83,37±7,241 ^a	75,21±8,547 ^a	69,19±11,877 ^a
Reabsorções ²	1,00±0,441 ^a	1,67±0,667 ^a	2,00±1,000 ^a
Taxa de reabsorção ²	15,24±7,469 ^a	24,79±8,547 ^a	22,47±7,111 ^a
Taxa de perdas pós implantacionais ²	16,63±7,241 ^a	24,79±8,547 ^a	30,81±11,877 ^a
Peso fetal (g) ²	0,84±0,021 ^a	0,91±0,033 ^a	0,91±0,030 ^a
Peso placentário (g) ²	0,08±0,002 ^a	0,07±0,007 ^a	0,09±0,006 ^a
Índice placentário ²	0,09±0,003 ^a	0,08±0,006 ^a	0,10±0,008 ^a
%FPA ¹	89,2	90	95
%FPI ¹	5,4	5	0
%FPS ¹	5,4	5	5
Distância cabeça-cauda (mm) ²	23,65±0,262 ^a	24,57±0,448 ^a	24,71±0,554 ^a
Distância anogenital machos (mm) ³	1,38±0,046 ^a	1,47±0,118 ^a	1,46±0,087 ^a
Distância anogenital fêmeas (mm) ²	0,88±0,021 ^a	0,88±0,009 ^a	0,93±0,092 ^a

Legenda: g - gramas; CTM - células-tronco mesenquimais; %FPA - porcentagem de fetos com peso adequado de acordo com a idade gestacional; %FPI - porcentagem de fetos com peso inferior de acordo com a idade gestacional; %FPS - porcentagem de fetos com peso superior de acordo com a idade gestacional. Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. *Diferença estatística significativa em relação ao Controle Negativo. (Teste: ¹Qui-quadrado; ²Kruskal-Wallis/Dunn; ³ANOVA/Tukey p<0,05).

Tabela 4. Relação e frequência de malformações externas dos fetos resultantes do acasalamento de camundongos fêmeas *Swiss* com machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não a transplante de CTM.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	CN	CP	CTM
Membros anteriores e posteriores			
Fetos analisados	74	20	20
Fetos normais	71	17	20
Est. Uni. M.P.	2	0	0
Est. Bi. M.P.	1	2	0
Hematoma	0	1	0
Freq. Malf.	3	3	0
% M.F.	4,05	15,00	0
Cauda			
Fetos normais	18	18	20
Hematoma	0	1	0
Cauda em vírgula	2	1	0
Freq. Malf.	2	2	0
% M.F.	2,70	10,00	0
Abdômen			
Fetos normais	74	19	19
Gastrosquise	0	1	1
Freq. Malf.	0	1	1
% M.F.	0	5,00	5,00

Legenda: CTM - células-tronco mesenquimais; Est. Uni. M.P. - estiramento unilateral em membro posterior; Est. Bi. M.P. - estiramento bilateral em membro posterior; Freq. Malf - frequência de malformações; %M.F. - porcentagem de malformações. *Diferença estatística significativa em relação ao Controle Negativo. (Teste: Qui-quadrado $p > 0,05$).

Tabela 5. Relação e frequência de malformações viscerais dos fetos resultantes do acasalamento de camundongos fêmeas *Swiss* com machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não a transplante de CTM.

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	CN	CP	CTM
	Cérebro		
Fetos analisados	38	8	8
Fetos normais	37	8	8
Hidrocefalia	Moderada	1	0
Freq. Malf.		0	0
% M.F.	2,63	0	0
	Trato Uro-genital		
Fetos normais	36	8	7
Hidronefroze	Moderada	2	0
		2	1
	5,26	0	0
	Trato Naso-faríngeo		
Fetos normais	31	8	9
Coanas nasais	Diminuída	7	0
Freq. Malf.		7	0
% M.F.	18,42	0	0

Legenda: CTM - células-tronco mesenquimais; Freq. Malf - frequência de malformações, %M.F. - porcentagem de malformações. * Diferença estatística significativa em relação ao Controle Negativo. (Teste: Qui-quadrado $p > 0,05$).

Tabela 6. Relação e frequência de malformações esqueléticas dos fetos resultantes do acasalamento de camundongos fêmeas *Swiss* com machos expostos ao quimioterápico ciclofosfamida submetidos ou não a transplante de CTM.

Parâmetros		Grupos Experimentais		
		CN	CP	CTM
Membros anteriores e posteriores				
Fetos analisados		37	9	8
Fetos normais		15	1	2
Falanges	Ausência	18	8	6
	O.R.	7	0	0
Fêmur	Ausência	1	0	0
	Mal	0	1	0
	posicionamento			
Tíbia	O.I.	0	0	1
Freq. Malf.		22	8	6
% M.F.		59,46	88,89	75,00
Esterno				
Fetos normais		21	3	1
Centros esternais	O.R.	16	5	7
	O.I.	4	0	0
Processo xifoide	O.R.	3	1	2
	O.I.	1	0	0
Manúbrio	O.R.	2	2	0
Freq. Malf.		16	6	7
% M.F.		43,24	66,67	87,5
Coluna				
Fetos normais		34	7	8
Vértebras	Ausência	1	0	0
	Escoliose	1	2	0
	Lordose	1	0	0
Freq. Malf.		3	2	0
% M.F.		8,11	22,22	0
Cintura pélvica				
Fetos normais		36	9	8
Ílio	O.R.	1	0	0
Ísquio	Ausência	1	0	0
Púbis	Ausência	1	0	0
Freq. Malf.		1	0	0
% M.F.		2,70	0	0
Cabeça				
Fetos normais		17	1	2
Parietal	O.R.	1	0	0
Interparietal	O.R.	14	4	3
	O.I.	1	0	0
Supraoccipital	O.R.	13	4	3
	O.I.	7	0	0
Basioccipital	O.R.	1	0	0
Presfenoide	O.R.	7	2	1
Palato	O.R.	8	4	2
Volmer	O.R.	4	2	4
Freq. Malf.		20	8*	6
% M.F.		54,05	88,89	75,00

Legenda: CTM - células-tronco mesenquimais; O.R. - ossificação reduzida; O.I. - ossificação irregular; Freq. Malf - frequência de malformações, %M.F. - porcentagem de malformações.

*Diferença estatística significativa em relação ao Controle Negativo. (Teste: Qui-quadrado $p < 0,05$).

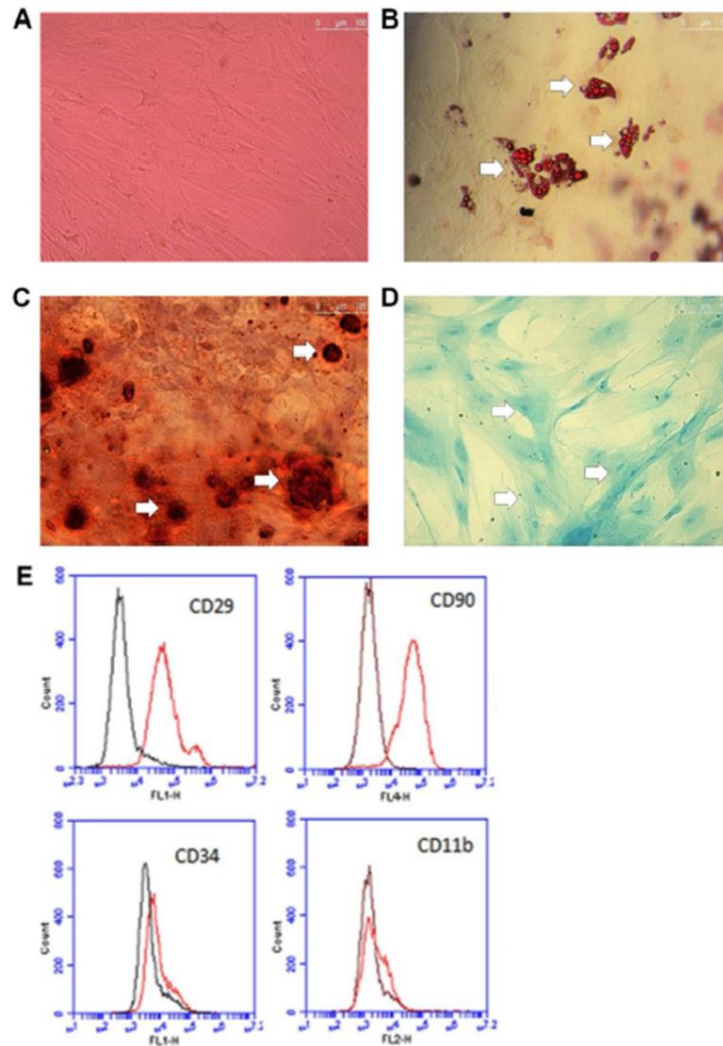


Figura 1. Morfologia, caracterização e potencial de diferenciação de CTM derivadas de tecido adiposo de camundongo. A) cultura indiferenciada de CTM com células com aspecto fibroblástico; B) cultura de CTM submetidas à diferenciação adipogênica, com vacúolos lipídicos corados com *Oil-red-O* (setas); C) cultura de CTM submetidas à diferenciação osteogênica com depósitos de cálcio corados com Alizarina Vermelha (setas); e D) cultura de CTM submetidas à diferenciação condrogênica, com matrizes extracelulares de glicosaminoglicanos coradas com Azul de Alcian (setas) e E) Caracterização imunofenotípica, demonstrado que as CTM foram positivas para os marcadores CD29, CD90 e negativas para os marcadores CD34 e CD11b.

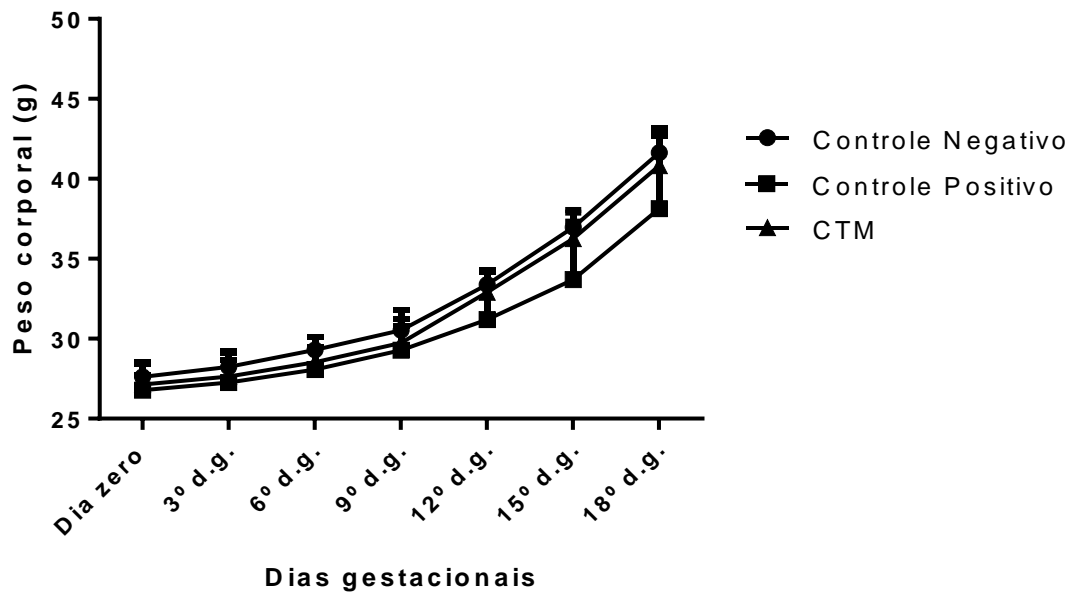


Figura 2. Evolução do ganho de peso durante o período gestacional em camundongos fêmeas *Swiss* acasaladas com machos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM. CTM – células-tronco mesenquimais; g – grama; d.g. – dia gestacional. (Teste: ANOVA/Tukey, $p > 0,05$).

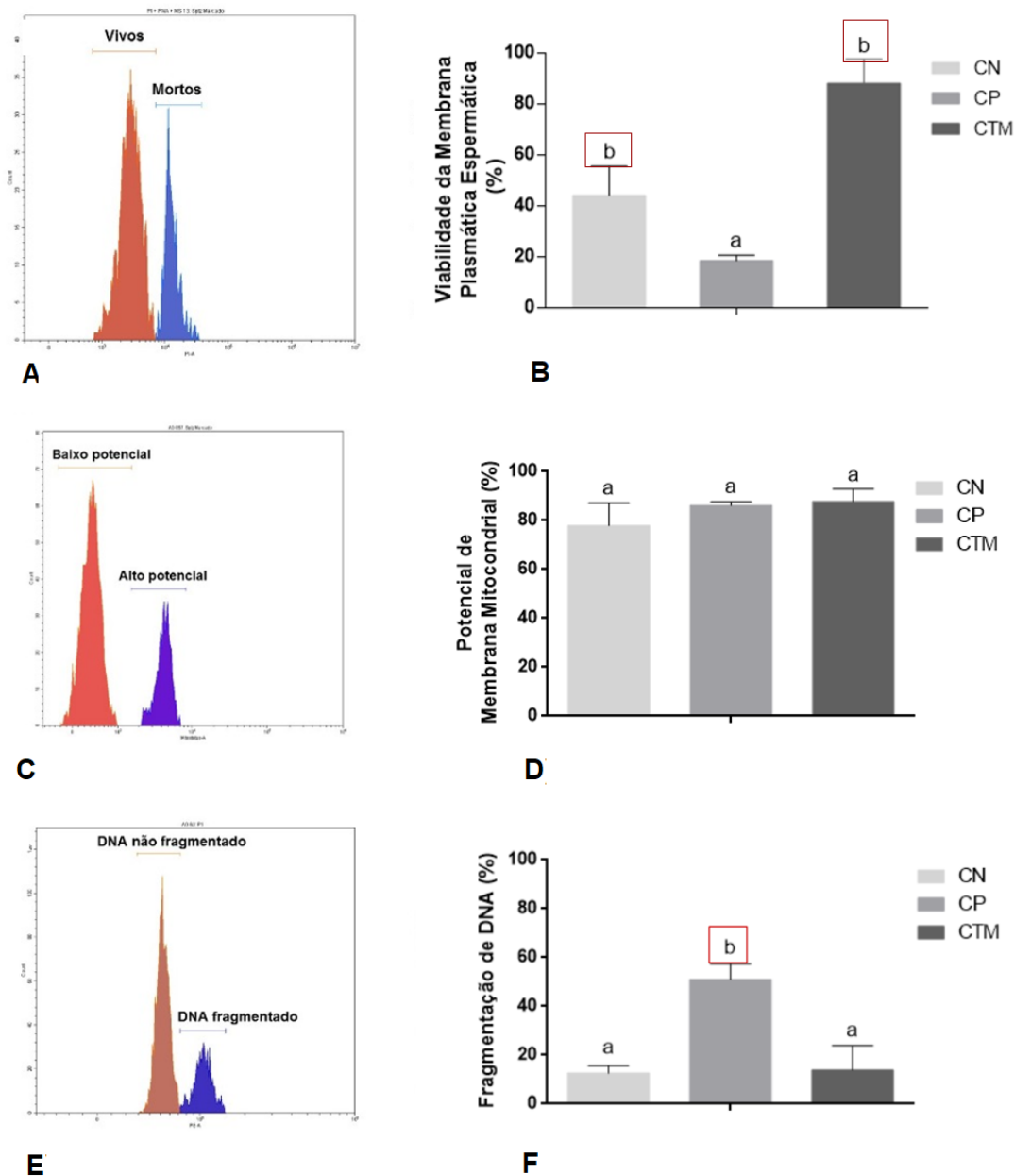


Figura 3. Avaliação da viabilidade da membrana plasmática, do potencial de membrana mitocondrial e da integridade genética de espermatozoides de camundongos machos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM. A e B) Gráficos representando a porcentagem de espermatozoides em que houve penetração do IP (mortos) e nos em que não houve (vivos); C e D) Gráficos representado a porcentagem de espermatozoides coradas com *MitoStatus* (alto potencial de membrana) e não coradas (baixo potencial de membrana); e E e F) Gráficos representando a porcentagem de espermatozoides incubados em Laranja de Acridina, com material genético íntegro (corados em verde) e fragmentado (corados em vermelho). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste: ANOVA/Duncan, $p < 0.05$).

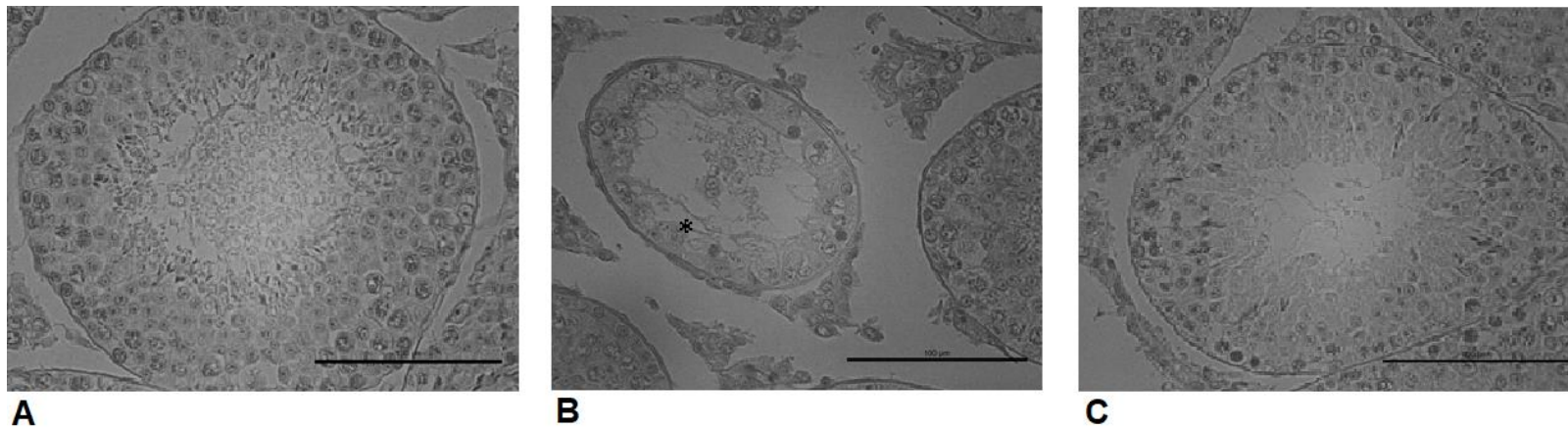


Figura 4. Cortes histológicos de túbulo seminífero dos animais dos grupos experimentais CN (A), CP (B) e CTM (C). Os animais dos grupos CN e CTM não apresentaram alterações histológicas, enquanto que nos animais do grupo CP observou-se a depleção do tecido germinativo (asterisco). Barra de escala: 100 µm.

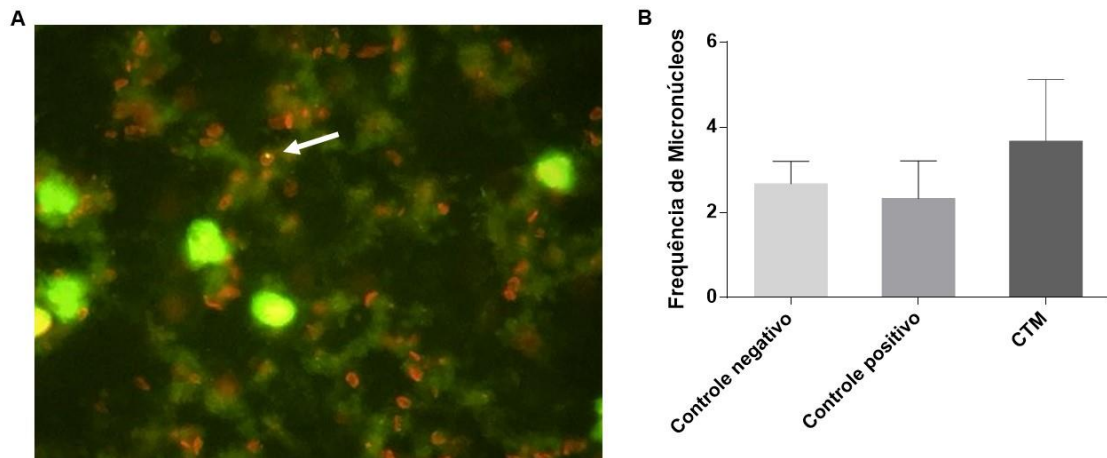


Figura 5. Avaliação da integridade do material genético materno de camundongos fêmeas acasaladas com machos tratados com o quimioterápico ciclofosfamida e submetidos ou não ao transplante de CTM. CTM – células-tronco mesenquimais. A) Presença de micronúcleo em eritrócito de sangue periférico (seta) e B) Frequência de micronúcleos em sangue periférico. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. (Teste: Kruskal-Wallis/Dunn, $p > 0,05$).

4. Discussão

O presente estudo, em concordância com a literatura, demonstrou o potencial gonadotóxico da ciclofosfamida e o conseqüente detrimento do desempenho reprodutivo. Além disso, esse estudo demonstrou a eficiência da terapia celular na melhoria da viabilidade e integridade genética dos espermatozoides, ainda que não acompanhada da recuperação dos níveis de fertilidade e, de modo inédito, os efeitos do transplante celular sob o desenvolvimento da prole dos animais tratados.

A administração da ciclofosfamida reduziu o peso corporal e o peso relativo dos órgãos e, segundo Michael et al. (2007), esses eventos são indicativos de toxicidade. Além disso, evidenciou-se alterações clínicas comumente associadas à toxicidade, como o eriçamento de pelos e a diarreia (OECD, 2008).

A redução de peso corporal devido ao uso da ciclofosfamida também foi relatada por outros autores (JENKINSON; ANDERSON, 1990; ELANGO VAN et al., 2006; VAISHEVA et al., 2007; TRIPATHI; JENA, 2008; KANNO et al., 2009), e pode estar relacionada com lesões da mucosa intestinal (JENKINSON; ANDERSON, 1990) e estomatite (VAISHEVA et al., 2007). Inferimos que a terapia celular não impediu a perda de peso causada pelo uso do antineoplásico provavelmente por não ter atuado sob as células da mucosa intestinal, resultando na persistência dos quadros de diarreia e na baixa absorção de nutrientes.

As diferenças do peso absoluto dos rins e testículos notada entre os animais dos grupos CP e CTM são decorrentes da variação do peso corporal desses grupos experimentais (MICHAEL et al., 2007). Por outro lado, o aumento do peso relativo do fígado evidenciado no grupo CP ocorreu devido a indução enzimática causada pelo quimioterápico (COLVIN et al., 1976; MICHAEL et al., 2007; VEAL et al., 2016), não obstante, podemos ponderar que a terapia celular modulou a indução enzimática, visto que o grupo CTM não apresentou o aumento do peso relativo do fígado.

Apesar de não ter ocorrido diferença significativa no peso relativo dos testículos é sabido que espermatogônias em fase de diferenciação são especialmente sensíveis a exposição à ciclofosfamida quando comparadas às espermatogônias-tronco (MEISTRICH et al., 1982; RUSSEL; RUSSEL, 1991) e, outrossim, comparada com outros agentes quimioterápicos, a ciclofosfamida não causa a morte de todo o compartimento testicular de células-tronco (LU; MEISTRICH, 1979; DRUMOND et al.,

2011). Por essa razão, esse estudo utilizou um protocolo multidosado para causar depleção parcial das espermatogônias indiferenciadas, como proposto por Drumond et al. (2011).

A recuperação do tecido testicular pode levar meses ou anos após a suspensão do medicamento, ou ainda, nunca alcançar uma recuperação plena, como resultado da incapacidade das células-tronco remanescente em diferenciarem em espermatozoides (DRUMOND et al., 2011). Nesse contexto, a terapia celular pode ser uma possibilidade de auxiliar na recuperação desse epitélio.

As CTM promovem o restabelecimento da espermatogênese endógena através da liberação de fatores parácrinos no microambiente testicular que induzem a proliferação celular, a angiogênese, a imunomodulação e a ação antioxidante (MURPHY; MONCIVAIS; CAPLAN, 2013; KADAM; VAN SAEN; GOOSSENS, 2017), de modo especialmente eficiente já que os danos causados pela ciclofosfamida são mediados pelo estresse oxidativo (GRIVEAU, et al., 1995; ONAOLAPO; OLADIPO; ONAOLAPO, 2018).

Além da ciclofosfamida outro quimioterápico, o busulfan, também causa depleção testicular por meio de estresse oxidativo (SIMONE II, 2007). Nesse sentido, estudos anteriores obtiveram resultados encorajadores em modelos animais com ratos azoospermicos, devido a administração do quimioterápico busulfan, com a restauração da função das gonadal masculina após transplante de CTM extraídas da medula óssea (LUE et al., 2007; MONFESI et al., 2013; ZHANG et al., 2014) do cordão umbilical (YANG et al., 2014, CHEN et al., 2015) e do tecido adiposo (CAKICI et al., 2013; MEHRABANI et al., 2015). Todos os autores, independentemente da origem das CTM, concordaram que essas contribuem para a recuperação do peso testicular, da estrutura dos túbulos seminíferos e da atividade gamética, diminuição do número de espermatozoides com material genético comprometido e restabelecimento dos níveis hormonais. Esse fato nos levou a realizar testes na mesma linha, mas com animais tratados com ciclofosfamida em substituição ao busulfan, e os resultados obtidos demonstram que a terapia celular com CTM também é capaz de melhorar os danos causados pela ciclofosfamida.

A integridade da membrana celular espermática é essencial para prover a fecundação, a manutenção da homeostase e a comunicação com as células do

epitélio vaginal e com o complexo *cumulus*-oócito (HOSSAIN et al., 2011). Apesar da capacidade de fecundação de espermatozoides com fragmentação do material genético, gametas com DFI<20% possuem maiores índices de fertilidade (EVENSON, 2017). Logo, esses parâmetros estão direta ou indiretamente associados à infertilidade e demonstram que a ciclofosfamida foi capaz de reduzir a integridade de membrana plasmática e aumentar a fragmentação do DNA espermático. Sem embargo, a terapia celular reduziu a quantidade de espermatozoides que tinha lesão na membrana plasmática e no DNA igualando aos valores obtidos pelo controle negativo. Assim, infere-se que as CTM levaram a restauração desses parâmetros espermáticos.

No tocante ao potencial de membrana mitocondrial, não se verificou variação entre os diferentes grupos experimentais. Assim, infere-se que, a exposição à ciclofosfamida não ocasiona alteração desse parâmetro que, relaciona-se a capacidade energética dos espermatozoides (ST. JOHN; JOKHI; BARRATT, 2005).

Já é estabelecido pela literatura que o período de declínio na contagem espermática é correlacionado a sensibilidade das células germinativas aos agentes quimioterápicos, particularmente das espermatogônias (SHETTY; MEISTRICH, 2005). Os resultados obtidos nesse estudo estão, portanto, em concordância com pesquisas anteriores, já que a ciclofosfamida causou a depleção parcial dos túbulos seminíferos. Em adição, não observou-se lesão no tecido testicular dos machos tratados com a terapia celular. Esse fato foi notado no estudo histopatológico e, portanto, permite inferir que a terapia celular é importante para que haja o retorno e/ou a melhora do processo de gametogênese. Outro fato que corrobora a melhora do epitélio germinativo é a semelhança dos pesos dos testículos dos animais dos grupos CP e CTM. Conquanto, ainda é necessário observar que o retorno à gametogênese é variável e depende do grau de acometimento das células germinativas, em especial das espermatogônias-tronco, bem como do microambiente testicular (MEISTRICH, 2009, 2013).

Frente a esses dados, esperava-se que houvesse aumento da taxa de fertilidade entre os animais do grupo CTM, já que, se presumia uma relação diretamente proporcional entre a melhora dos parâmetros espermáticos e a regeneração do tecido testicular com o aumento da fertilidade. Entretanto, os achados não permitem essa interpretação.

Observou-se aumento de taxa de falso-positivo e diminuição da taxa de fertilidade entre se comparados os grupos CP e CTM com o grupo CN. Ainda assim, verificou-se que, não houve variação entre as fêmeas dos grupos experimentais quanto ao número de implantes, de fetos vivos e mortos, da viabilidade fetal, do número e da taxa de reabsorções, da taxa de perdas pós-implantacionais, dos pesos fetais e placentários, do índice placentário, da distância cabeça-cauda e anogenital de machos e de fêmeas, e de malformações externas e viscerais dos fetos. Sugere-se, assim, que tais achados foram provavelmente causados pela existência de zigotos com mais de 4 aberrações cromossômicas instáveis, causando a diminuição da fertilidade dos animais por meio de perdas gestacionais pré-implantacionais, sem causar repercussões nos demais parâmetros (MARCHETTI et al., 2004).

O efeito dominante letal pode ocorrer também pela ação direta da ciclofosfamida sobre os embriões, transmitida via líquido seminal (HALES; SMITH; ROBAIRE, 1986; OLIVEIRA et al., 2014). Por esse motivo, avaliou-se a ocorrência de danos genéticos nas fêmeas, que indicaria exposição materna ao quimioterápico e, conseqüentemente dos fetos, por meio do ensaio do micronúcleo. No entanto, não houve variações na frequência dos diferentes grupos experimentais o que permite sugerir a ausência de danos genéticos mediados pelo sêmen.

A teratogênese mediada por machos é extensamente reportada na literatura e, os autores inferem que a mesma seja provocada por alterações genéticas ou cromossômicas, ou através de modificações dos mecanismos epigenéticos, ocasionando falhas gestacionais, malformações e alterações na capacidade de aprendizagem que podem perpetuar-se através de gerações (AUROUX et al., 1990; BARTON; ROBAIRE; HALES, 2005; HALES; BARTON; ROBAIRE, 2005; MOSS; WALLRATH, 2007).

No presente estudo a administração de ciclofosfamida aos machos fomentou o aumento de malformações esqueléticas dos ossos do crânio. Tal ocorrência não foi verificada no grupo CTM, contudo, não há resultados suficientes que permitam afirmar que o transplante de CTM seja o responsável por esse achado. Mas, assumisse que a maior porcentagem de fetos com malformações seja causada pela exposição das células germinativas no estágio de espermatogônias ao quimioterápico, como já observado por Hales (2005).

Baseado no conjunto de dados obtidos nesse estudo, considera-se que a terapia celular com CTM de tecido adiposo, de acordo com o presente delineamento, não recuperou completamente os danos causados pela ciclofosfamida à função gonadal dos camundongos machos. Não obstante, os resultados permitem sugerir que a terapia celular promoveu o aumento do contingente de espermatozoides com membrana plasmática e material genético íntegros, um importante fator no estabelecimento de tratamentos contra a infertilidade abrindo assim, perspectivas para demais pesquisas utilizando esse tipo celular no futuro. Ademais, esse foi o primeiro estudo a gerar dados sobre os efeitos da terapia celular sobre a progênie de pais expostos à ciclofosfamida e, conseqüentemente sua segurança para os descendentes.

5. Referências bibliográficas

AGUILAR-MAHECHA, A.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Chronic Cyclophosphamide Treatment Alters the Expression of Stress Response Genes in Rat Male Germ Cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1024-1032, 2002.

AUROUX, M.; DULIOUST, E.; SELVA, J.; RINCE, P. Cyclophosphamide in the F₀ male rat: physical and behavioral changes in three successive adult generations. **Mutation Research**, v. 229, p. 189-200, 1990.

BARROW, M. V.; TAYLOR, W. J. A rapid method for detecting malformation in rat fetuse. **Journal of Morphology**, v. 127, n. 3, p. 291-305, 1969.

BARTON, T. S.; ROBAIRE, B.; HALES, B. F. Epigenetic programming in the preimplantation rat embryo is disrupted by chronic paternal cyclophosphamide exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS**, v. 102, n. 22, p. 7865–7870, 2005.

BOLTEZAR, L.; PINTARIC, K.; NOVAKOVIC, B. J. Fertility in young patients following treatment for Hodgkin's lymphoma: a single center survey. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, p. 325-333, 2016.

CAKICI, C.; BUYRUKCU, B.; DURUKSU, G.; HALILOGLU, A. H.; AKSOY, A.; NISJK, A.;1 ULUDAG, O.; USTUN, H.; SUBASJ, C.; KARAOZ, E. Recovery of Fertility in Azoospermia Rats after Injection of Adipose-Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Sperm Generation. **BioMed Research International**, p. 1-18, 2013.

CHAN, M. K. Cyclophosphamide: A Drug Profile. **Journal of the Association of Pediatric Oncology Nurses**, v. 1, n. 3, p. 30-33, 1984.

CHEN, H.; TANG, Q-L.; WU, X-Y.; XIE, L-C.; LIN, L-M.; HO, G-Y.; MA, L. Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into germ-like cells in mouse seminiferous tubules. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, p. 819-828, 2015.

COLVIN, M.; BRUNDRETT, R. B.; KAN, M-N. N.; JARDINE, I.; FENSELAU, C. Alkylating Properties of Phosphoramidate Mustard. **Cancer Research**, v. 36, p. 1121-1126, 1976.

CROOK, T. R.; SOUHAMI, R. L.; McLEAN, A. E. M. Cytotoxicity, DNA Cross-Linking, and Single Strand Breaks Induced by Activated Cyclophosphamide and Acrolein in Human Leukemia Cells. **Cancer Research**, v. 26, p. 5029-5034, 1986.

DE DAVID, N.; MAURO, M. O.; GONÇALVES, C. A.; PESARINI, J. R.; STRAPASSON, R. L. B.; KASSUYA, C. A. L.; STEFANELLO, M. E. A.; CUNHA-LAURA, A. L.; MONREAL, A. C. D.; OLIVEIRA, R. J. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, n. 2, p. 370-379, 2014.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DRUMOND, A. L.; WENG, C. C.; WANG, G.; CHIARINI-GARCIA, H.; ERAS-GARCIA, L.; MEISTRICH, M. L. Effects of multiple doses of cyclophosphamide on mouse testes: Accessing the germ cells lost, and the functional damage of stem cells. **Reproductive Toxicology**, v. 32, p. 395-406, 2011.

ELANGOVAN, N.; CHIOU, T-J.; TZENG, W-F.; CHU, S-T. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. **Toxicology**, v. 222, n. 1-2, p. 60-70, 2006.

EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. **Nature Reviews - Clinical Oncology**, v. 6, p. 638-647, 2009.

EVENSON, D. P.; LARSON, K. L.; JOST, L. K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 1, p. 25–43, 2002.

EVENSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, p. 56-75, 2016.

FORBES, C. M.; FLANNIGAN, R.; SCHLEGEL, P. N. Spermatogonial stem cell transplantation and male infertility: Current status and future directions. **Arab Journal of Urology**, v. 16, p. 171-180, 2018.

GHOBADI, E.; MOLOUDIZARGARI, M.; ASGHARI, M. H.; ABDOLLAHI, M. The mechanisms of cyclophosphamide-induced testicular toxicity and the protective agents. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 525-536, 2017.

GONÇALVES, C. A.; SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; MAURO, M. O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A. L. ; MONREAL, A. C. D.; CASTRO, A. H.; FERNANDES, L.; CHAGAS, R.; AUHAREK, S. A.; OLIVEIRA, R. J. Gestational exposure to *Byrsonima*

verbascifolia: Teratogenicity, mutagenicity and immunomodulation evaluation in female Swiss mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 843-850, 2013.

GONÇALVES, C. A.; SILVA, N. L.; MAURO, M. O. ; DAVID, N; CUNHA-LAURA, A. L.; AUHAREK, S. A.; MONREAL, A. C. D.; VIEIRA, M. C.; SILVA, D. B. ; SANTOS, F. J. L.; SIQUEIRA, J. M.; OLIVEIRA, R. J. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 4392-4405, 2014.

GREEN, D. M.; KAWASHIMA, T.; STOVALL, M.; LEISENRING, W.; SKLAR, C. H.; MERTENS, A. C.; DONALDSON, S. S.; BYRNE, J.; ROBISON, L. L. Fertility of Male Survivors of Childhood Cancer: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 2, p. 332-339, 2010.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LANNOU, D. L. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 17-26, 1995.

HALES, B. F.; SMITH, S.; ROBAIRE, B. Cyclophosphamide in the Seminal Fluid of Treated Males: Transmission to Females by Mating and Effect on Pregnancy Outcome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 84, p. 423-430, 1986.

HALES, B. F. DNA repair disorders causing malformations. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 15, p. 234-240, 2005.

HALES, B. F.; BARTON, T. S.; ROBAIRE, B. Impact of Paternal Exposure to Chemotherapy on Offspring in the Rat. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, n. 34, p. 28-31, 2005.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange-coated slides. **Mutation Research**, v. 245, p. 245-249, 1990.

HEMMINKI, K.; KALLAMA, S. Reactions of nitrogen mustards with DNA. **IARC Scientific Publications**, v. 78, p. 55-70, 1986.

HERMETO, L.C.; DEROSI, R.; OLIVEIRA, R.J.; PESARINI, J.R.; ANTONIOLLI-SILVA, A.C.M.B.; JARDIM, P.H.A.; SANTANA, Á.E.; DEFFUNE, E.; RINALDI, J.C.; JUSTULIN, L.A. Effects of intra-articular injection of mesenchymal stem cells associated with platelet-rich plasma in a rabbit model of osteoarthritis. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, p. 1-14, 2016.

HOSSAIN, S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, p. 406-419, 2011.

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

JENKINSON, P. C.; ANDERSON, D. Malformed fetuses and karyotype abnormalities in the offspring of cyclophosphamide and allyl alcohol-treated male rats. **Mutation Research**, v. 229, p. 173-184, 1990.

ST. JOHN, J. C.; JOKHI, R. P.; BARRATT, C. L. R. The impact of mitochondrial genetics on male infertility. **International Journal of Andrology**, v. 28 p. 65-73, 2005.

KADAM, P.; VAN SAEN, D.; GOOSSENS, E. Can mesenchymal stem cells improve spermatogonial stem cell transplantation efficiency? **Andrology**, v. 5, p. 2-9, 2017.

KANNO, T. Y. N.; SENSIATE, L. A.; DE PAULA, N. A.; SALLES, M. J. S. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 313-319, 2009.

LORZADEH, N.; KAZEMIRAD, N. Application of Stem Cells to Infertility Treatment with Emphasis on Mesenchymal Stem Cells and Ovarian Stem Cells. **American Journal of Perinatology**, p. 1-18, 2018.

LU, C. C.; MEISTRICH, M. L. Cytotoxic Effects of Chemotherapeutic Drugs on Mouse Testis Cells 1 days after Injection. **Cancer Research**, v. 39, n. 9, p. 3575-3582, 1979.

LUE, Y.; ERKILA, K.; LIU, P. Y., MA, K.; WANG, C.; HIKIM, A. S.; SWERDLOFF, R. S. Fate of Bone Marrow Stem Cells Transplanted into the Testis - Potential Implication for Men with Testicular Failure. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 899-908, 2007.

MAKRIS, S. L.; SOLOMON, H. M.; CLARK, R.; SHIOTA, K.; BARBELLION, S.; BUSCHMANN, J.; EMA, K.; FUJIWARA, M.; GROTE, K.; HAZELDEN, K. P.; HEW, K. W.; HORIMOTO, M.; OOSHIMA, Y.; PARKINSON, M.; WISE, D. Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 2). **Birth Defects Research (Part B)**, v. 86, p. :227–327, 2009.

MARCHETTI, F.; BISHOP, J. B.; COSENTINO, L.; MOORE II, D., WYROBEK, A. J. Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine Their Embryonic Fate. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 616-624, 2004.

MEHRABAI, D.; HASSANSHASHI, M. A. M.; TAMADON, A.; ZARE, S.; KESHAVARZ, S.; RAHMANIFAR, F.; DIANATPOUR, M.; KHODABANDEH, Z.; JAHROMI, I. R.; TANIDEH, N.; RAMZI, M.; AQABABA, H.; KUHI-HOSEINABADI, O. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells repair germinal cells of seminiferous tubules of busulfan-induced azoospermic rats. *Journal of Human Reproductive Sciences*, v. 8, n. 2, p. 103-110, 2015.

MEISTRICH, M. L.; FINCH, M.; CUNHA, M. F.; HACKER, U.; AU, W. W. Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. **Cancer Research**, v. 42, n. 1, p. 122-131, 1982.

MEISTRICH, M. L. Male Gonadal Toxicity. **Pedriatic Blood & Cancer**, v. 53, n. 2, p. 261-266, 2009.

MEISTRICH, M. L. The Effects of Chemotherapy and Radiotherapy on Spermatogenesis in Humans. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 5, p. 1180-1186, 2013.

MIELCAREK, M.; FURLONG, T.; O'DONNELL, P. V.; STORER, B. E.; McCUNE, J. S.; STORB, R.; CARPENTER, P. A.; FLOWERS, M. E. D.; APPELBAUM, F. R.; MARTIN, P. J. Posttransplantation cyclophosphamide for prevention of graft-versus-host disease after HLA-matched mobilized blood cell transplantation. **Blood**, v. 127, n. 11, p. 1502-1508, 2016.

MICHAEL, B.; YANO, B.; SELLERS, R. S.; PERRY, R.; MORTON, D.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; SCHAFFER, K. Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-Rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 5, p. 742-750, 2007.

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

MOSS, T. J.; WALLRATH, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research**, v. 618, p. 163-174, 2007.

MURPHY, M. B.; MONCIVAIS, K.; CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, p. 1-16, 2013.

OECD. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, **OECD Publishing**, 2008.

OLIVEIRA, R. J.; OLIVA, S. U.; DAROZ, G. A.; RUBIO, E. M. Fertility assessment and possible external structural defects on progeny from male rats chronically exposed to arsenic. **Revista Brasileira de Toxicologia**, São Paulo - SP, v. 18, n.1, 2005.

OLIVEIRA, R. J.; KANNO, T. Y. N.; SALLES, M. J. S.; LOURENÇO, A. C. S.; RIBEIRO, L. R.; FREIRIA, G. A.; MATIAZI, H. J. O.; MANTOVANI, M. S.; SILVA, A. F. Effects of the polysaccharide β -glucan on clastogenicity and teratogenicity caused by acute exposure to cyclophosphamide in mice. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, n. 3, p.164-73, 2009.

OLIVEIRA, R. J.; PESARINI, J. R.; SALLES, M. J. S.; KANNO, T. Y. N.; LOURENÇO, A. C. S.; LEITE, V. S.; SILVA, A. F.; MATIAZI, H. J.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Effects of β -glucan polysaccharide revealed by the dominant lethal assay and micronucleus assays, and reproductive performance of male mice exposed to cyclophosphamide. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 111-119, 2014.

OLIVEIRA, R. J.; MANTOVANI, M. S.; PESARINI, J. R.; MAURO, M. O.; DA SILVA, A. F.; SOUZA, T. R.; RIBEIRO, L. R. 6-Dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and alter reproductive performance and intrauterine development in vivo. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 834-849, 2015.

ONAOLAPO, A. Y.; OLADIPO, B. P.; ONAOLAPO, O. J. Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. **Andrologia**, v. 3, p. 1-10, 2017.

PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M. A.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.

PESARINI, J. R.; OLIVEIRA, R. J.; PESSATTO, L. R.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; FELICIDADE, I.; NARDI, N. B.; CAMASSOLA, M.; MANTOVANI, M. S. RIBEIRO, L. R. Vitamin D: Correlation with biochemical and body composition changes in a southern Brazilian population and induction of cytotoxicity in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 861-871, 2017.

POURMOGHADAM, Z.; AGHEBATI-MALEKI, L.; MOTALEBNEZHAD, M.; YOUSEFI, B.; YOUSEFI, M. Current approaches for the treatment of male infertility with stem cell therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 10, p. 1-15, 2018.

RA, J. C.; SHIN, I. S.; KIM, S. H.; KANG, S. K.; KANG, B. C.; LEE, H. Y.; KIM, Y. J.; JO, J. Y.; YOON, J. E.; CHOI, H. J.; KWON, E. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. **Stem cells and Development**, v. 20, n. 8, p. 1297-1308, 2011.

RUSSELL, L. D.; RUSSELL, J. A. Short-Term Morphological Response of the Rat Testis to Administration of Five Chemotherapeutic Agents. **The American Journal of Anatomy**, v. 192, n. 2, p. 142-168, 1991.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: 2417 Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998. 221p.

SHETTY, G.; MEISTRICH, M. L. Hormonal approaches to preservation and restoration of male fertility after cancer treatment. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, v. 2005, n. 34, p. 36-99, 2005.

SIMONE II, C. B.; SIMONE, N.; SIMONE, V.; SIMONE, C. B. Antioxidants and other nutrients do not interfere with chemotherapy or radiation therapy and can increase kill and increase survival, part 1. **Alternative Therapies**, v. 13, n. 1, p. 22-28, 2007.

SCHWEICH, L. C.; OLIVEIRA, E. J. T.; PESARINI, J. R.; HERMETO, L. C.; CAMASSOLA, M.; NARDI, N. B.; BROCHADO, T. M. M.; ANTONIOLLI-SILVA, A. C. M. B.; OLIVEIRA, R. J. All-trans retinoic acid induces mitochondria-mediated apoptosis of human adipose-derived stem cells and affects the balance of the adipogenic differentiation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 1267-1274, 2017.

SEANDEL, M.; RAFFI, S. Reproductive biology: In vitro sperm maturation. **Nature**, v. 471, p. 453–455, 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 7-30, 2018.

STAPLES, R.E.; SCHENELL, V.L. Refinements in rapid clearing technic in the KOH-alizarin red method for fetal bone. **Stain Technology**, v. 39, p. 61-63, 1964.

STARZL, T. E.; GROTH, C. G.; PUTNAM, C. W.; CORMAN, J.; HALGRIMSON, C. G.; PENN, I.; HUSBERG, B.; GUSTAFSSON, A.; CASCARDO, S.; GEIS, P.; IWATSUKI, S. Cyclophosphamide for Clinical Renal and Hepatic Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 511-516, 1973.

SOULIMANE-MOKHTARI, N. A.; GUERMOUCHE, B.; YESSOUFOU, A.; SAKER, M.; MOUTAIROU, K.; HICHAMI, A., KHAN, N. A. Modulation of lipid metabolism by n- 3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. **Clinical Science**, v. 109, p. 287-295, 2005.

TRAILA, A.; DIMA, D.; ACHIMAS-CADARIU, P.; MICU, R. Fertility preservation in Hodgkin's lymphoma patients that undergo targeted molecular therapies: an important step forward from the chemotherapy era. **Cancer Management and Research**, v. 10, p. 1517-1526, 2018.

TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. **Toxicology**, v. 248, p. 96-103, 2008.

TURK, G.; CERIBASI, A. O.; SAKIN, F.; SONMEZ, M.; ATESSAHIN, A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 4, p. 587-596, 2010.

VAHDATI, A.; FATHI, A.; HAJIHOSEINI, M.; ALIBORZI, G.; HOSSEINI, E. The Regenerative Effect of Bone Marrow-Derived Stem Cells in Spermatogenesis of Infertile Hamster. **World Journal of Plastic Surgery**, v. 6, n. 1, p. 18-25, 2017.

VAISHEVA, F.; DELBÈS, G.; HALES, B. F.; ROBAIRE, B. Effects of the Chemotherapeutic Agents for Non-Hodgkin Lymphoma, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone (CHOP), on the Male Rat Reproductive System and Progeny Outcome. **Journal of Andrology**, v. 28. n. 4, p. 578-587, 2007.

VEAL, G. J.; COLE, M.; CHINNASWAMY, G.; SLUDDEN, J.; JAMIESON, D.; ERRIGTON, J.; MALIK, G.; HILL, C. R.; CHAMBERLAIN, T.; BODDY, A. V. Cyclophosphamide pharmacokinetics and pharmacogenetics in children with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 56-64, 2016.

WISE, L. D.; BECK, S. L.; BELTRAME, D.; BEYER, B. K.; CHAHOUD, I.; CLARK, R. L.; DRUGA, A. M.; FEUSTON, M. H.; GUITTIN, P.; HENWOOD, S. M.; KIMMEL, C. A.; LINDSTROM, P.; PALMER, A. K.; PETRERE, J. A.; SOLOMON, H. M.; YASUDA, M.; YORK, R. G. Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1). **Teratology**, v.55, n. 4, p. 249-292, 1997.

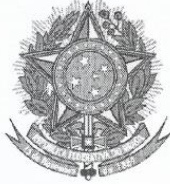
WILSON, J. G. Methods for administering agentes and detecting malformations in experimental animals. In: WILSON, J. G.; WAEKANY, J. (Eds.). **Teratology: Principles and Techniques**. The University of Chicago Press, Chicago, 1965.

World Health Organization (2016). International Childhood Cancer Day: Much remains to be done to fight childhood cancer.

YANG, R-F.; LIU, T-H.; ZHAO, K.; XIONG, C-L. Enhancement of mouse germ cell-associated genes expression by injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells into the testis of chemical-induced azoospermic mice. **Asian Journal of Andrology**, v. 16, p. 698–704, 2014.

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

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



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



C E R T I F I C A D O

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

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


Joice Stein

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