

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 31/08/2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL
IMUNOFENOTÍPICO, POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO,
CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS E
CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS DO
ENDOMÉTRIO DE VACAS DURANTE O CICLO ESTRAL

CAROLINA NOGUEIRA DE MORAES MAIA

Botucatu, São Paulo

Agosto, 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ESTUDO COMPARATIVO DO PERFIL
IMUNOFENOTÍPICO, POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO,
CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS E
CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS DO
ENDOMÉTRIO DE VACAS DURANTE O CICLO ESTRAL

CAROLINA NOGUEIRA DE MORAES MAIA

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

Orientadora: Prof^ª Dr. Eunice Oba

Botucatu, São Paulo

Agosto, 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Maia, Carolina Nogueira de Moraes.

Estudo comparativo do perfil imunofenotípico, potencial de diferenciação, capacidade de produção de citocinas e criopreservação de células estromais do endométrio de vacas durante o ciclo estral / Carolina Nogueira de Moraes Maia.
- Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Bovino. 2. Ciclo estral. 3. Células-tronco. 4. Células mesenquimais estromais - Criopreservação. 5. Citocinas. 6. Endométrio. 7. Útero.

Palavras-chave: LPS; Bovinos; CTMsE; Caracterização; Útero.

Nome da Autora: Carolina Nogueira de Moraes Maia
Data da Defesa: 31 de agosto de 2017.

Banca Examinadora:

Profa. Tit. Eunice Oba
Presidente e Orientadora
Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Rogério Martins Amorim
Membro
Depto de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim
Membro
Depto. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio
Membro
Depto. de Medicina Veterinária
FZEA - Universidade de São Paulo – São Paulo

Prof. Dr. Armando de Mattos Carvalho
Membro
Depto. Clínica e Cirurgia Veterinárias
Escola de Veterinária, UFMG – Belo Horizonte

DEDICATÓRIA

Ao Autor da Vida, sempre!

Agradecimentos

Inicialmente à Deus, por me fortalecer e me mostrar que Ele sempre esteve, está e estará ao lado, me iluminando e sustentando. A jornada foi longa e árdua, mas nunca me senti só.

Agradeço meu esposo Leandro, pelo incentivo e por estar ao meu lado em todas as etapas da minha vida. Todas as dificuldades e vitórias que alcançamos juntos são especiais e foram guiadas por Deus. Te amo.

Agradeço aos meus pais Salviana e Enio por acreditarem sempre em mim e me fazerem cada dia mais forte, mesmo sem saberem. Mãe, que este seja mais um presente de Deus na sua nova vida.

Agradeço às minhas irmãs Daniela e Camila e aos meus cunhados Jr. e Joelson pelo suporte e pela retaguarda.

Agradeço meus sobrinhos Manuela e Arthur por serem meus amores e me encherem de alegria todos os momentos que estamos juntos. E por me matarem de saudade todos os momentos que estamos separados.

Agradeço aos irmãos que Deus permitiu que eu escolhesse: Caroline Destro, Carla Queiroz, Pedro Orlandini, Marianne Camargos, Paula Grippa pela amizade e cumplicidade.

Agradeço aos amigos que pude fazer em Barcelona durante o doutorado sanduíche: Lia, Julia, Cris e Jerônimo. Obrigada por fazerem deste tempo nesse lugar maravilhoso, ainda mais especial e produtivo.

Agradeço a todos os colegas do laboratório, em especial à Marianne Camargos e Caroline Geraldini por estarem na retaguarda quando precisei. Agradeço aos funcionários do departamento de Reprodução Animal pela amizade e conversas.

Agradeço aos professores do departamento que desde muito tempo me acompanham, ensinam e inspiram.

Agradeço à Prof. Fernanda Landim pelo suporte e por abrir tão prontamente as portas do laboratório para desenvolvermos esse experimento.

Agradeço minha orientadora Dra. Eunice Oba por acreditar no meu trabalho e apoiar-me desde o Mestrado. Tudo foi mais leve com sua compreensão e incentivo.

Agradeço ao convênio FAPESP/CAPESP pela bolsa de estudos (2014/20447-2, 2015/18964-1 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e auxílio financeiro (2015/01057-1 Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)).

Por fim agradeço aos animais, peças-chaves em minha vida.

*“Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso! Não se apavore,
nem se desanime, pois, o Senhor, o seu Deus, estará com você por
onde você andar.”*
Josué 1:9

LISTA DE ABREVIÇÕES

CD: cluster of differentiation

CT: células - tronco

CTM: células tronco de origem mesenquimal

CTMsE: células - tronco de origem mesenquimal do tecido endometrial

DMSO: dimetilsulfóxido

IDO: indoleamina 2,3 dioxygenase

INF- γ : interferon γ

LPS: lipopolissacarídeo

MC: meio condicionado

MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófago 1 α

MIP-1 β : proteína inflamatória de macrófago 1 β

MS: espectrometria de massas

NO: óxido nítrico

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGE₂: prostaglandina E₂

SFB: soro fetal bovino

TLR: toll-like receptor

TNF- α : fator de necrose tumoral α ;

TNF- β : fator de necrose tumoral β

UFC-F: unidades formadoras de colônias fibroblastóides

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Data before and after cryopreservation analysis on flow cytometry using annexin V and propidium iodide (PI) from samples of bovine endometrial mesenchymal stem/progenitor cells from Phase II and Phase III. Data is presented as mean and SEM.....	58
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Protein identified in the secretome of conditioned medium of bovine eMSCs treated or not with LPS.....	77
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Sequence of primers, annealing temperature and amplification product sizes of genes used to evaluate bovine eMSCs.....	88
---	----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1- Painel de marcadores de superfície e intracelular já descritos em cultivos de CTMsE em diferentes espécies por citometria de fluxo ou PCR.....	12
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema da classificação das CT com relação à origem e potencial de diferenciação. Fonte: arquivo pessoal.....7
- Figura 2 – Modelo de ativação das MSCs por citocinas pro inflamatórias ou por TLRs. Ativação dos perfis anti-inflamatório (CTM 2) ou pró-inflamatórios (CTM 1). Adaptado de Bernardo & Fibbe, 2013. INF- γ : interferon γ ; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; TNF- β : fator de necrose tumoral β ; CTM: célula tronco mesenquimal; TLR: toll-like receptor; NO: óxido nítrico; IDO: idolamina 2,3 dioxxygenase; LPS: lipopolissacarídeo bacteriano; CYCL9; CXCL10; MIP-1 α : proteína inflamatória de macrófago 1 α ; MIP-1 β : proteína inflamatória de macrófago 1 β . 20

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Immunophenotypic analysis for the markers CD44, CD29, vimentin, CD34, and MHC-II from samples of bovine eMSCs from Phase II (A, C, E, G, I) and Phase III (B, D, F, H, J). Representative histograms of marker CD44 from phase II (A) and III (B). Representative histograms of marker CD29 from phase II (C) and III (D). Representative histograms of marker vimentin from phase II (E) and III (F). Representative histograms of marker CD34 from phase II (G) and III (H). Representative histograms of marker MCH-II from phase II (I) and III (J). Representative histograms of isotype control IgG from phase II (K) and III (M). Representative histograms of secondary control from phase II (L) and III (N). Data is presented as mean and SEM. There were no differences between groups ($p > 0.05$)..... 55

- Figura 2 - Immunohistochemistry of bovine eMSCs for characterization of the markers CD44 (A), vimentin (B) and cytokeratin (C). The positive staining is shown in brown. Negative control (D) by omission of the primary antibody. Nucleus stained with hematoxylin. Bar = 50 μ m (A.B.C), 100 μ m (D)..... 56
- Figura 3 - Differentiation assay for adipogenic and osteogenic lineages of bovine eMSCs. Adipogenic differentiation: Note in (A) the presence of intracytoplasmic lipids droplets stained with Oil red (arrow) and (B) control of differentiation. Osteogenic differentiation: Note in large calcium deposit stained with Alizarim Red (2%) (arrow) (C) and (D) control of differentiation. Bar: 100 μ m (A, C) 200 μ m (B, D)..... 57
- Figura 4 – (A) Clonicity efficiency of bovine eMSCs. Note a formation of a colony well defined. (B) Karyotype analysis of bovine eMSCs (2n=60)..... 57

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - Characterization of bovine eMSCs. Bovine eMSCs on first passage presenting fibroblastoid morphology and adherence to plastic (A). Differentiation assay into osteogenic lineage of bovine eMSCs in third passage (B). Note calcium deposit stained with Alizarim (arrow). Differentiation assay into adipogenic lineage of bovine eMSCs in third passage (C). Note the intracytoplasmic lipids droplets stained with Oil red (arrow). Immunohistochemistry of bovine eMSCs for CD44 (D), vimentin (E) e pancytokeratin (F). Positive staining is observed in brown. Nucleus stained with hematoxylin. Size: 100 μ m (A, D, F), 200 μ m (B, C, E)..... 74

Figura 2 - Representative histogram for the markers analyzed by flow cytometry on bovine eMSCs: vimentin (A), CD29 (B), CD44 (C), CD34 (D), OCT-4 (E) and MHC-II (F)..... 75

Figura 3 – Venn Diagram of proteins identified with at least one peptide sequence (False discovery rate \leq 1%) on studied groups. TG: treated group; CG: control group..... 76

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Timeline. Endometrial mesenchymal stem cells were collected and characterized. Cells on third passage were submitted to quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction (qRT-PCR) and to challenge (TG) or not (CG) with bacterial lipopolysaccharide (LPS). Conditioned medium (CM) was collected after 2, 6, 12 and 24 for cytokine and PGE2 analysis..... 85

Figura 2- Ratio of genes/GAPDH mRNA abundance measured by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction analysis in bovine endometrial mesenchymal stem cells. Results are presented as median with interquartile range. IL-1 α : interleukin 1 α , GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, PTGS2: prostaglandin-endoperoxide synthase 2..... 90

Figura 3 – Cytokine concentration of IFN- α (a), INF- γ (b), IL-13 (c) and IL-1 α (d) on culture medium of bovine endometrial mesenchymal stem cells challenged or not with LPS, after 2, 6, 12 and 24 hours of exposition. Asterisk (* at IL-1 α) represents differences (P< 0.05) between moments. C: control, T: treated. Results are

- presented as median with interquartile range..... 91
- Figura 4 – Cytokine concentration of IL-1F5 (a), IL-21 (b), MIP-1 β (c) and TNF- α (d) on culture medium of bovine endometrial mesenchymal stem cells challenged or not with LPS, after 2, 6, 12 and 24 hours of exposition. Asterisk (*) at TNF- α) represents differences ($P < 0.05$) between groups (control x treated). C: control, T: treated. Results are presented as median with interquartile range. 92
- Figura 5- Prostaglandin Ex2 concentration on bovine endometrial mesenchymal stem cells challenged or not with LPS culture medium after 2 and 24 hours of exposition. Comparison was done between moments and groups. C: control, T: treated. Results are presented as median with interquartile range. Asterisk (*) represents differences ($P < 0.05$) between groups and different letters represents difference ($P < 0.05$) between moments..... 93

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 JUSTIFICATIVA.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
3.1 Células-tronco.....	7
3.1.1 Células-tronco mesenquimais/progenitoras provenientes do endométrio	8
3.2 Isolamento de CTMsE	10
3.3 Caracterização do cultivo celular de CTMsE	11
3.3.1 Caracterização de antígenos de superfície e intracelulares de CTMsE	12
3.3.2 identificação do potencial de diferenciação de CTMsE.....	14
3.3.3 capacidade de auto-renovação	15
3.4 Avaliação cromossômica de CTMsE	15
3.5 Criopreservação de CTMsE	16
3.6 Meio condicionado de CTMs e Proteômica	17
3.7 Imunomodulação das CTMs.....	19
4 OBJETIVOS	22

4.1 Objetivos Gerais	23
4.2 Objetivos Específicos	23
5 HIPÓTESES.....	25
6 REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO 1	
Artigo Científico publicado no periódico “Cell International Biology”: Bovine endometrial cells: a source of mesenchymal stem/progenitor cells.....	36
CAPÍTULO 2	
Artigo Científico publicado no periódico “Veterinary Immunology and Immunopathology”: Shotgun proteomic analysis of the secretome of bovine endometrial mesenchymal progenitor/stem cells challenged or not with bacterial lipopolysaccharide.....	59
CAPÍTULO 3	
Artigo Científico nas normas a ser submetido no periódico “Cytokine”: Evaluation of the immunomodulatory properties of bovine endometrial mesenchymal stem cells	79
CAPÍTULO 4	
7 CONSIDERAÇÕES GERAIS	100
ANEXOS	102

MAIA, C.N.M. **Estudo comparativo do perfil imunofenotípico, potencial de diferenciação, capacidade de produção de citocinas e criopreservação de células estromais do endométrio de vacas durante o ciclo estral.** Botucatu, 2017. 150p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As células-tronco de origem mesenquimal provenientes do tecido endometrial (CTMsE) e seu meio condicionado (MC) apresentam propriedades terapêuticas, e são alternativas promissoras para estudos na medicina veterinária. Estudos envolvendo CTMsE e seu MC ainda são considerados escassos na espécie bovina até o presente momento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de diferenciação, perfil imunofenotípico, estabilidade cromossômica, eficiência de clonicidade, resposta à criopreservação das CTMsE de bovinos coletadas em duas fases do ciclo estral. Adicionalmente, avaliar o secretoma, produção de citocinas e de prostaglandina E₂ (PGE₂) das CTMsE estimuladas ou não com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Para tanto, foi colhido o útero de fêmeas híginas (Fase II n=6/ Fase III n=6) para o isolamento das CTMsE por digestão enzimática. CTMsE em primeira passagem foram avaliadas quanto ao número de cromossomos e as em segunda passagem foi conduzido o ensaio de clonicidade. As CTMsE em terceira passagem (P3) foram submetidas a diferenciação nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica e caracterizadas em relação ao perfil imunofenotípico por citometria de fluxo (CF) (vimentina, CD29, CD44, MHC-II, CD34) e imunocitoquímica (vimentina e CD44). Adicionalmente, as CTMsE em P3 foram criopreservadas utilizando-se dois meios de criopreservação e avaliadas por CF antes e após a criopreservação. Para avaliação da produção de citocinas, PGE₂ e análise do secretoma, o MC das CTMsE foi colhido após 2, 6, 12 e 24 horas de desafio (grupo tratado - GT) ou não (grupo controle - GC) com LPS bacteriano. As proteínas identificadas foram classificadas de acordo com os processos biológicos, função molecular, componente celular e classe proteica. De acordo com os resultados foi observado uma população celular homogênea, com

morfologia fibroblastóide e aderente ao plástico. Na análise por CF as CTMsE expressaram elevada marcação para CD29, CD44 e vimentina, baixa marcação para CD34 e ausência de expressão para o marcador MHC-II. Ainda, apresentaram estabilidade cromossômica, alta eficiência de clonicidade e diferenças ($P>0.05$) na produção de citocinas e PGE_2 após desafio ou não com LPS. Diferenças não foram observadas ($P>0.05$) entre os meios ou fase após o descongelamento. Foram identificados 397 grupos de proteínas no GT e 302 no GC. Houve um enriquecimento positivo para proteínas relacionadas à resposta antibacteriana, ativação dos macrófagos, atividade de hidrolase e enzimas inibitórias no GT, e moléculas de atividade estrutural e filamentos intermediários no GC. Pode-se concluir que as CTMsE de bovinos apresentam nas condições experimentais clonicidade, multipotencialidade, estabilidade cromossômica e satisfatória resposta à criopreservação, o que corrobora para o estabelecimento de bancos de células para uso terapêutico ou novos estudos *in vitro*. Adicionalmente, tais células respondem ao LPS na concentração utilizada, por meio da produção de citocinas, podendo este modelo ser utilizado para avaliação da resposta inflamatória. Ainda, a secreção de proteínas principalmente relacionadas ao remodelamento, resposta imune e angiogênese fazem destas células e de seus meios, promissores para futura aplicação na terapia celular.

Palavras-chave: bovinos, caracterização, CTMsE, LPS, útero

MAIA, C.N.M. **Comparative study of the immunophenotypic profile, differentiation potential, capacity of production of cytokines and cryopreservation of endometrial stromal cells of cattle during the oestrous cycle.** Botucatu, 2017. 150p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, São Paulo State University.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells from the endometrial tissue (MSCsE) and their conditioned medium (CM) have important therapeutic properties and are alternatives for studies in veterinary medicine. Studies involving MSCsE and its CM are still considered scarce in the bovine species until now. Thus, the aim of this study was to evaluate evaluate the potential of differentiation, immunophenotypic profile, chromosomal stability, clonicity efficiency and cryopreservation response of MSCsE from bovines collected in two phases of the estrous cycle. Additionally, to evaluate the secretoma production of cytokine and prostaglandin E2 (PGE₂) of MSCsE stimulated or not with bacterial lipopolysaccharide (LPS). For this, the uterus of healthy females (Phase II n = 6 / Phase III n = 6) was collected for isolation of MSCsE by enzymatic digestion. MSCsE in first passage were evaluated for the number of chromosomes and the second passage was conducted the clonicity assay. The MSCsE in third passage (P3) were differentiated into the adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages and characterized by the immunophenotypic profile by flow cytometry (FC) (vimentin, CD29, CD44, MHC-II, CD34) and immunocytochemistry (vimentin, CD44). Additionally, MSCsE in P3 were cryopreserved using two cryopreservation medium: and evaluated by FC before and after cryopreservation. For evaluation of cytokine, PGE₂ production and analysis of the secretome, CM was collected after 2, 6, 12 and 24 hours of challenge (treated group - TG) or not (control group - CG) with LPS. The identified proteins were classified according to the biological processes, molecular function, cellular component and protein class. According to the results, was observed a homogeneous cell population, with a fibroblastoid

morphology and adherent to the plastic. In FC analysis, the MSCsE expressed high labeling for CD29, CD44 and vimentin, low labeling for CD34 and absence of expression for the MHC-II marker. Still, they presented chromosomal stability, high efficiency of clonicity and differences ($P < 0.05$) in the production of cytokines and PGE_2 after stimulus or not with LPS. Differences were not observed ($P > 0.05$) between the medium or phase after thawing. 397 groups of proteins were identified in GT and 302 in CG. There was a positive enrichment for proteins related to antibacterial response, macrophages activation, hydrolase activity and inhibitory enzymes in TG, and structural activity molecules and intermediate filaments in CG. It is possible to conclude that bovine MSCsE present in the experimental conditions clonicity, multipotentiality, chromosomal stability and satisfactory cryopreservation response, which corroborates for the establishment of cell banks for therapeutic use or new in vitro studies. Additionally, these cells respond to LPS at the concentration used, by the production of cytokines, and this model can be used to evaluate the inflammatory response.

Key words: bovines, characterization, LPS, MSCsE, uterus

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A terapia com células-tronco (CT) apresenta-se como uma prática crescente na medicina veterinária. O interesse nestas células dá-se devido as suas propriedades pró-regenerativas e imunomoduladoras (PAUL; ANISIMOV, 2013). Desta forma, tais células e também o meio em que elas são cultivadas tem apontado como uma alternativa promissora para a terapia, com possível uso em diversas enfermidades, incluindo as que atingem o sistema reprodutivo.

Os bovinos são considerados modelos experimentais e apresentam várias vantagens para serem utilizados em estudos clínicos com células-tronco de origem mesenquimal (CTMs) e extrapolação dos resultados na medicina humana (BOSNAKOVSKI et al., 2004). Dentre estas a facilidade de obtenção de tecido para isolamento, cultivo, expansão e caracterização *in vitro*. Adicionalmente, a quantidade amostral obtida em tais estudos permite o estudo *in vitro* da formação de bancos de células para utilização futura.

Em bovinos, há descrição do isolamento e cultivo de CTMs de diversas fontes tais como do cordão umbilical (XIONG et al., 2014), sangue do cordão umbilical (RAOUFI et al., 2011), fluido amniótico (ROSSI et al., 2014), derme (SUN et al., 2014), medula óssea (BOSNAKOVSKI et al., 2004), tecido adiposo (LU et al., 2014), glândula mamária (CHOUDHARY, 2014) e tecido endometrial (DONOFRIO et al., 2008).

O tecido endometrial é um tecido altamente regenerativo, composto de uma porção luminal, células epiteliais, estromais, endoteliais, fibras musculares e leucócitos. As CTMs endometriais (CTMsE) são células dinâmicas com a capacidade de crescimento e diferenciação durante o ciclo estral e gestação (DONOFRIO et al., 2008). Tais células, presentes no endométrio adulto de humanos e camundongos, normalmente se diferenciam em células endometriais estromais sob influência de fatores de crescimento e esteroides ovarianos (GARGETT et al., 2008).

As CTMs apresentaram resultados favoráveis em aplicações em degeneração endometrial em humanos (MENG et al., 2007), endometriose (MAMBELLI et al., 2013) e fibrose (ALVARENGA et al., 2016) em equinos. Sabe-se que em humanos, as CTMsE foram capazes de reconstruir um endométrio funcional em modelos de xenoenxerto de endometriose em ratos (MASUDA et

al., 2007), e foram descritas em estudos com modelos de doenças metabólicas (SANTAMARIA et al., 2011), cardíacas (BOCKERIA et al., 2013), e neurológicas (WOLLF et al., 2011) evidenciando seu potencial uso em terapias diversas. Entretanto, apesar dos bovinos serem utilizados como modelo experimental de afecções tanto in vivo quanto in vitro, há escassez de estudos referentes a biologia básica das CTMsE.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; SEGABINAZZI, L.G.; GUASTALI, M.D.; MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Feasibility and safety of endometrial injection of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.42, p.12-18, 2016.

ANAND, V.; DOGRA, N.; SINGH, S.; KUMAR, S.N.; JENA, M.K.; MALAKAR, D.; DANG, A.K.; MISHRA, B.P.; MUKHOPADHYAY, T.K.; KAUSHIK, J.K.; MOHANTY, A.K. Establishment and characterization of a buffalo (*Bubalus bubalis*) mammary epithelial cell line. *Plos one*, v.7, n.7, p.1-14, 2012.

AGOSTINI, M., RUFINI, A., BAMPOTON, E.T.W., BERNASSOLA, F., MELINO, G., KNIGHT, R. The p53 Family and Stem Cell Biology. IN: *p53 in the Clinics*, p.65-7, 2013.

BAIL, L.; LENNON, D.P.; CAPLAN, A.I.; DECHANT, A.; HECKER, J.; KRANSO, J.; ZAREMBA, A.; MILLER, R.H. Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nature Neuroscience*, v.15, n.6, p.862-870, 2012.

BOCKERIA, L.; BOGIN, V.; BOCKERIA, O.; LE, T.; ALEKYAN, B.; WOODS, E.J.; BROWN, A.A.; ICHIM, T.E.; PATEL, A.N. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *Journal of Translational Medicine*, v.11, n.56, p.1-8, 2013.

BOSNAKOVSKI, D.; MIZUNO, M.; KIM, G.; ISHIGURO, T.; OKUMURA, M.; IWANAGA, T.; KODOSAWA, T.; FUJINAGA, T. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Experimental Hematology*, v.32, n.5, p.502-509, 2004.

CABEZAS, J.; LARA, E.; PACHA, P.; ROJAS, D.; VERAGUAS, D.; SARAVIA, F.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L.; CASTRO F.O. The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reproduction of Domestic Animals*, v.49, p.550-559, 2014.

CAMERINI, S.; MAURI, P. The role of protein and peptide separation before mass spectrometry analysis in clinical proteomics. *Journal of Chromatography A*, v.1381, p.1-12, 2015.

CHAN, R.W.; GARRETT, C.E. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. *Stem Cells*, v.24, p.1529–1538, 2006.

CHOUHDARY, R.K. Mammary Stem Cells: Expansion and animal productivity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, v.5, n.36, p.5-36, 2014.

CORRADETTI, B.; CORREANI, A.; ROMALDINI, A.; MARINI, M.G.; BIZZARO, D.; PERRINI, C.; CREMONESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. Amniotic membrane-derived mesenchymal cells and their conditioned media: potential candidates for uterine regenerative therapy in the horse. *Plos One*, v.9, n.10, p.1-9, 2014.

DIMITROV, R.; TIMEVA, T.; KYURKCHIEV, D.; STAMENOVA, M.; SHTEREV, A.; KOSTOVA, P.; ZLATKOV, V.; KEHAYOV, I.; KYURKCHIEV, S. Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction*, v. 135, n.4, p.551-558, 2008.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSES, D.S.; DEANS, R.J.; KEATINGS, 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.

DONOFRIO, G.; FRANCESCHI, V.; CAPOCEFALO, A.; CAVIRANI, S.; SHELDON, I.M. Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.6, n.65, p.1-9, 2008.

DU, H.; TAYLOR, H.S. Stem cells and reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, v.22, n.3, p.235–241, 2010.

FORTIER, M.A.; GUILBALT, L.A.; GRASSO, F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.183, n.1, p.239-248, 1988.

FRIEL, R.; VAN DER SAR, S.; MEE, P.J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, n.13, p.1894-1903, 2005.

GAAFAR, T.; OSMAN, O.; OSMAM, A.; ATTIA, W.; HAMZA, H.; HAWARY, R.E. Gene expression profiling of endometrium versus bone marrow-derived mesenchymal stem cells: upregulation of cytokine genes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v.395, n.1-2, p.29-43, 2014.

GARGETT, CE. Uterine stem cells: what is the evidence?" *Human Reproduction Update*, v.13, n1, p.87–101, 2007.

GARGETT, C.E.; CHAN, R.W.; SCHAWAB, K.E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.288, n.1-2, p.22-9, 2008.

GARGETT, C.E.; SCHAWAB, K.E.; ZILLWOOD, R.M.; NGUYEN, H.P.T.; WU, D. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biology of Reproduction*, v.80, n.6, p.1136-1145, 2009.

GARGETT, C.E.; SCHWAB, K.E.; DEANE, J.A. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Human Reproduction Update*, v.22, n2, p.137-165, 2016.

GHOBADI, F.; MEHRABANI, D.; MEHRABANI, G. Regenerative potential of endometrial stem cells: a mini review. *World Journal of Plastic Surgery*, v.4, n.1, p.3-8, 2015.

HEIN, M. Y. et al. Proteomic Analysis of Cellular Systems. In: Walhout, A. J. M., Vidal, M., et al. *Handbook of Systems Biology*. San Diego: Academic Press, 2013, p.3-25.

CONSIGLIO, A.; PERRINI, C.; ESPOSTI, P.; DERIGIBUS, M.C.; CAMUSSI, G.; PASCUCCI, L.; MARINI, M.G.; CORRADETTI, B.; BIZARRO, D.; CREMONESI, F. Effects of microvesicles secreted from equine amniotic-derived progenitor cells on in vitro lipopolysaccharide-treated tendon and endometrial cells. *Reproduction Fertility and Development*, v.28, p.244-245, 2015.

LAVOIE, J.R.; ROSU-MYLES, M. Uncovering the secretes of mesenchymal stem cells. *Biochimie*, v.95, n.12, p.2212-2221, 2013.

LETOUZEY, V.; TAN, K.S.; DEANE, J.A.; ULRICH, D.; GURUNG, S.; ONG, Y.R.; GARGETT, C.E. Isolation and characterization of mesenchymal stem/ stromal cells in the ovine endometrium. *PLoS ONE*; v.10, n.5, p.1-17, 2015.

LU, T.; XIONG, H.; WANG, K.; WANG, S.; MA, Y.; GUAN. Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from Cattle. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.174, n.2, p.716-728, 2014.

ŁUPICKA, M.; BODEK, G.; SHPIGEL, N.; ELNEKAVE, E.; KORZEKWA, A.J. Identification of pluripotent cells in bovine uterus: in situ and in vitro studies. *Reproduction*, v.149, n.4, p.317-327, 2015.

MAIA, L.; CAMARGOS, M.D.; MORAES, C.N.; DELLÁQUA, C.P.F.; MOTA, L.S.L.S.; SANTILONI, V.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Conditioned medium: a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, v.41, p.239-248, 2017.

MALMSTROM, J.; LEE, H.; AEBERSOLD, R. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, n.4, p.378–384, 2007.

MAMBELLI, L.I.; WINTER, G.H.Z.; KERKIS, A.; MALSCHUTZKY, E.; MATTOS, R.C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis. *Theriogenology*, v.79, p.744-750, 2013.

MARQUEZ-CURTIS, L.; JANOWSKA-WEICZOREK, A.; MCGANN, L.E.; ELLIOT, J.A.W. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*, v.71, n.2, p.181-197, 2015.

MASUDA, H.; MARUYAMA, T.; YAMANE, J.; IWANAMI, A.; NAGASHIMA, T.; ONO, M.; MIYOSHI, H.; OKANO, H.J.; ITO, M.; TAMAOKI, N.; NOMURA, T.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y.; YOSHIMURA, Y. Noninvasive and real-time assesment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/ γ_c^{null} immnuodeficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.6 p.1925-1930, 2007.

MAUMUS, M.; JORGENSEN, C.; NOEL, D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. *Biochimie*, v.95, n.12, p.229-2234, 2013.

MENG, X.; ICHIM, T.E.; ZHONG, J.; ROGERS, A.; YIN, Z.; JACKSON, J.; WANG, H.; GE, W.; BOGIN, V.; CHAN, K.W.; THÉBAUD B, RIORDAN, N.H. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Jounal of Translacional Medicine*, v.5, n.5, p.1-10, 2007.

MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N.; HAEGER, J.; PFARRER C.; STASZYK, C. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *BMC Veterinary Research*, v. 7, n.42, p.1-13, 2011.

MERETOJA, V.V.; DAHLIN, R.L.; WRIGHT, S.; KASPER, F.K.; MIKOS, A.G. The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. *Biomaterial*, v.34, n.17, p.4266-4273, 2013.

MIERNIK, K.; KARASINSKI. J. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction*; v.143, n.2, p.203-209, 2012.

MORAES, C.N.; MAIA, L.; DIAS, M.C.; DELLÁQUA, C.P.F.; MOTA, L.S.L.S.; CHAPWANYA, A.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; OBA, E. Bovine endometrial cells: a source of mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biology International*, v.40, p.1332-1339, 2016a.

MORELLI, S.S.; YI, P.; GOLDSMITH, L.T. Endometrial Stem Cells and Reproduction. *Obstetrics and Gynecology International*, v.12, p.1-5, 2012.

PAL, L. Uterine stem cells – promise and possibilities. *Maturitas*, v.82, n.3, p.282-283, 2015.

PAUL, G.; ANISIMOV, S.V. The secretome of mesenchymal stem cell: Potential implications for neuroregeneration. *Biochimie*, v.95, p.2246-2256, 2013.

PALOMARES, G.P. Cromatografía. Análisis y separación de péptidos y proteínas. In: CORRALES, F., CALVETE, J.J. *Manual de Proteómica*, p. 33-55, 2014.

PEREIRA, L.V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. *Revista Ciência & Saúde Coletiva*, v.13, n.1, p.7-14, 2008.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female Reproductive System. In: EURELL, J.A., FRAPPIER, B.L. *Dellmann's textbook of veterinary histology*. Austrália, 2006, 256-279.

RAOUFI, M.F.; TAJIK, P.; DEGHAN, M.M.; EINI, F.; BARIN, A. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reproduction of Domestic Animals*, v.46, n.1, p. 95-99, 2011.

RENZI, S.; LOMBARDO, T.; DOTTI, S.; DESSI, S.S.; DE BLASIO, P.; FERRARI, M. Mesenchymal stromal cell cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, v.10, n.3, p.276-281, 2012.

RINK, B.E.; AMILON, K.R.; ESTEVES, C.L.; FRENCH, H.M.; WATSON, E.; AURICH, C.; DONADEU, F.X. Isolation and characterization of equine endometrial

mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy*, v.8, p.1 66- 178, 2017.

ROCHE, S.; PROVANSAL, M.; TIRS, L.; JORGENSEN, C.; LEHMANN, S. Proteomics of primary mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, v.1, n.4, p.511-517, 2006.

ROSSI, B.; MERLO, B.; COLLEONI, S.; IACONO, E.; TAZZARI, P.L.; RICCI, F.; LAZZARI, G.; GALLI, C. Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. *Stem Cell Reviews and Reports*, v.10, n.5, p.712-724, 2014.

ROSTAMZADEH, A.; ANJOMSHOA, M.; KURD, S.; CHAI, J.; JAHANGIRI, F.; NILFOROUSHZADEH M.A.; ZARE, S. The role of Wharton's Jelly mesenchymal stem cells in skin reconstructive. *Journal of Skin Stem Cells*, v.2, n.2, 2015.

SUBBARAO, R.B.; ULLAH, I.; KIM, E.J.; JANG, S.J.; LEE, W.J.; JEON, R.H.; KANG, D.; LEE, S.L.; PARK, B.W.; RHO, G.J. Characterization and evaluation of neuronal trans-differentiation with electrophysiological properties of mesenchymal stem cells isolated from porcine endometrium. *International Journal of Molecular Sciences*, v.16, n.5, p.10934-10951, 2015.

SANTAMARIA, X.; MASSASA, E.E.; FENG, Y.; WOLFF, E.; TAYLOR, H.S. Derivation of insulin producing cells from human endometrial stromal stem cells and use in the treatment of murine diabetes. *Molecular Therapy*, v.19, n.11, p.2065-2071, 2011.

SHIMOJIMA, C.; TAKEUCHI, H.; JIN, S.; PARAJULI, B.; HATTORI, H.; SUZUMURA, A.; HIBI, H.; UEDA, M.; YAMAMOTO, A. Conditioned medium from the stem cells of human exfoliated deciduous teeth ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology*, v.196, n.10, p.4164-4171, 2016.

SKALNIKOVA, H.K. Proteomic techniques for characterization of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, v.95, p.2196-211, 2013.

STASTNA, M.; ABRAHAM, M.R.; VAN EYK, J.E. Cardiac stem/progenitor cells, secreted proteins, and proteomics. *FEBS Letters*, v.583, p.1800-18007, 2009.

STULTZ, B.G.; MCGINNIS, K.; THOMPSON, E.E.; LOSURDO, J.L.; BAUER, S.R.; HURSH, A. Chromosomal stability of mesenchymal stromal cells during in vitro culture. *Cytotherapy*, v.18, n.3, p.336-343, 2016.

SUNG-MIN, A.; SIMPSON, R.; LEE, B. Genomics and proteomics in stem cell research: the road ahead. *Anatomy and Cell Biology*, v.43, p.1-14, 2010.

SUN, T.; YU, C.; GAO, Y.; ZHAO, C.; HUA, J.; CAI, L.; GUAN, W.; MA, Y. Establishment and biological characterization of a dermal mesenchymal stem cells line from bovine. *Bioscience Reports*, v.34, n.2, p.139-146, 2014.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v.116, n.5, p.639-648, 2004.

WOLFF, E.F.; BING-GAO, X.; YAO, K.V.; ANDREWS, Z.B.; DU, H.; ELSWORTH, J.D.; TAYLOR, H.S. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v.15, n.4, p.747-755, 2011.

XIONG, H.; BAI, C.; WU, S.; GAO, Y.; LU, T.; HU, Q.; GUAN, W.; MA, Y. Biological characterization of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord. *Animal Cells and Systems*, v.18, n.1, p.55-67, 2014.

7. CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com os objetivos propostos, e nas condições experimentais podemos concluir que:

- As CTMsE de bovinos nas fases II e III do ciclo estral foram isoladas e cultivadas com sucesso, sem diferença entre as mesmas;

- As CTMsE de bovinos nas fases II e III do ciclo estral apresentaram baixa imunogenicidade (ausência de expressão de MHC-II), elevada expressão de marcadores de superfície comumente preditos para CTMs (CD44, CD29), ampla capacidade de formação de colônias fibroblásticas, estabilidade cromossômica em cultivo e habilidade para diferenciar em linhagens mesodermis (multipotencialidade) independente da fase estudada;

- As CTMsE de bovinos nas fases II e III do ciclo estral apresentam taxas de viabilidade satisfatórias após a criopreservação independente do meio utilizado. Adicionalmente, a ausência de diferenças entre os meios de criopreservação nos permite inferir que o meio condicionado, com menor concentração de SFB (imunogênico) na composição possa ser uma boa alternativa à criopreservação deste tipo celular;

- A avaliação do secretoma das CTMsE de bovinos por análise proteômica através do seu meio condicionado permitiu a identificação nos grupos expostos ou não ao LPS bacteriano de proteínas de interesse e com amplo potencial terapêutico.

- As CTMsE de bovinos produzem maior quantidade de citocinas e prostaglandina E₂ após estímulo com LPS bacteriano.