

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 20/02/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL PROTEÔMICO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO APÓS  
TRANSPLANTES INTRATECAL DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES EM EQUINOS

DENIS JERONIMO SVICERO

Botucatu, SP  
Fevereiro - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PERFIL PROTEÔMICO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO APÓS  
TRANSPLANTES INTRATECAL DE CÉLULAS ESTROMAIS  
MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES EM EQUINOS

DENIS JERONIMO SVICERO

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária para  
obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Ass. Dr. Rogério Martins  
Amorim

Botucatu, SP  
Fevereiro - 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Svicero, Denis Jeronimo.

Perfil proteômico do líquido cefalorraquidiano após transplantes intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes em equinos / Denis Jeronimo Svicero. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Rogério Martins Amorim  
Capes: 50501062

1. Células mesenquimais estromais. 2. Terapia celular. 3. Proteômica. 4. Líquido cefalorraquidiano. 5. Encefalomielite.

Palavras-chave: Células estromais mesenquimais multipotentes; líquido cefalorraquidiano; mieloencefalite protozoária equina; proteômica; terapia celular.

Nome do Autor: Denis Jeronimo Svicero

Título: PERFIL PROTEÔMICO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO APÓS TRANSPLANTES INTRATECAL DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MULTIPOTENTES EM EQUINOS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu - SP

Profa. Adj. Ana Liz Garcia Alves

Membro

Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu - SP

Profa. Titular Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu - SP

Profa. Dra. Juliana Mozer Sciani

Membro

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa

Universidade São Francisco - Bragança Paulista - SP

Profa. Adj. Juliana Regina Peiró

Membro

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal

FMVA - UNESP - Araçatuba - SP

Data da Defesa: 20 de fevereiro de 2019.

.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ademir e Márcia, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa. Tudo que consegui só foi possível graças ao apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim. Sempre me ensinaram agir com respeito, dignidade, honestidade e sempre auxiliar o próximo. E graças à união de todos, os obstáculos foram ultrapassados, vitórias foram conquistadas e alegrias divididas.

A todos que ainda agem com respeito, dignidade, honestidade e lembram que todos nós vivemos situações aleatórias do cotidiano que impactam em nossas vidas. Pequenos atos nestes momentos podem deixar marcas irreversíveis, literalmente como o seu significado.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim, o meu reconhecimento, respeito e admiração pela sua serenidade, capacidade de análise do perfil de seus orientados, transpira sabedoria e dom no ensino da Ciência, inibindo sempre a vaidade em prol da simplicidade e eficiência.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - UNESP - Botucatu, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação, por ceder suas instalações e serviços para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP - CEVAP e seus membros pelo apoio, incentivo, fomento, desenvolvimento de atividades de pesquisas, promovendo difusão e absorção de conhecimentos científicos e tecnológicos às minhas atividades.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo e seus membros pela implantação e manutenção de mecanismos de coleta, análise, armazenamento, difusão e intercâmbio de dados e informações sobre o desenvolvimento da ciência e tecnologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por conceder bolsas aos programas de Pós-graduação, permitindo assim o apoio e realização das minhas atividades.

Ao grupo de pesquisa sob a direção do Prof. Ass. Dr. Rogério Martins Amorim, pela parceria e colaboração para a conclusão do trabalho.

Meu agradecimento especial a todos os proprietários dos animais que em algum momento, confiaram a mim os cuidados de seus equinos.

Agradeço aos funcionários da FMVZ pela generosidade, pelo auxílio, pela confiança, paciência e respeito.

Aos meus pais e minha irmã, meu agradecimento eterno.

E, finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram com o sucesso deste trabalho.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Identified proteins in the compare group Control After vs. Before.....	32
<b>Tabela 2</b> - Identified proteins in the compare group AD-G After vs. Before.....	33
<b>Tabela 3</b> - Identified proteins in the compare group BM-G After vs. Before.....	34
<b>Tabela 4</b> - Identified proteins exclusives and with diferencial expression in the compare group Control After vs. Before from the web-available STRING v10.5 ..	35
<b>Tabela 5</b> - Identified proteins exclusives and with diferencial expression in the compare group AD-G After vs. Before from the web-available STRING v10.5 ..	36
<b>Tabela 6</b> - Biological processes linked to the proteins exclusives and with diferencial expression in the compare group AD-G After vs. Before from the web-available STRING v10.5.....	37
<b>Tabela 7</b> - Identified proteins exclusives and with diferencial expression in the compare group BM-G After vs. Before from the web-available STRING v10.5.....	37
<b>Tabela 8</b> - Additional file 1. Identified proteins in the compare group EPM vs. Control.....	63

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - String interaction between 3 types of enolases, ENO 1 (Enolase 1), ENO 2 (Enolase 2) and ENO 3 (Enolase 3) .....35
- Figura 2** - Protein-protein interaction network between the proteins identified exclusives and differently expressed in the compare group EPM vs. Control.....62

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2-DE - Eletroforese bidimensional em gel
- AD - Tecido adiposo
- AD-MSCs - MSCs derivadas do tecido adiposo
- AD-G - Grupo tecido adiposo
- Apo-B100 - Apolipoproteína B-100
- APOA - Apolipoproteínas
- BDNF - Fator neurotrófico derivado do cérebro
- BHE - Barreira hematoencefálica
- BM - Medula óssea
- BM-G - Grupo medula óssea
- BM-MSCs - MSCs derivadas da medula óssea
- CD - Cluster differentiation
- CNS - Sistema nervoso central
- Control - Grupo controle
- CSF - Líquido cefalorraquidiano
- DPBS - Solução salina tamponada com fosfato Dulbecco's ou grupo DPBS
- EHV-1- Herpesvírus tipo 1
- ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
- EPM - Mieloencefalite protozoária equina
- EPM group - Grupo EPM
- HGF - Fator de crescimento de hepatócitos
- IA- intraarterial
- IDO - Indoleamina 2,3-dioxigenase
- Ig - Imunoglobulina
- IL 6 - Interleucina 6
- IT - Via intratecal
- IV - Via intravenosa
- M0 ou Before - Antes do primeiro tratamento
- M90 ou After - 30 dias após o terceiro tratamento

MHC-II- Complexo de histocompatibilidade principal classe II  
MSCs - Células estromais mesenquimais multipotentes  
MUE - Meningoencefalite de etiologia desconhecida  
NCBI - National Center for Biotechnology Information  
NGF - Fator de crescimento nervoso  
NO - Óxido nítrico  
NSE - Proteína enolase neurônio-específica  
NSE (ENO-2) - Proteína enolase neurônio-específica de isoforma do tipo  $\gamma$ -enolase  
NT-3 - Neurotrofina 3  
PFA- Proteínas de fase aguda  
PGE 2 - Prostaglandina E2  
RIA - Radioimunoensaios  
RIFI - Reação de imunofluorescência indireta  
SAG - de antígenos de superfície  
SVCM - Mielopatia estenótica vertebral cervical  
TGF  $\beta$  - Fator de crescimento transformador beta  
Treg - Células T reguladoras  
UC - Cordão umbilical  
UC-MSCs - MSCs derivadas do cordão umbilical  
VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular  
WB - Western blot

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1	
INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 Células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs).....	7
2.2 Utilização das MSCs para o tratamento de lesões do CNS.....	8
2.2.1 Mecanismos de ação das MSC.....	8
2.2.2 Vias de transplante.....	10
2.2.3 Fontes de obtenção de MSCs e doses.....	11
2.3 Enfermidades neurológicas em equinos.....	12
2.3.1 Mieloencefalite protozoária equina (EPM).....	12
2.4 Proteômica.....	13
2.4.1 Proteômica clínica ou translacional na medicina humana e veterinária.....	15
2.4.2 Proteômica do líquido cefalorraquidiano (CSF).....	17
2.4.2.1 Proteômica do CSF em animais domésticos.....	19
3 HIPÓTESES.....	22
4 OBJETIVOS.....	22
4.1 Objetivo geral.....	22
4.2 Objetivos específicos.....	22
<b>CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico</b> .....	23
<b>CAPÍTULO 3 – Trabalho Científico</b> .....	44
<b>CAPÍTULO 4</b>	
1 DISCUSSÃO GERAL.....	71
2 CONCLUSÕES GERAIS.....	76
3 BIBLIOGRAFIA.....	77
4 ANEXOS.....	90
4.1 Anexo 1.....	90
4.2 Anexo 2.....	99

SVICERO, D.J. **Perfil proteômico do líquido cefalorraquidiano após transplantes intratecal de células estromais mesenquimais multipotentes em equinos**. Botucatu, 2019. 118 p. tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

Estudos com células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) estão em crescente progresso devido às suas propriedades imunomoduladoras, antiinflamatórias, antiapoptóticas e de regeneração tecidual, tornando essa modalidade de terapia celular promissora no tratamento de diversas doenças. Devido à limitada capacidade regenerativa do sistema nervoso central (CNS), causando sequelas funcionais, as MSCs estão sendo investigadas como uma alternativa terapêutica para condições neurológicas inflamatórias, vasculares, traumáticas e degenerativas em diversas espécies animais. A Mieloencefalite protozoária equina (EPM) causada por ambos os protozoários do filo Apicomplexa, *Sarcocystis neurona* e *Neospora hughesi*, permanece como uma importante doença neurológica dos equinos nas Américas, embora a maioria dos casos seja devida à infecção por *S. neurona*. A aplicação da proteômica com sua gama de ferramentas na clínica de equinos pode contribuir significativamente para o entendimento de processos patológicos e facilitar a descoberta de novos alvos terapêuticos ou marcadores diagnósticos. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram avaliar o perfil proteômico do líquido cefalorraquidiano (CSF) antes e após múltiplos transplantes intratecal de MSCs em equinos hígidos e o perfil proteômico do CSF de equinos cronicamente afetados pela EPM. Doze cavalos adultos clinicamente saudáveis foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo DPBS (DPBS ou control; n = 4) onde a solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco's (DPBS) foi administrada pela via intratecal; grupo AD-G (AD-G; n = 4), no qual foram realizados transplantes intratecal com MSCs alogênicas de tecido adiposo; e grupo BM-G (BM-G; n = 4), no qual foram realizados transplantes intratecal com MSCs alogênicas de medula óssea. Todos os grupos experimentais receberam três tratamentos seriados (DPBS ou MSCs) com intervalo de 30 dias entre eles. As amostras de CSF foram coletadas dos grupos experimentais imediatamente antes do primeiro tratamento (denominado momento M0 ou Before) e 30 dias após o terceiro tratamento (denominado momento M90 ou After). Ao mesmo tempo, os CSF de 16 equinos clinicamente saudáveis e de 9 equinos cronicamente afetados por EPM foram coletados

da subaracnóide, denominados grupo Control (Control; n = 16) e grupo EPM (EPM; n = 9) respectivamente. Cada uma das amostras de CSF do grupo Control e do grupo EPM foram individualmente ressuspensas e agrupadas em *pool*, totalizando dois *pool* representativos de cada um dos grupos experimentais e denominados igualmente (Control e EPM) para avaliar o perfil proteômico dos mesmos. De modo similar, os três grupos que receberam transplantes e coletas de CSF nos dois distintos momentos, foram agrupados em seis *pool* representativos para cada grupo e momento. Considerando a plataforma proteômica utilizada, os três grupos foram pareadamente comparados: DPBS After *vs.* Before, AD-G After *vs.* Before e BM-G After *vs.* Before, sendo encontradas 208, 211 e 131 proteínas em cada comparação, respectivamente. Do mesmo modo, na comparação pareada do CSF dos grupos EPM e Control, EPM *vs.* Control, 201 proteínas foram identificadas e 33 proteínas observadas exclusivamente no CSF do grupo EPM. Ademais, também foi observada na comparação pareada dos grupos DPBS, BM-G e EPM, a presença dos três tipos de enolases interagindo entre si (ENO 1, ENO 2 e ENO 3), sendo em DPBS e BM-G como exclusivas do momento After e no grupo EPM como exclusivas dele. Neste contexto, este estudo ao avaliar os perfis proteômico do CSF antes e após múltiplos transplantes intratecal de MSCs em equinos hípidos e do CSF de equinos cronicamente afetados pela EPM permitiu identificar as enolases como potenciais marcadores de lesão neural e/ou de EPM. Novos estudos devem ser realizados para confirmar estes achados e avançar no conhecimento dos efeitos da terapia celular com MSCs pela via intratecal, para o tratamento de lesões neurológicas em equinos.

**Palavras-chave:** Células estromais mesenquimais multipotentes, terapia celular, proteômica, líquido cefalorraquidiano, Mieloencefalite protozoária equina.

SVICERO, D.J. **Proteomic profiling of cerebrospinal fluid after intrathecal transplantations of multipotent mesenchymal stromal cells in horses**. Botucatu, 2019. 118 p. tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

Multipotent mesenchymal stromal cell (MSCs) studies are under increasing progress because of their immunomodulatory, anti-inflammatory, antiapoptotic and tissue regeneration properties, making this modality of cell therapy promising in the treatment of various diseases. Due to the limited regenerative capacity of the central nervous system (CNS), causing functional sequelae, MSCs are being investigated as a therapeutic alternative for inflammatory, vascular, traumatic and degenerative neurological conditions in various animal species. Equine protozoal myeloencephalitis (EPM) caused by both protozoa of the Apicomplexa phylum, *Sarcocystis neurona* and *Neospora hughesi*, remains an important neurological disease in horses in the Americas, although most cases are due to *S. neurona* infection. The application of proteomics with its range of tools in the equine clinic can contribute significantly to the understanding of pathological processes and facilitate the discovery of new therapeutic targets or diagnostic markers. In this context, the objectives of this study were to evaluate the proteomic profiling of cerebrospinal fluid (CSF) before and after multiple intrathecal transplantations of MSCs in healthy horses and the CSF proteomic profiling of horses chronically affected by EPM. Twelve clinically healthy adult horses were randomly divided into three experimental groups: DPBS (DPBS or control; n = 4), in which intrathecal "transplants" with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) were performed; group AD-G (AD-Gs; n = 4), in which intrathecal transplants were performed with allogeneic adipose tissue MSCs; and BM-G group (BM-G; n = 4), in which intrathecal transplants were performed with allogeneic bone marrow MSCs. All experimental groups received three serial treatments (DPBS or MSCs) with a 30-day interval between them. CSF samples were collected from the experimental groups immediately before the first treatment (called the M0 or Before) and 30 days after the third treatment (called the M90 or After). At the same time, CSF of 16 healthy horses and 9 horses chronically affected by EPM were collected from the subarachnoid, Control group (Control; n = 16) and EPM group (EPM; n = 9) respectively. Each of the CSF samples from the Control group and from the EPM group were individually

resuspended and pooled, totalizing two representative pools of each one the experimental groups and also named (Control and EPM) to evaluate their proteomic profilings. Similarly, the three groups that received transplants and CSF collections at two different times were grouped into six representative pools for each group and time. Considering the proteomic platform used, the three groups were similarly compared: DPBS After *vs.* Before, AD-G After *vs.* Before and BM-G After *vs.* Before, being found 208, 211 and 131 proteins in each comparison, respectively. Likewise, in the paired comparison of the CSF of the EPM and Control groups, EPM *vs.* Control, 201 proteins were identified, and 33 proteins were observed exclusively in the CSF of the EPM group. In addition, the presence of the three types of enolases interacting with each other (ENO 1, ENO 2 and ENO 3) was also observed in the comparison of the DPBS, BM-G and EPM groups, being exclusives in DPBS and BM-G at time After and in the EPM group as its exclusively. In this context, this study, when evaluating the proteomic profilings of CSF before and after multiple intrathecal transplantations of MSCs in healthy horses and CSF of horses chronically affected by EPM, allowed the identification of enolases as potential markers of neural and / or EPM injury. Further studies should be performed to confirm these findings and to advance the knowledge of the effects of intrathecal cell therapy with MSCs for the treatment of neurological lesions in horses.

**Key words:** Multipotent mesenchymal stromal cells, cell-based therapy, proteomics, cerebrospinal fluid, Equine protozoal myeloencephalitis.

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO

Estudos com células estromais mesenquimais multipotentes (MSCs) estão em crescente avanço devido às suas propriedades imunomodulatórias, antiinflamatórias e de regeneração tecidual, tornando esta modalidade de terapia celular promissora no tratamento de diversas enfermidades. (BURK et al., 2013; CARRADE et al., 2012; CHAMBERLAIN et al., 2007; GUTIERREZ-NIBEYRO, 2011; NÖTH et al., 2010). Devido a limitada capacidade do sistema nervoso central (CNS) se regenerar, as MSCs estão sendo investigadas como alternativa terapêutica para condições neurológicas inflamatórias, vasculares, traumáticas e degenerativas (KARUSSIS; PETROU; KASSIS, 2013).

Os mecanismos pelos quais as MSCs induzem efeitos positivos no tecido nervoso lesionado ainda não foram completamente elucidados. Alguns dos mecanismos que podem ter um papel importante na neuroregeneração e neuroproteção incluem a secreção de fatores de crescimento neurotróficos, anti-apoptóticos e, assim como, de citocinas antiinflamatórias e proteínas de matriz extracelular (JONES; MCTAGGART, 2018).

Estudos têm demonstrado o potencial terapêutico das MSCs em tratar doenças do sistema nervoso como Alzheimer, esclerose múltipla e lesões de medula espinhal, mostrando efeitos benéficos (CHENG et al., 2015; COHEN, 2013; HYATT et al., 2014; KARUSSIS; PETROU; KASSIS, 2013; LINDVALL; KOKAIA, 2006; MAZZINI et al., 2010; PENHA et al., 2014; UCCELLI et al., 2011).

Há diversas enfermidades neurológicas que afetam os equinos, cujos tratamentos preconizados não são totalmente eficientes e acarretam em sequelas, como na mieloencefalite protozoária equina (EPM) e a mielopatia estenótica vertebral cervical (CVSM) (DIRIKOLU; FOREMAN; TOBIN, 2013; REED; GRANT; NOUT, 2008). Neste contexto a terapia com MSCs poderia trazer benefícios no tratamento destas enfermidades. Contudo para que esta biotecnologia saia da bancada dos laboratórios para a rotina clínica, faz-se necessário estudos clínicos de segurança e eficácia, levando-se em consideração a enfermidade a ser tratada, o tipo celular, a via de transplante, a dose e a frequência dos tratamentos.

Já existem dados indicando que tanto as MSCs autólogas quanto as alogênicas são bem toleradas em equinos quando administradas pelas vias intravenosa (IV), intra-

articular, intra/perilesional e intratecal (IT) (BARBERINI, 2017; CARRADE et al., 2011a; MAIA et al., 2015; PIGOTT et al., 2013). As MSCs alogênicas são ideais para o tratamento de lesões agudas onde a expansão celular de MSCs autólogas em cultura é uma limitação para o uso imediato destas células na terapia.

A ausência da expressão do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC-II) na superfície das MSCs é uma importante característica imunomodulatória (BARBERINI et al., 2014). Esta ausência fornece às MSCs o potencial de escapar do reconhecimento das células T, fazendo com que a terapia alogênica seja possível (BORJESSON; PERONI, 2011; CARRADE et al., 2011b; RYAN et al., 2005; SOLE et al., 2012). Por outro lado, estudos têm revelado que as MSCs alogênicas quando transplantadas podem elicitar uma resposta humoral no hospedeiro, assim como expressar MHC-II na presença de interferon gama, acarretando em diminuição do tempo de sobrevivência celular (SCHNABEL et al., 2014; PEZZANITE et al., 2015).

Inúmeros estudos descrevem aspectos morfológicos, de capacidade de proliferação, diferenciação celular, imunofenotipagem e propriedades terapêuticas das MSCs provenientes de diferentes fontes teciduais. Contudo, até o momento não está estabelecido um consenso de qual é a melhor fonte tecidual para obtenção das MSCs em equinos com finalidades terapêuticas (BARBERINI et al., 2015).

Pelo nosso conhecimento não existem estudos sobre o perfil proteômico do líquido cefalorraquidiano (CSF) de equinos após múltiplos transplantes intratecal de MSCs alogênicas provenientes do tecido adiposo (AD-MSCs) e MSCs alogênicas provenientes da medula óssea (BM-MSCs). Além disso, desconhecemos a existência de estudos sobre o perfil proteômico do CSF de equinos acometidos por EPM.

A análise proteômica do CSF de equinos, sadios ou com EPM, que receberam múltiplos transplantes intratecal de MSCs poderá revelar quais vias metabólicas e/ou potenciais biomarcadores estão diferencialmente expressos antes e após os transplantes celulares.

Os resultados obtidos com esta abordagem poderão contribuir tanto com o entendimento dos mecanismos de ação das MSCs no processo de neuroregeneração do CNS dos equinos, como com o desenvolvimento de um protocolo de terapia celular seguro e eficiente

comparação com os níveis detectados no estágio de taquizoíto. Isto é significativo considerando que os parasitas relacionados como *T. gondii* dependem da glicólise anaeróbia durante o período de encistamento de bradizoítos, devido à mitocôndria não funcional (WILSON et al., 2004). Estes estudos sustentam ainda mais a enolase como uma molécula alvo de prospeção para a imunoprofilaxia de estágios do parasita. A reatividade cruzada individual das isoformas de enolase entre os parasitas relacionados foi descrita. Por exemplo, anticorpo anti-*T. gondii* enolase 2 demonstrou a reatividade cruzada com taquizoítos de *Neospora* spp. e merozoítos de *S. Neurona* pela análise de WB, mas o anticorpos anti-*T. gondii* enolase 1 não reagiu com os merozitas de *S. Neurona* pela análise do WB (WILSON et al., 2004). Com base na sequência de homologia das sequências conhecidas de DNA de enolase 1 e 2 entre os parasitas Sarcocystidae, era de se esperar que as proteínas poderiam ser muito semelhantes e mostrarem perfis de expressão semelhantes (WILSON et al., 2004). Merozoítos de *Sarcocystis neurona* e os esquizontes reagiram com os anticorpos da anti-enolase 1 e 2. A coloração para anti-enolase 1 foi muito mais fraca em comparação com a coloração mais forte de anti-enolase 2 para os merozoítos de *S. Neurona* e esquizontes, sugerindo a existência de pelo menos duas supostas proteínas enolase em *S. Neurona* (BOLTEN et al., 2008). Assim, os achados de CSF-ENO1 e CSF-ENO2 nos cavalos infectados por *S. neurona* em nosso estudo podem representar um potencial marcador de EPM a ser investigado em estudos futuros.

## 2 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos com esta abordagem proteômica podem contribuir com o entendimento dos mecanismos de ação das MSCs no processo de neuroregeneração do CNS dos equinos; com o desenvolvimento de um protocolo de terapia celular com MSCs mais seguro e eficiente e com a identificação de potenciais marcadores de lesão neural e/ou de EPM.

Neste contexto, este estudo ao avaliar os perfis proteômico do CSF antes e após três transplantes intratecal de MSCs em equinos hígidos e do CSF de equinos cronicamente afetados pela EPM permitiu identificar as enolases como potenciais marcadores de lesão neural e/ou de EPM. Novos estudos devem ser realizados para confirmar estes achados e avançar no conhecimento dos efeitos da terapia celular com MSCs pela via intratecal no CSF, para o tratamento de lesões neurológicas em equinos.

### 3 BIBLIOGRAFIA

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 198–207, 2003.
- AL DELFI, I. R. et al. Canine mesenchymal stem cells are neurotrophic and angiogenic: An in vitro assessment of their paracrine activity. **The Veterinary Journal**, v. 217, p. 10–17, 1 nov. 2016.
- ALT, E. U. et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. **Stem Cell Research**, v. 8, n. 2, p. 215–225, 1 mar. 2012.
- AMEMORI, T. et al. Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 257, 22 dez. 2015.
- APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Post-translational modifications: A challenge for proteomics and bioinformatics. **Proteomics**, v. 4, n. 6, p. 1525–1526, 2004.
- BARBERINI, D. J. et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 1, p. 25, 2014.
- BARBERINI, Danielle Jaqueta. **Avaliação do transplante intratecal de células tronco mesenquimais alogênicas em equinos sadios e portadores de sequelas neurológicas**. 2017. 128 f. Tese (Doutorado) – Escola de veterinária e zootecnia, Universidade do estado de São Paulo, UNESP, Botucatu, SP, Brazil, 2017.
- BARTHOLOMEW, S. et al. Collection of equine cord blood and placental tissues in 40 thoroughbred mares. **Equine veterinary journal**, v. 41, 2009.
- BENTZ, B. G.; EALEY, K. A.; MORROW, J. et al. Seroprevalence of Antibodies to Sarcocystis Neurona in Equids Residing in Oklahoma. **J Vet Diagnostic Investig**, 2003.
- BENTZ, B. G.; GRANSTROM, D. E; STAMPER, S. Seroprevalence of antibodies to Sarcocystis neurona in horses residing in a county of southeastern Pennsylvania. **J Am Vet Med Assoc.**, 1997.
- BERGLUND, A. K.; SCHNABEL, L. V. Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. **Equine Veterinary Journal**, 2017.

- BOLTEN, K. E.; MARSH, A. E.; REED, S. M. et al Sarcocystis neurona: Molecular characterization of enolase domain I region and a comparison to other protozoa. **Exp Parasitol**, v. 120, p. 108–112, 2008.
- BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 109–123, 2011.
- BOURZAC, C. et al. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 6, p. 519–527, 1 set. 2010.
- BRENN, A. et al. A comprehensive proteome map of bovine cerebrospinal fluid. **Proteomics**, v. 9, n. 22, p. 5199–5205, 2009.
- BROCCARDO, C. J. et al. Proteomic Characterization of Equine Cerebrospinal Fluid. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 3, p. 451–458, 1 mar. 2014.
- BURK, J. et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. **The Veterinary Journal**, v. 195, n. 1, p. 98–106, 2013.
- CARRADE, D. D. et al. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cytotherapy**, v. 13, n. 4, p. 419–430, 2011a.
- CARRADE, D. D. et al. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cell medicine**, v. 4, n. 1, p. 1–11, 2012.
- CARRADE, D. D. et al. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. **Cytotherapy**, v. 13, 2011b.
- CARRADE, D. D.; BORJESSON, D. L. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. **Comparative Medicine**, v. 63, n.3, p. 207-217, 2013.
- CARVALHO, A. M. et al. Use of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for experimental tendinitis therapy in equines **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n.1, p. 26-34, 2011.
- CECILIANI, F. et al. Application of post-genomic techniques in dog cancer research. **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 9, p. 2665–2679, 2016.
- CECILIANI, F. et al. Proteomics in Veterinary Medicine: Applications and Trends in Disease Pathogenesis and Diagnostics. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 351–362, 2014.

- CELLI, P. Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, n. 2, p. 233–240, 2011.
- CHAE, Y. K.; GONZALEZ-ANGULO, A. M. Implications of functional proteomics in breast cancer. **Oncologist**, v. 19, n. 4, p. 328–335, 2014.
- CHAMBERLAIN, G. et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2739–2749, 2007.
- CHAMOUN, V. et al. Haptoglobins as markers of blood–CSF barrier dysfunction: the findings in normal CSF. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 182, n. 2, p. 117–121, 1 jan. 2001.
- CHELLUBOINA, B.; DINH, D. H.; VEERAVALLI, K. K. Transdifferentiation of differentiated stem cells contributes to remyelination. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 191, 5 dez. 2015.
- CHEN, B. K. et al. A safety study on intrathecal delivery of autologous mesenchymal stromal cells in rabbits directly supporting Phase I human trials. **Transfusion**, v. 55, n. 5, p. 1013–1020, 1 maio 2015.
- CHEN, C.H. (WINSTON). Review of a current role of mass spectrometry for proteome research. **Analytica Chimica Acta**, v. 624, n. 1, p. 16–36, 22 ago. 2008.
- CHEN, J. et al. Therapeutic Benefit of Intravenous Administration of Bone Marrow Stromal Cells After Cerebral Ischemia in Rats. **Stroke**, v. 20, n. 1, p. 84–91, 1 abr. 2001.
- CHENG, Q. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against ischemic brain injury in mouse by regulating peripheral immunoinflammation. **Brain Research**, v. 1594, p. 293–304, 12 jan. 2015.
- CHUNG, H. et al. Expression of neurotrophic factors in injured spinal cord after transplantation of human-umbilical cord blood stem cells in rats. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 1, p. 97, 1 mar. 2016.
- COHEN, J. A. Mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 333, n. 1–2, p. 43–49, 15 out. 2013.
- CORREALE, J.; RABINOWICZ, A. L.; HECK, C. N. et al Status epilepticus increases CSF levels of neuron-specific enolase and alters the blood-brain barrier. **Neurology**, 1998.
- CUI, Y. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation improves cognitive function in Alzheimer’s disease mice by decreasing oxidative stress and promoting hippocampal neurogenesis. **Behavioural Brain Research**, v. 320, p. 291–

301, 1 mar. 2017.

DE CANIO, M. et al. Differential protein profile in sexed bovine semen: Shotgun proteomics investigation. **Molecular BioSystems**, v. 10, n. 6, p. 1264–1271, 2014.

DE SCHAUWER, C. et al. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 81, n. 4, p. 312–323, 2012.

DE SOUSA-PEREIRA, P. et al. Cross-species comparison of mammalian saliva using an LC-MALDI based proteomic approach. **Proteomics**, v. 15, n. 9, p. 1598–1607, 2015.

DIRIKOLU, L.; FOREMAN, J. H.; TOBIN, T. Current therapeutic approaches to equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 4, p. 482–491, 15 fev. 2013.

DOMBROWSKI, Y. et al. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 674–680, 13 mar. 2017.

DRELA, K. et al. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. **Cytotherapy**, v. 18, n. 4, p. 497–509, 1 abr. 2016.

DUARTE, P. C.; DAFT, B. M.; CONRAD, P. A. et al Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. **J Vet Diagnostic Investig**, v.15, p. 8–13. 2003.

DUBEY, J. P. et al. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 2–4, p. 89–131, 26 fev. 2001.

DUBEY, J. P. et al. An update on *Sarcocystis neurona* infections in animals and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). **Veterinary Parasitology**, v. 209, n. 1–2, p. 1–42, 15 abr. 2015.

DUBEY, J. P.; KERBER, C. E.; GRANSTROM, D. E. Serologic prevalence of *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii*, and *Neospora caninum* in horses in Brazil. **J Am Vet Med Assoc**, 1999.

DUBEY, J. P.; VENTURINI, M. C.; VENTURINI, L. et al Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina. **Vet Parasitol**, v. 86, p. 59–62, 1999.

DZIERSZINSKI, F.; MORTUAIRE, M.; DENDOUGA, N. et al Differential expression of two plant-like enolases with distinct enzymatic and antigenic properties during stage conversion of the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **J Mol Biol**, 2001.

- DZIERSZINSKI, F.; POPESCU, O.; TOURSEL, C. et al The Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii* Expresses Two Functional Plant-like Glycolytic Enzymes. **J Biol Chem**, v. 274, p. 24888–24895, 1999.
- ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23–27, 2010.
- EDWARDS, A. V. G.; WHITE, M. Y.; CORDWELL, S. J. The role of proteomics in clinical cardiovascular biomarker discovery. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1824–1837, 2008.
- FABIAN, C. et al. Distribution pattern following systemic mesenchymal stem cell injection depends on the age of the recipient and neuronal health. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 85, 18 dez. 2017.
- GALEANO, C.; QIU, Z.; MISHRA, A.; FARNSWORTH, S. L.; HEMMI, J. J.; MOREIRA A.; EDENHOFFER ,P.; HORNSBY P. J. The Route by Which Intranasally Delivered Stem Cells Enter the Central Nervous System. **Cell Transplantation**. v. 27, n. 3, p.501–514, 2018.
- GILBERT, W. J. S.; KRASIMIR, S.; KARIN, D. C. W. et al Molecular evolution of enolase. **Acta Biochim Pol**, v. 52, p. 507–513, 2005.
- GOEHRING, L. S. et al. Evaluation of Nephelometry for Albumin Measurement in Serum and Cerebrospinal Fluid: Experiences with an Indwelling Subarachnoidal Catheter System for Repetitive Cerebrospinal Fluid Collection in Horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, n. 3, p. 251–256, 25 maio 2006.
- GRANSTROM, D. E.; DUBEY, J. P.; DAVIS, S. W. et al Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. **J Vet Diagn Invest**, v. 5, p. 88–90, 1993.
- GUO, Y.; FU, Z.; VAN EYK, J. E. A proteomic primer for the clinician. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 4, n. 1, p. 9–17, 2007.
- GUTIERREZ-NIBEYRO, S. D. Commercial Cell-based Therapies for Musculoskeletal Injuries in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 363–371, 2011.
- GYGI, S. P. et al. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 994–999, 1999.
- HARDEMARK, H. G.; ERICSSON, N.; KOTWICA, Z. et al S-100 protein and neuron-specific enolase in CSF after experimental traumatic or focal ischemic brain damage. **J Neurosurg**. 1989.
- HARRIS, V. K. et al. Clinical and pathological effects of intrathecal injection of

- mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 313, n. 1–2, p. 167–177, 15 fev.
- HARRIS, V. K.; VYSHKINA, T.; SADIQ, S. A. Clinical safety of intrathecal administration of mesenchymal stromal cell-derived neural progenitors in multiple sclerosis. **Cytotherapy**, v. 18, n. 12, p. 1476–1482, 1 dez. 2016.
- HATFIELD, R. H.; MCKERNAN, R. M. CSF neuron-specific enolase as a quantitative marker of neuronal damage in a rat stroke model. **Brain Res**, n.577, p. 249–252, 1992.
- HAY, E.; ROYDS, J. A.; DAVIES-JONES, G. A. B. et al Cerebrospinal fluid enolase in stroke. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 1984.
- HENDRICKSON, R. C. et al. High resolution discovery proteomics reveals candidate disease progression markers of Alzheimer’s disease in human cerebrospinal fluid. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- HENNING, A.-K. et al. Analysis of the bovine plasma proteome by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight tandem mass spectrometry. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 1, p. 175–180, 2014.
- HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L. E. et al. A proteomics study of colostrum and milk from the two major small ruminant dairy breeds from the Canary Islands: A bovine milk comparison perspective. **Journal of Dairy Research**, v. 83, n. 3, p. 366–374, 2016.
- HOWE, D. K.; MACKAY, R. J.; REED, S. M. Equine Protozoal Myeloencephalitis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 659–675, 1 dez. 2014.
- HOYNOWSKI, S. M. et al. Characterization and differentiation of equine umbilical cord-derived matrix cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 2, p. 347–353, 2007.
- HU, Y. et al. Comparative Proteomic Analysis of Intra- and Interindividual Variation in Human Cerebrospinal Fluid. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, n. 12, p. 2000–2009, 2005.
- HUBBARD, M. J. Functional proteomics: The goalposts are moving. **Proteomics**, v. 2, n. 9, p. 1069-1078, 2002.
- HYATT, A. J. T. et al. Mesenchymal stromal cells integrate and form longitudinally-aligned layers when delivered to injured spinal cord via a novel fibrin scaffold. **Neuroscience Letters**, v. 569, p. 12–17, 21 maio 2014.
- IDEKER, T. et al. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. **Science**, v. 292, n. 5518, p. 929–934, 2001.
- ISLAM, R. et al. Determination of anti-inflammatory cytokine in periparturient cows for prediction of postpartum reproductive diseases. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 974–

979, 2013.

ISRAR, M. Z.; HEANEY, L. M.; SUZUKI, T. Proteomic Biomarkers of Heart Failure. **Heart Failure Clinics**, v. 14, n. 1, p. 93–107, jan. 2018.

JANSSEN, D. Major approaches to identifying key PTMs. **Genomics and Proteomics**, v. 3, n. 1, p. 38–41, 2003.

JAROCHA, D. et al. Continuous Improvement after Multiple Mesenchymal Stem Cell Transplantations in a Patient with Complete Spinal Cord Injury. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 661–672, 1 abr. 2015.

JENSEN, O. N. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 33–41, 2004.

JONES, B.J.; MCTAGGART, S.J. Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. **Experimental Hematology**, v.36, p.733–741, 2008.

JOYCE, N. et al. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. **Regenerative Medicine**, v. 5, n. 6, p. 933–946, 17 nov. 2010.

KARUSSIS, D.; PETROU, P.; KASSIS, I. Clinical experience with stem cells and other cell therapies in neurological diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 324, n. 1–2, p. 1–9, 15 jan. 2013.

KISHK, N. A.; ABOKRYSHA, N. T.; GABR, H. Possible induction of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM)-like demyelinating illness by intrathecal mesenchymal stem cell injection. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 20, n. 2, p. 310–312, 1 fev. 2013.

KLOPFLEISCH, R. Personalised medicine in veterinary oncology: One to cure just one. **Veterinary Journal**, v. 205, n. 2, p. 128–135, 2015.

KOERNER, J. et al. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 6, p. 1613-1619, 2006.

KOTA, D. J. et al. Prostaglandin E2 Indicates Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cells in Experimental Traumatic Brain Injury. **Stem cells**, v. 35, n. 5, p. 1416–1430, 1 maio 2017.

KROKSVEEN, A. C. et al. Proteomics of human cerebrospinal fluid: Discovery and verification of biomarker candidates in neurodegenerative diseases using quantitative proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 371–388, 2011.

KROPP, S.; ZERR, I.; SCHULZ-SCHAEFFER, W. J. et al Increase of neuron-specific enolase in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. **Neurosci Lett**, 1999.

KYCKO, A.; REICHERT, M. Proteomics in the search for biomarkers of animal

- cancer. **Current Protein and Peptide Science**, v. 15, n. 1, p. 36–44, 2014.
- LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Characteristics of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow: In vitro proliferative and multilineage potential assessment. **Equine Veterinary Journal**, v. 45, n. 6, p. 737–744, nov. 2013.
- LEE, J. et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury in mice. **Neuropathology**, v. 23, n. 3, p. 169–180, 1 set. 2003.
- LIANG, J. et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in treatment of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 15, n. 5, p. 644–646, 23 maio 2009.
- LIMA, J. E.; TAKAYANAGUI, O. M.; GARCIA, L. V.; LEITE, J. P. Neuron-specific enolase in neurological disorders, 2004.
- LINDSAY, D. S.; DUBEY, J. P. Direct agglutination test for the detection of antibodies to *Sarcocystis neurona* in experimentally infected animals. **Vet Parasitol**, v. 95, p. 179–186, 2001.
- LINDVALL, O.; KOKAIA, Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. **Nature**, v. 441, n. 1, p. 1094–1096, 2006.
- LINS, L. A.; FEIJÓ, L. S.; NOGUEIRA, C. E. W. Equine protozoal myeloencephalitis in southern Brazil between 1998-2006. **Revista de Ciências Agroveterinárias.**, v. 11, n. 3, p. 248–250, 2012.
- LIU, W. et al. Bone marrow stromal cells can be delivered to the site of traumatic brain injury via intrathecal transplantation in rabbits. **Neuroscience Letters**, v. 434, n. 2, p. 160–164, 28 mar. 2008.
- LU, L. et al. Mechanism of umbilical cord mesenchymal stem cells in the up-regulation of regulatory T cells by transforming growth factor  $\beta$ 1 in systemic lupus erythematosus. **Zhonghua yi xue za zhi**, v. 93, n. 13, p. 980–3, 2 abr. 2013.
- MAIA, L. et al. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 63, 15 mar. 2015.
- MALTMAN, D. J.; HARDY, S. A.; PRZYBORSKI, S. A. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 3, p. 347–356, 1 set. 2011.
- MAMBELLI, L. I. et al. Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. **Tissue Engineering Part C Methods**, v. 15, 2009.

- MARANGOS, P. J.; CAMPBELL, I. C.; SCHMECHEL, D. E. et al Blood Platelets Contain a Neuron-Specific Enolase Subunit. **J Neurochem**, 1980.
- MARANGOS, P. J.; PARMA, A. M.; GOODWIN, F. K. Functional Properties of Neuronal and Glial Isoenzymes of Brain Enolase. **J Neurochem**, v. 31, p. 727–732, 1978.
- MARANGOS, P. J.; SCHMECHEL, D. E. Neuron Specific Enolase, A Clinically Useful Marker for Neurons and Neuroendocrine Cells. **Annu Rev Neurosci**, v. 10, p. 269–295, 1987.
- MARANGOS, P. J.; SCHMECHEL, D.; PARMA, A. M. et al Measurement of Neuron-Specific (Nse) and Non-Neuronal (Nne) Isoenzymes of Enolase in Rat, Monkey and Human Nervous Tissue. **J Neurochem**, v. 33, p. 319–329, 1979.
- MAZZINI, L. et al. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. **Experimental Neurology**, v. 223, n. 1, p. 229–237, 1 maio 2010.
- MELIEF, S. M. et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. **Stem cells**, v. 31, n. 9, p. 1980–1991, set. 2013.
- NAKAMURA, K. et al. Proteome Analysis of Cerebrospinal Fluid in Healthy Beagles and Canine Encephalitis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 74, n. 6, p. 751–756, 2012.
- NIXON, A. J. et al. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 69, n.7, p. 928-937, 2008.
- NOBEN, J.-P. et al. Lumbar cerebrospinal fluid proteome in multiple sclerosis: Characterization by ultrafiltration, liquid chromatography, and mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, v. 5, n. 7, p. 1647–1657, 2006.
- NÖTH, U. et al. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 7–8, p. 765–783, 2010.
- PARR, A. M.; TATOR, C. H.; KEATING, A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, n. 7, p. 609–619, 2 out. 2007.
- PAUL, G.; ANISIMOV, S. V. The secretome of mesenchymal stem cells: Potential implications for neuroregeneration. **Biochimie**, v. 95, n. 12, p. 2246–2256, 1 dez. 2013.
- PEASE, A.; BEHAN, A.; BOHART, G. Ultrasound-guided cervical centesis to obtain cerebrospinal fluid in the standing horse. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, v.

53, n. 1, p. 92–95, 2012.

PEIXOTO, A. P. C. et al. Equine protozoal myeloencephalitis. **Revista brasileira de saúde e produção animal**, v. 4, n. 1, p. 30–34, 2003.

PENHA, E. M. et al. Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow for the Treatment of Naturally Injured Spinal Cord in Dogs. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

PERONI, J. F.; BORJESSON, D. L. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stem cells. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, n.2, p. 351-362, 2011.

PERSSON, L.; HARDEMARK, H.; GUSTAFSSON, J. et al S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: Markers of cell damage in human central nervous system. **Stroke** 18:911–918, 1987.

PEZZANITE, L. M. et al. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. **Stem Cell Research and Therapy**, 2015.

PIGOTT, J. H. et al. Investigation of the immune response to autologous, allogeneic, and xenogeneic mesenchymal stem cells after intra-articular injection in horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 156, n. 1–2, p. 99–106, nov. 2013.

PUSTERLA, N. et al. Comparison of prevalence factors in horses with and without seropositivity to *Neospora hughesi* and/or *Sarcocystis neurona*. **The Veterinary Journal**, v. 200, n. 2, p. 332–334, 1 maio 2014.

RAAMSDONK, L. M. et al. A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 45–50, 2001.

RANERA, B. et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 1–2, p. 147–154, 15 nov. 2011.

RAVANIDIS, S. et al. Neuroinflammatory signals enhance the immunomodulatory and neuroprotective properties of multipotent adult progenitor cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 176, 16 dez. 2015.

RECH, R.; BARROS, C. Neurologic Diseases in Horses. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 31, n. 2, p. 281–306, ago. 2015.

REED, S. M. et al. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus

- Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 491–502, 1 mar. 2016.
- REED, S. M. et al. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 491–502, 1 mar. 2016.
- REED, S.; GRANT, B.; NOUT, Y. Cervical Vertebral Stenotic Myelopathy. In: **Equine Neurology**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2008. p. 283–298.
- RICHARDSON, L. E. et al. Stem cells in veterinary medicine - attempts at regenerating equine tendon after injury. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 409–416, 2007.
- ROBINSON, A. M. et al. The neuroprotective effects of human bone marrow mesenchymal stem cells are dose-dependent in TNBS colitis. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 87, 18 dez. 2017.
- ROINE, R. O.; SOMER, H.; KASTE, M. et al Neurological outcome after out-of-hospital cardiac arrest: Prediction by cerebrospinal fluid enzyme analysis. **Arch Neurol**, 1989.
- ROMEO, M. J.; ESPINA, V.; LOWENTHAL, M. et al CSF proteome: A protein repository for potential biomarker identification. **Expert Rev Proteomics**, v. 2, p. 57–70, 2005.
- RONCADA, P. et al. Farm animal milk proteomics. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4259–4274, 2012.
- ROYDS, J. A.; TIMPERLEY, W. R.; TAYLOR, C. B. Levels of enolase and other enzymes in the cerebrospinal fluid as indices of pathological changes. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 1981.
- RYAN, J. M. et al. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. **Journal of inflammation** (London, England), v. 2, n.8, 2005.
- SAAD, M. et al. Glioproliferative lesion of the spinal cord derived from intrathecal administration of stem cells. **Neurology**, v. 86, n. 16, 2016.
- SADYGOV, R. G.; COCIORVA, D.; YATES, J. R. Large-scale database searching using tandem mass spectra: Looking up the answer in the back of the book. **Nature Methods**, v. 1, n. 3, p. 195–202, 18 dez. 2004.
- SATOH, H.; YAMATO, O.; ASANO, T. et al Cerebrospinal fluid biomarkers showing neurodegeneration in dogs with GM1 gangliosidosis: Possible use for assessment of a therapeutic regimen. **Brain Res**, 2007.
- SATTI, H. S. et al. Autologous mesenchymal stromal cell transplantation for spinal cord injury: A Phase I pilot study. **Cytotherapy**, v. 18, n. 4, p. 518–522, 1 abr. 2016.

- SAVILLE, W. J. et al. Evaluation of risk factors associated with clinical improvement and survival of horses with equine protozoal myeloencephalitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 8, p. 1181–1185, 15 out. 2000.
- SAVILLE, W. J.; REED, S. M.; GRANSTROM, D. E. et al. Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in Ohio. **J Am Vet Med Assoc**, v. 210, p. 519–24. 1997.
- SCHIESS, R.; WOLLSCHIED, B.; AEBERSOLD, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. **Molecular Oncology**, v. 3, n. 1, p. 33–44, 2009.
- SCHREPFER, S.; DEUSE, T.; REICHENSPURNER, H.; FISCHBEIN, M. P.; ROBBINS, R. C.; PELLETIER, M. P. Stem cell transplantation: the Lung barrier. **Transplantation Proceedings**, v. 39, n. 2, p. 573–576, 2007.
- SOLE, A. et al. Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using <sup>99m</sup>Tc-HMPAO. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 5, p. 594–599, 2012.
- SONG, M.-S. et al. In vitro validation of effects of BDNF-expressing mesenchymal stem cells on neurodegeneration in primary cultured neurons of APP/PS1 mice. **Neuroscience**, v. 307, p. 37–50, 29 out. 2015.
- STELMANN, U. J. P.; AMORIM, R. M. Equine protozoal myeloencephalitis. **Veterinária e Zootecnia**, v. 17, n. 2, p. 163–176, 2010.
- STEWART, M. C. Cell-based Therapies: Current Issues and Future Directions. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 27, n. 2, p. 393–399, ago. 2011.
- STUDAHL, M.; ROSENGREN, L.; GÜNTHER, G.; HAGBERG, L. Difference in pathogenesis between herpes simplex virus type 1 encephalitis and tick-borne encephalitis demonstrated by means of cerebrospinal fluid markers of glial and neuronal destruction. **J Neurol**, 2000.
- Tillotson, K.; McCue, P. M.; Granstrom, D. E. et al Seroprevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona* in horses residing in northern Colorado. **J Equine Vet Sci**, v. 19, p. 122–126, 1999.
- TYERS, M.; MANN, M. From genomics to proteomics. **Nature**, p. 422, v. 6928, p. 193-197. 13 mar. 2003.
- UCCELLI, A. et al. Neuroprotective features of mesenchymal stem cells. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 24, n. 1, p. 59–64, mar. 2011.
- VAN GOOL, A. J.; HENDRICKSON, R. C. The proteomic toolbox for studying

- cerebrospinal fluid. **Expert Review of Proteomics**, v. 9, n. 2, p. 165–179, 9 abr. 2012.
- VAQUERO, J. et al. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? **Neuroscience Letters**, v. 398, n. 1–2, p. 129–134, 1 maio 2006.
- VAQUERO, J. et al. Repeated subarachnoid administrations of autologous mesenchymal stromal cells supported in autologous plasma improve quality of life in patients suffering incomplete spinal cord injury. **Cytotherapy**, v. 19, n. 3, p. 349–359, 1 mar. 2017.
- VERMA, A.; AMBATIPUDI, K. Challenges and opportunities of bovine milk analysis by mass spectrometry. **Clinical Proteomics**, v. 13, n. 1, 2016.
- VILLANOVA, M.; BACH, J. R. Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapy Outcomes for Three Patients with Spinal Muscular Atrophy Type 1. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 94, n. 5, p. 410–415, 21 maio 2015.
- WILSON, A. P.; THELEN, J. J.; LAKRITZ, J. et al The identification of a sequence related to apicomplexan enolase from *Sarcocystis neurona*. **Parasitol Res**, v. 94, p. 354–360, 2004.
- WITONSKY, S. G. et al. Horses Experimentally Infected with *Sarcocystis neurona* Develop Altered Immune Responses In Vitro. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 5, p. 1047–1054, out. 2008.
- YANO, S. et al. In Vivo Fluorescence Tracking of Bone Marrow Stromal Cells Transplanted into a Pneumatic Injury Model of Rat Spinal Cord. **Journal of Neurotrauma**, v. 22, n. 8, p. 907–918, ago. 2005.
- YEARGAN, M. R.; HOWE, D. K. Improved detection of equine antibodies against *Sarcocystis neurona* using polyvalent ELISAs based on the parasite SnSAG surface antigens. **Vet Parasitol**, v. 176, p 16–22, 2011.
- ZEIRA, O. et al. Adult autologous mesenchymal stem cells for the treatment of suspected non-infectious inflammatory diseases of the canine central nervous system: safety, feasibility and preliminary clinical findings. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 181, 29 dez. 2015.
- ZHANG, J. et al. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 6, n. 1, p. 234, 1 dez. 2015.
- ZHOU, W.; PETRICOIN III, E. F.; LONGO, C. Mass spectrometry-based biomarker discovery. **Methods in Molecular Biology**, v. 823, p. 251–264, 2012.