

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta Tese
será disponibilizado somente a partir
de 03/06/2021.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA
PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS**

LUCAS SANTIAGO GOMES BRASILEIRO

**BOTUCATU - SP
DEZEMBRO/2020**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA
PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS**

LUCAS SANTIAGO GOMES BRASILEIRO

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

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

BOTUCATU - SP
DEZEMBRO/2020

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

Brasileiro, Lucas Santiago Gomes.

Efeito do meio condicionado por células tronco
mesenquimais na resposta inflamatória uterina
pós-cobertura em éguas susceptíveis / Lucas Santiago Gomes
Brasileiro. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Marco Antonio Alvarenga

Capes: 50504002

1. Éguas - Doenças. 2. Endometrite. 3. Células-tronco
mesenquimais. 4. Imunomodulação. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Égua; Endometrite; Imunomodulação; Meio
condicionado.

Nome do autor: Lucas Santiago Gomes Brasileiro

Título: EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Central de Reprodução Animal LUBBREEDING – Cesário Lange/SP

Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP
- Botucatu /SP

Prof. Dr. Gustavo Henrique Marques Araujo

Membro

Universidade Federal de Jataí

Data da defesa: 03 de Dezembro de 2020.

À minha mãe Antonizete, as minhas filhas Letícia e Lívia, a minha avó Fransquinha, o meu irmão Felipe, meu Sobrinho Tito, aos familiares e amigos, muito obrigado pela força, companheirismo, apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me ajudado até aqui e me dado força para superar todos os obstáculos e dificuldades e não ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis

À minha família, em especial, minha mãe, minha vó e meu irmão pelo apoio.

Às minhas filhas, Leticia e Lívia, que apesar de tão pequenas e frágeis, foram o meu impulso para poder terminar esta empreitada.

À Ianna, pelo apoio e por cuidar das meninas e de tudo na minha ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga, pelos ensinamentos e principalmente por ter me acolhido e acreditado em meu potencial.

À UNESP – Botucatu, em especial ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os professores por terem contribuído com o meu crescimento profissional e pessoal, pela troca de experiências e convivência diária, por terem me acolhido e proporcionado quatro anos de aprendizado e muitas amizades.

A equipe de pós-graduandos do CERAN, pela convivência diária, por toda a ajuda, troca de experiências, e companheirismo em todos os momentos.

Aos funcionários, Edvaldo, Felipe e Evandro, pela amizade construída durante esta trajetória.

A central de reprodução equina EQUICENTER em especial a Médica Veterinária Rafaela Soares pelos ensinamentos e amizade e por ter aberto as portas e cedido os animais para a realização do experimento.

Aos amigos Lucas Canuto, Lorenzo, Lorena, Charolês, Humberto, Roberto Jr, Lucas Troncarelli, Sidnei, Thais, Veronica, Laiza, Eriky, Carolina Okada, Cesar Araújo, Campoamor, Giovane, Evandro, Dr Zezé, Bruno Ohta, Emanuel e Daniel o meu muito obrigado pelo companheirismo, amizade, e ajudas nos momentos acadêmicos e de lazer.

A família Mendonça em especial a Mari e dona Augustinha, pelo acolhimento e amizade que me fizeram ser parte desta família.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para que este sonho se tornasse realidade.

RESUMO

BRASILEIRO, L. S. G. EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA UTERINA PÓS-COBERTURA EM ÉGUAS SUSCEPTÍVEIS. Botucatu – SP. 2020. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

A endometrite é a principal causa de subfertilidade na espécie equina. Essa enfermidade caracteriza-se pelo acúmulo de líquido no interior do útero, influxo de células polimorfonucleares para o lúmen uterino, exacerbada expressão de mediadores pró-inflamatórios e, conseqüentemente, baixas taxas de fertilidade. Nos mamíferos em geral, logo após o contato do sêmen com o endométrio, ocorre uma resposta inflamatória a fim de eliminar espermatozoides mortos, debris celulares, plasma seminal e micro-organismos que são carreados no momento da cópula/inseminação artificial (IA). As éguas podem ser caracterizadas como resistentes ou susceptíveis a endometrites; aquelas que são resistentes possuem a capacidade de modular a resposta inflamatória uterina até 48 horas após a cobertura/IA, enquanto as susceptíveis não tem essa habilidade. Os tratamentos mais comumente utilizados para a endometrite são as lavagens uterinas, administração de drogas ecbólicas, antibióticos e anti-inflamatórios. Com o avanço de técnicas de terapia celular com capacidade de modular a resposta inflamatória, diferentes tratamentos vêm sendo estudados com resultados promissores no tratamento da endometrite em éguas. Um modulador de resposta inflamatória que vem sendo estudado e se mostra como uma possibilidade terapêutica para o tratamento de éguas com Endometrite Persistente Pós-Cobertura (EPPC) é o meio condicionado de células tronco (MC). Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo revisar os fatores relacionados a endometrite em éguas e o desenvolvimento de terapias celulares, em especial as células tronco e o meio condicionado (MC) de células tronco mesenquimais. Foram selecionadas éguas com histórico reprodutivo conhecido, classificadas como susceptíveis a EPPC. Eram realizados acompanhamentos diário por palpação retal e ultrassonografia até o momento da indução da ovulação. As éguas eram inseminadas em ciclos estrais consecutivos. Para o ciclo controle, as éguas não receberam nenhum tratamento pré IA. No ciclo tratado, 30 mL de MC foi infundido no útero das éguas 24 horas antes da IA. No momento da indução da ovulação, 6 horas e 24 horas pós IA foram realizadas coletas de material para exame bacteriológico, citológico e para dosagem das citocinas. Neste trabalho foi possível observar que tanto o crescimento de bactérias como a recuperação embrionária obtiveram resultados similares entre os grupos controle e tratado. No entanto, foi observada uma diminuição significativa na contagem de PMNs na citologia uterina 6 e 24 horas pós-

cobertura, no grupo tratado com MC ($p < 0,05$). No que diz respeito às interleucinas, observamos que para a IL-10 não houve diferenças entre os grupos controle e tratado ao longo dos tempos. Porém, o grupo controle apresentou um aumento numérico após inseminação - fato que não ocorreu no grupo tratado. Para o TNF- α também não houve diferenças entre os grupos, mas observou-se um decréscimo numérico nos tempos 6 e 24 horas no grupo tratado. No que se refere a IL-6, foi observada a diferença entre os grupos. No grupo controle houve diminuição nos tempos 6 e 24 horas em comparação ao tempo 0 hora - o que não ocorreu no grupo tratado. Com isso, podemos concluir que o MC foi efetivo na modulação da resposta inflamatória em éguas susceptíveis a EPPC.

Palavras-chave: endometrite, equinos, imunomodulação, terapia celular.

ABSTRACT

BRASILEIRO, L. S. G. EFFECT OF CONDITIONED MEDIUM OF MESENCHYMAL STEM CELLS IN THE POST-BREEDING INFLAMMATORY RESPONSE IN SUSCEPTIBLE MARES. Botucatu – SP. 2020. 108p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Endometritis is the main cause of subfertility in the equine species. This disease is characterized by the accumulation of fluid inside the uterus, influx of polymorphonuclear cells into the uterine lumen, exacerbated expression of pro-inflammatory mediators and, consequently, low fertility rates. In mammals in general, immediately after the semen's contact with the endometrium, an inflammatory response occurs in order to eliminate dead sperm, cellular debris, seminal plasma and microorganisms that are carried at the time of copulation / artificial insemination (AI). Mares can be characterized as resistant or susceptible to endometritis. Resistant mares have the ability to modulate the uterine inflammatory response up to 48 hours after coverage / AI, while susceptible mares do not have this ability. The most commonly used treatments for endometritis are uterine lavages, administration of ecboic drugs, antibiotics and anti-inflammatory drugs. With the advancement of cell therapy techniques capable of modulating the inflammatory response, different treatments have been studied with promising results in the treatment of endometritis in mares. A modulator of the inflammatory response that has been studied and shows itself as a therapeutic possibility for the treatment of mares with EPPC is the conditioned medium of stem cells (MC). Thus, the present study aimed to review factors related to endometritis in mares and the development of cell therapies, especially stem cells and the conditioned medium (CM) of mesenchymal stem cells. In the present study it was possible to observe that both the growth of bacteria and the embryonic recovery obtained similar results between the control and treated groups. However, a significant decrease in PMN count was observed in uterine cytology 6 and 24 hours post-coverage, in the group treated with MC ($p < 0.05$). Regarding to interleukins, we observed that for IL-10 there were no differences between the control and treated groups over time. However, the control group showed a numerical increase after insemination - a fact that did not occur in the control group. For TNF- α there were also no differences between the groups, but a numerical decrease was observed at times 6 and 24 hours in the treated group. With regard to IL-6, the difference between groups was observed. In the control group, there was a decrease in times 6 and 24 hours compared to time 0 hours, which did not occur in the treated group. With that, we can conclude

that the MC was effective in modulating the inflammatory response in mares susceptible to EPPC.

Keywords: endometritis, horses, immunomodulation, cell therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagens ultrassonográficas em corte transversal dos cornos uterinos em éguas: (A) Uma imagem do útero equino sem edema endometrial ou acúmulo de líquido intraluminal, tipicamente visto em éguas durante o diestro; (B) o corno uterino de uma égua em estro, caracterizado pela presença de edema e com um pouco de acúmulo de líquido, (C) Edema endométrico exacerbado com extravasamento e acúmulo de líquido intraluminal em uma égua com endometrite, e (D) Presença de edema exacerbado com pregas endometriais bem evidentes e com extenso acúmulo de fluido intraluminal com presença de pontos hiperecogênicos em uma égua com endometrite. Barras de escala de 5 mm (A-D)395

Figura 2. Imagens de cultivo de microrganismos em placas: (A) Uma imagem de crescimento negativo; (B) placa com crescimento de bactéria *Escherichia coli*, (C) placa com crescimento de bactéria *Klebsiella spp*.....37

Figura 3. Citologia endometrial em éguas coradas com coloração do tipo Papanicolaou ($\times 100$). (A) Citologia endometrial negativa; neste slide, as células do epitélio do endométrio podem ser vistas com a presença de duas células inflamatórias. (B) Citologia endometrial positiva; células do epitélio do endométrio podem ser vistas neste slide, mas, ao contrário, neutrófilos hipersegmentados estão excessivamente representados neste esfregaço. Barras de escala 50 μ m (A e B).40

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AIES - Anti-inflamatório esteroidais
- AINES - Anti-inflamatório não esteroidais
- AMPs - Peptídeos Antimicrobianos
- CL - Corpo Lúteo
- COX - ciclooxigenase
- CTMs - Célula tronco mensesquimal
- eNOS - Oxido nítrico sintase endotelial
- EPPC - Endometrite persistente pós-cobertura
- IA - Inseminação Artificial
- Ig - Imunoglobulina
- IL - Interleucina
- IL-1Ra - Antagonista do receptor de interleucina 1
- iNOS - Oxido nítrico sintase induzida
- MC - Meio condicionado por células tronco
- NF- κ B - fator nuclear kappa-B
- NK- Células Natural Killer
- nNOS - Oxido nítrico Sintase neuronal
- NO - Oxido nítrico
- NOS - Oxido nítrico Sintase
- PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
- PGE - Prostaglandina E2
- PGF₂ α - Prostaglandina F2 α
- PMNs - Polimorfonucleares
- PRP - Plasma rico em plaquetas
- RRP - Receptores de reconhecimento de padrões
- TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta
- TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

CAPITULO 1	115
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	166
2. REVISÃO DE LITERATURA	188
2.1. Endometrite Persistente Pós Cobertura – EPPC.....	188
2.1.1. Endometrite infecciosa.....	21
2.1.2. Líquido endometrial	23
2.2. Mecanismos de defesa uterina.....	23
2.2.1. Barreiras Físicas.....	23
2.2.2. Contrações uterinas.....	244
2.2.3. Inflamação local.....	266
2.2.4. Imunidade adaptativa	33
2.3. Efeitos do Plasma Seminal.....	355
2.4. Métodos de Avaliação da Condição Uterina.....	388
2.4.1. Avaliação ultrassonográfica.....	388
2.4.2. Avaliação Bacteriológica.....	40
2.4.3. Avaliação Citológica	41
2.5. Terapias de suporte aplicadas a EPPC	444
2.5.1. Medicamentos ecbólicos	444
2.5.2. Lavagem Uterina	466
2.5.3. Anti-Inflamatórios não Esteroidais	477
2.6. Terapias Imunomoduladoras aplicadas a EPPC	488
2.6.1 Anti-Inflamatórios Esteroidais (AIES).....	488
2.6.2. Lactoferrina.....	499
2.6.3. Plasma Rico em Plaquetas – PRP	50
2.6.4. Células Tronco Mesenquimais - CTMs.....	52
2.6.5. Meio Condicionado por Células Tronco – MC	555
3. REFERÊNCIAS.....	588
4. HIPÓTESE	8282
5. OBJETIVO	82
CAPITULO 2	83

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na espécie equina, as éguas normalmente atingem seu maior valor econômico através de seu desempenho atlético, e, posteriormente, através do destaque da sua prole. Isso, na maioria das vezes, ocorre quando já estão em idade avançada e, devido a esse avanço na idade, ocorre um declínio da capacidade reprodutiva e de seus índices de fertilidade. Pelo fato de as proles possuírem altos valores agregados, essas éguas permanecem por longos anos em programas de reprodução assistida, mesmo com índices baixos de fertilidade (CARNEVALE, 2008). A busca para se obter um maior número de descendentes gera um grande desafio para os profissionais médicos veterinários que trabalham com programas de reprodução assistida de equinos (SEGABINAZZI, 2016).

Mesmo com diversos estudos envolvendo a reprodução equina nos últimos anos, especialmente nas áreas de biotecnologias, os problemas reprodutivos de origem uterina ainda são causas de grandes prejuízos econômicos, nas taxas de concepção, nos números de serviços por concepção e sobrevivência embrionária (FIORATTI, 2010). Alvarenga et al. (2009), estimam que 30% das éguas que estão em programas de reprodução assistida possuem mais de 18 anos de idade.

Com a deposição do sêmen no útero da égua ocorre um processo inflamatório fisiológico e transitório, que tem por finalidade fazer a limpeza uterina retirando o excesso de espermatozoides e outros contaminantes que, eventualmente, tenham sido depositados junto com o sêmen.

Fêmeas que persistem com essa inflamação por mais de 48 horas após a cobertura são animais que desenvolvem uma endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) e irão apresentar falha no processo de limpeza uterina, acumulando líquido intrauterino associado a uma reação inflamatória exacerbada e persistente. Assim, irão apresentar uma queda na taxa de fertilidade e incompatibilidade no desenvolvimento embrionário (TROEDSSON, 1999). De acordo com Leblanc (2003), esta enfermidade acomete principalmente éguas multíparas com idade superior a 14 anos. Normalmente possuem um útero pendular devido ao relaxamento dos ligamentos uterinos e alterações

cervicais associadas a uma deficiência nas contrações uterinas, o que dificulta a limpeza uterina e predispõe ao aparecimento da EPPC (SEGABINAZZI, 2016).

Diante das consequências da etiologia e patogenia associada a EPPC, essa enfermidade tem grande importância nos programas de reprodução assistida, porque traz grandes impactos econômicos negativos, o que faz dessa doença a principal causa de subfertilidade em éguas (TROEDSSON, 1999).

A maior parte dos tratamentos utilizados na EPPC são consideradas de suporte, não atuando diretamente na causa da inflamação, mas apenas auxiliando na limpeza e manutenção do ambiente uterino (SEGABINAZZI, 2016).

É crescente o número de estudos, nos quais se utilizam os agentes imunomoduladores em terapias para a EPPC. Os imunomoduladores possuem a capacidade de atuar sobre os mediadores inflamatórios, diminuindo a resposta exacerbada e persistente da inflamação e melhorando, assim, os índices de fertilidade (JOHNSON et al., 2002).

Alguns agentes imunomoduladores têm sido utilizados com sucesso no tratamento da EPPC, como o uso de células tronco mesenquimais (CTMs) e o plasma rico em plaquetas (PRP). Um modulador de resposta inflamatória que vem sendo estudado e se apresenta como uma possibilidade terapêutica para o tratamento de éguas com EPPC é o meio condicionado de células tronco (MC). O MC é extraído a partir do cultivo de células tronco mesenquimais, o que o torna rico em fatores pré e pró-inflamatórios, que são liberados no desenvolvimento das células. O MC também possui ação na reparação tecidual e no controle do estresse oxidativo, agindo diretamente na modulação e reparação tecidual do endométrio (AHMADI et al., 2017; REGHINI et al., 2016).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação do meio condicionado de células tronco na modulação da resposta inflamatória uterina de éguas com EPPC.

379

380

381 **5 CONCLUSÃO**

382 Conclui-se que o meio condicionado de células tronco mesenquimais
383 não foi eficiente na eliminação da infecção bacteriana intrauterina. Todavia, o
384 MC conseguiu modular a resposta inflamatória pós-cobertura em éguas
385 susceptíveis, diminuindo a migração de PMNs para o lúmen uterino e, além de
386 interferir nas concentrações uterinas das interleucinas estudadas. No entanto,
387 para fertilidade, o MC não influenciou na taxa de prenhez entre os
388 grupos estudados.

389

390 **6 REFERÊNCIAS**

391 AHMADI M.; RAHBARGHAZI R.; ASLANI M.R.; SHAHBAZFAR A.A.; KAZEMI
392 M.; KEYHANMANESH R. Bone marrow mesenchymal stem cells and their
393 conditioned media could potentially ameliorate ovalbumin-induced asthmatic
394 changes. **Biomed Pharmacother** 2017; 85:28–40.
395 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.127>.
396 ALVARENGA, M. A., IWANA DE MATTOS, M.C. Utilização da escova
397 ginecológica cytobrush na coleta de material endometrial de éguas. Arq. Bras.
398 Med. Vet. Zootec., v.42, p.67-8, 1990.

399

400

401

402

403

- 404 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. The effect of uterine lavage
 405 performed four hours post insemination on pregnancy rate in mares.
 406 Theriogenology 1991, 35, 1111–1119.
- 407 BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D. Endometritis in mares. Large Anim. Vet. Rounds,
 408 v. 3, n. 3, 2003. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/](https://www.researchgate.net/publication/213858523_Endometritis_in_mares)
 409 213858523_Endometritis_in_mares>. Acesso em: 29 nov. 2015.
- 410 BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of
 411 dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of
 412 persistent mating induced endometritis. Theriogenology. 2008; 70: 1093-1100.
- 413 BUSSCHE, L; VAN DE WALLE, G.R. Peripheral Blood-Derived Mesenchymal
 414 Stromal Cells Promote Angiogenesis via Paracrine Stimulation of Vascular
 415 Endothelial Growth Factor Secretion in the Equine Model. **Stem Cells**
 416 **Translational Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1514-1525, 2014.
- 417 CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares.
 418 **Theriogenology**, v. 64, p. 580-588, 2005.
- 419 CARRADE DD, LAME MW, KENT MS, CLARK KC, WALKER NJ, BORJESSON
 420 DL. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-
 421 Derived Mesenchymal Stem Cells 1. **Cell Med** 2012;4:1–11.
 422 <https://doi.org/10.3727/215517912X647217>.
- 423 CHEN L, TREDGET EE, WU PYG, WU YYG. Paracrine Factors of Mesenchymal
 424 Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance
 425 Wound Healing. PLoS One [Internet]. 2008 [cited 2019 Mar 10];3(4):1886.
 426 Available from: www.plosone.org
- 427 CHRISTOFFERSEN, M.; WOODWARD, E. M.; BOJESSEN, A.M.; PETERSEN,
 428 M. R.; SQUIRES, E. L.; LEHN-JENSEN, H.; TROEDSSON, M. H. T. Effect of

immunomodulatory therapy on the endometrial inflammatory response to induced infectious endometritis in susceptible mares. **Theriogenology**. 2012; 78:991–1004.

CHRISTOFFERSEN M, WOODWARD E, BOJESEN AM, JACOBSEN S, PETERSEN MR, TROEDSSON MHT, et al. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. **BMC Vet Res** 2012; 8:41. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-41>.

CORRADETTI B, CORREANI A, ROMALDINI A, MARINI MG, BIZZARO D, PERRINI C, et al. Amniotic Membrane-Derived Mesenchymal Cells and Their Conditioned Media: Potential Candidates for Uterine Regenerative Therapy in the Horse. Asselin E, editor. PLoS One [Internet]. 2014 Oct 31 [cited 2019 Mar 10];9(10):e111324. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111324>

DELL' AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2006; 94: 270–3.

FERRIS RA, FRISBIE DD, MCCUE PM. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 2014; 82:36–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>.

FIORATTI E. G. **Estudo das catelicidinas no plasma seminal de garanhões e das interleucinas na resposta inflamatória pós-inseminação artificial em éguas**. Botucatu, 2013. 111p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina

- 453 Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
454 Filho”.
- 455 FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**, 5
456 Ed. Wiley Liss; New York. p. 256, 2005.
- 457 FRISO, A. M.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; CYRINO, M.; CORREAL, S. B.;
458 FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; DO CARMO, M. T.; DELL'AQUA JR., J. A.; MIRÓ,
459 J.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Periovarian administration of firocoxib did
460 not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in
461 mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24-30, 2019.
- 462 FUMUSO, E.; GIGUÈRE, S.; WADE, J.; ROGAN, D.; VIDELA-DORNA, I.;
463 BOWDEN, R. A. endometrial IL-1 β , IL-6 and TNF- α , mRNA expression in mares
464 resistant or susceptible to post-breeding endometritis effects of estrous cycle,
465 artificial insemination and immunomodulation. *Veterinary Immunology and*
466 *Immunopathology*, v. 96, p. 31-41, 2003.
- 467 GUGJOO MB, AMARPAL, MAKHDOOMI DM, SHARMA GT. Equine
468 Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential
469 Therapeutic Applications. **J Equine Vet Sci** 2019; 72:16–27.
470 <https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2018.10.007>.
- 471 HAARER, J. et al. Caveats of mesenchymal stem cell therapy in solid organ
472 transplantation. *Transplant International*, v. 28, n. 1, p. 1-9, 2015. Acessado em:
473 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25082213>
- 474 JOHNSON PJ, SLIGHT SH, GANJAM VK, KREEGER JM. Glucocorticoids and
475 laminitis in the horse. **Vet Clin North Am Equine Pract** 2002; 18:219–36.
476 [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00015-9](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00015-9).
- 477 JULIE AUDET. Fetal Stem Cells in Regenerative Medicine. 2009; 482:440.

- 478 KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the
479 equine uterus. **Theriogenology** 1994, 41, 629–636.
- 480 LANGE-CONSIGLIO, A.; ROSSI, D.; TASSAN, S.; PEREGO, R.; CREMONESI,
481 F.; PAROLINI, O. Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived
482 Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity In Vitro and First Clinical
483 Application in Tendon and Ligament Injuries In Vivo. *Stem Cells Dev* [Internet].
484 2013; 22 (22):3015–24. Available from:
485 <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2013.0214>
- 486 LEBLANC, M. M. Persistent mating-induced endometritis. In: Robinson, N.E.
487 Current therapy in equine medicine. 5. ed. St. Louis: Elsevier Science, 2003. p.
488 234-237.
- 489 MAGUIRE, G. Stem cell therapy without the cells. *Communicative & Integrative*
490 *Biology*, v. 6, n. 6, p. e 26631, 2013.
- 491 MAIA L, DIAS MC, MORAES CN DE, AQUA CDPF, SILVEIRA LSL. Conditioned
492 medium : a new alternative for cryopreservation of equine umbilical cord
493 mesenchymal stem cells. 2017; 41: 239–48.
- 494 MAMBELLI, L.I.; WINTER, G.H.Z.; KERKIS, A.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS,
495 R.C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the
496 uterus of mares with endometrosis. **Theriogenology**. 2013, 79, 744–750.
- 497 MENDONÇA, V. H. **Variação da concentração de marcadores inflamatórios**
498 **em lavados uterinos de éguas com endometrite naturalmente acometida.**
499 2016. (TESE) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina
500 Veterinária, Araçatuba, 2012.
- 501 METCALF, E. S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid
502 and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced

503 Endometritis (PMIE). **J. Equine Vet. Sci.** [Internet]. 2014; 34(1):128. Available
 504 from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080613007211>

505 METCALF, E.S.; SCOGGIN, K.; TROEDSSON, M.H.T. The effect of platelet-rich
 506 plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following
 507 semen deposition. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar. v. 32. n.8.
 508 p.498. Aug. 2012.

509 PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.;
 510 SOARES, Z. F.; LOPES, M. D. Use of corticosteroid therapy on the modulation
 511 of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen
 512 semen. *Pferdeheilkunde*. 2008; 24: 79-82.

513 PAWITAN JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative
 514 medicine. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014 Aug 28 [cited 2019 Mar 10];
 515 2014:965849. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530971>

516 PAVÃO, G.D. Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para
 517 tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa. 99f. Tese –
 518 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual
 519 Paulista, 2013.

520 PINHEIRO J, BATES D, DEBROY S, SARKAR D, R Core Team (2020). *_nlme:*
 521 *Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_*. R package version 3.1-148,
 522 <URL:<https://CRAN.R-project.org/package=nlme>>.

523 REGHINI FM, RAMIRES C, SEGABINAZZI LG, MANOELA M, CHAVES BC,
 524 PAULA C DE, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis
 525 mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology* 2016; 86:516–22.
 526 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>.

527 REGHINI, M.F.S. **Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em**
 528 **éguas resistentes e suscetíveis à endometrites persistente após**
 529 **inseminação natural**, 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Medicina
 530 Veterinária). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP),
 531 Botucatu, São Paulo, 2013.

532 REGHINI F.M.; RAMIRES C.; SEGABINAZZI L.G.; MANOELA M.; CHAVES
 533 B.C.; PAULA C De, et al. Inflammatory response in chronic degenerative
 534 endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology** 2016;
 535 86:516–22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.029>.

536 SEGABINAZZI, L. G.; FRISO, A. M.; CORREAL, S. B.; CRESPILO, A. M.;
 537 DELL'AQUA, J. A.; MIRÓ, J. et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte
 538 migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible
 539 mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*
 540 [Internet]. 2017; 104:120–6. Available from:
 541 <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.007>

542 SEGABINAZZI, L. G. T. M. **Efeito do plasma rico em plaquetas pré ou pós-**
 543 **inseminação artificial sobre a resposta inflamatória e índice de fertilidade**
 544 **em éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura**. Botucatu,
 545 2016. 67p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e
 546 Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

547 SHEN C, LIE P, MIAO T, YU M, LU Q, FENG T, et al. Conditioned medium from
 548 umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol*
 549 *Med Rep*. 2015; 12(1):20–30.

550 TONGU, E. A. O. **Efeito da adição de meio condicionado por células tronco**
 551 **mesenquimais na viabilidade espermática e resposta inflamatória uterina**

552 **pós inseminação artificial em equinos.** Botucatu, 2019. 41p. Dissertação
553 (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade
554 Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

555 TRAUB-DARGATZ, J.L.; SALMAN, M.D.; VOSS, J.L. Medical problems of adult
556 horses, as ranked by equine practitioners. Journal of American Veterinary
557 Association. v.198 p.1745-1747. 1991.

558 TROEDSSON, M. H. T. Uterine defense mechanisms in the mare. **Arch. Std/Hiv**
559 **Res.**, v. 8, p. 259-269, 1994.

560 TROEDSSON, M.H.T; LIU, I.K.M.; CRABO, B.G. Sperm transport and survival in
561 the mare: a review. Theriogenology, v.50. p. 807-818, 1998.

562 TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent
563 endometritis in the mare. Theriogenology, 1999; v.52 p.461–471.
564 [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00143-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00143-0)
565
566
567
568
569
570