

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VESÍCULAS EXTRACELULARES E MEIO CONDICIONADO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E SEU POTENCIAL
IMUNOMODULADOR EM EXPLANTES ENDOMETRIAIS
BOVINOS**

CARLA MARTINS DE QUEIROZ

Botucatu-SP
Dezembro/2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VESÍCULAS EXTRACELULARES E MEIO CONDICIONADO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E SEU POTENCIAL
IMUNOMODULADOR EM EXPLANTES ENDOMETRIAIS
BOVINOS**

CARLA MARTINS DE QUEIROZ

Tese apresentada junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu submetida ao programa de Biotecnologia Animal para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu - SP
Dezembro/2017

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

Queiroz, Carla Martins de.

Vesículas extracelulares e meio condicionado de células tronco mesenquimais e seu potencial imunomodulador em explantes endometriais bovinos / Carla Martins de Queiroz. - Botucatu, 2017

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

Orientador: João Carlos Pinheiro Ferreira

Capes: 50504002

1. Exossomos. 2. Vesículas extracelulares - Inflamação. 3. Biotecnologia. 4. Célula tronco mesenquimal. 5. Bovinos.

Palavras-chave: biotecnologia; exossomos; inflamação; microvesículas.

Nome do autor: Carla Martins de Queiroz

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP, Botucatu-SP

Dr. Leandro Maia

Membro

Divisão de Vigilância Sanitária

Secretaria de Saúde de Botucatu – SP

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros

Membro

Departamento de Veterinária e Produção Animal

UENP, Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes – PR

Data da Defesa: 20 de dezembro de 2017.

Epígrafe

*“Eu quero(...)
a leve palha de um pequeno sonho.
Quero o que antes da vida
foi o profundo sono das espécies,
a graça de um estado.
Semente.
Muito mais que raízes.”*

Adélia Prado

Dedico este trabalho a todos os animais.

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão por esses anos de evolução pessoal e profissional é tão imenso, que não caberia neste espaço. Um ciclo se encerra para que um novo se inicie.

Sem Deus, tão presente em suas delicadezas diárias, não seria possível chegar até aqui.

Agradeço ao Pedro Orlandini, sócio fundador da família Orlandini-Queiroz, essencial com seu companheirismo, paciência e carinho. Chegar mais longe é tão leve quando existe alguém ao nosso lado fornecendo tanto apoio.

Agradeço meus pais, Manoel e Nelci, fonte de amor incondicional, apoio, doação, sacrifício e fé na vida. A eles honra e gratidão. À minha irmã Manuela, pela torcida e carinho. Agradeço a todos os meus familiares que torceram sinceramente pelo meu sucesso.

Ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira pela oportunidade e orientação, pela confiança no meu trabalho, por sua acessibilidade, humanidade e amizade. Agradeço por nossos caminhos terem se cruzado.

À professora Fernanda Landim pela ajuda intelectual, por ter abraçado nossa ideia, pelas portas abertas de seu laboratório e por sua generosidade.

Agradeço ao professor Wellerson Scarano do departamento de Morfologia do IB pela ajuda com as análises de Western Blot e pela disponibilidade em ajudar.

À professora Giuseppina Lima do departamentoto de Química e Bioquímica do IB pelas liofilizações.

À Camila Dell'Aqua pela ajuda nas citometrias.

Aos técnicos da microscopia eletrônica, dentre eles Shelly Carvalho pelo processamento das amostras.

Aos técnicos da Unipex, em especial à Ana Paula Doria pela ajuda nas centrifugações.

À Valquíria Santiloni pelas análises de citogenética.

À Graziela Romagnoli pelas dicas e conversas sobre exossomos.

À Fabiana Ferreira de Souza, pela ajuda nas dosagens de proteínas quando precisei.

À professora Renee Laufer Amorim pelas portas abertas de seu laboratório e a Carlos Eduardo Alves pela ajuda nas análises imunistoquímicas e estatística.

Ao professor Rogério Antonio Oliveira, pela ajuda estatística.

À professora Elizabeth Schmidt pela disponibilidade em ajudar sempre.

Agradeço imensamente a todos que me ajudaram nas demais etapas experimentais da pesquisa: Carolina Nogueira de Moraes Maia, Leandro Maia, Tatícia Ikeda, Bruna De Vita, Bruna Rett, Letícia Sene, Elaine Galhardo, Josiane Lourenção, Caroline Scott.

Agradeço aos demais professores, residentes e funcionários do Departamento de Reprodução Animal, da FMVZ, e funcionários da sessão de pós graduação.

À Fazenda Marino em Avaré, ao Marino e ao Cristiano, pela concessão dos animais para obtenção de tecido adiposo dos bovinos.

Ao frigorífico Fribordogue e à veterinária Ana Beatriz pela concessão dos úteros para o experimento. Ao frigorífico Mondeli e ao veterinário Marcos pela concessão dos úteros para os testes preliminares.

Aos animais, sem os quais não seria possível a realização do projeto, e não faria sentido a profissão.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a amizade de todos que fizeram parte desses anos, com quem tive a alegria de dividir um pouquinho da Vida. Seria injusto citar apenas alguns nomes, cada um sabe o quanto é especial. Alguns foram como minha família aqui.

A todos os professores que já passaram pela minha história, a todos os amigos que também já ensinaram tanto.

Essa conquista não é só minha, foi feita a muitas mãos!

A todos, meu sincero AGRADECIMENTO!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução	2
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1 Células tronco mesenquimais.....	4
2.2 Células tronco mesenquimais de tecido adiposo	7
2.3 Meio condicionado	9
2.4 Vesículas extracelulares	11
2.5 Endometrite em bovinos.....	15
2.5.1 Prostaglandina.....	17
2.5.2 Apoptose no endométrio	20
2.5.3 Cascata de inflamação na endometrite.....	21
2.5.4 Avaliação histológica na endometrite.....	22
3. Objetivo geral	22
3.1 Objetivo específico.....	23
3.2 Hipóteses	23
4. Referências.....	25
CAPÍTULO II	46
Artigo 1	47
CAPÍTULO III	65
Artigo 2	66
CAPÍTULO IV	89
5. Considerações Finais	90

RESUMO

QUEIROZ, C.M. **Vesículas Extracelulares e Meio Condicionado de Células Tronco Mesenquimais e Seu Potencial Imunomodulador em Explantes Endometriais Bovinos** - Botucatu, 2017, 90f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Palavras-chave: exossomos, microvesículas, inflamação, biotecnologia.

O presente estudo teve como objetivo isolar, cultivar e caracterizar as células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) bovino, obtenção de vesículas extracelulares e meio condicionado do cultivo celular (MC) e avaliação do seu potencial imunomodulador em cultivo de explantes endometriais bovinos. Para isso, as CTM-TA foram coletadas (n=3) de tecido adiposo e sofreram isolamento, processamento e cultivo. As amostras foram submetidas à análise citogenética, imunofenotípica (CD44, CD29, vimentina, CD34 e MHCII), de viabilidade e de diferenciação (adipogênica, osteogênica e condrogênica), e então criopreservadas. Após descongelamento e expansão, o meio condicionado do cultivo celular foi submetido à ultracentrifugações para obtenção das vesículas extracelulares que foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e Western Blot (Alix e CD9). Explantes de endométrios bovinos (n=7) provenientes de abatedouro foram submetidos a cultivo e desafio com LPS (3µg/mL) por 48 horas. Os grupos experimentais foram CN (controle negativo, sem desafio com LPS), CP (controle positivo, apenas desafio com LPS), V (desafio com LPS e adição de vesículas extracelulares) e MC (desafio com LPS e adição de meio condicionado). Avaliou-se secreção de PGF2α e IL-1β por Elisa, morfologia do tecido através de histopatologia, expressão tecidual de Fas-L, TLR-4, PGDH e PGF2α-R por Imunoistoquímica. No cultivo celular das CTM-TA foi obtida uma população celular homogênea e fibroblastóide, com aderência ao plástico, expressando baixos níveis de CD34 e MHCII, e altos níveis de CD29, CD44 e vimentina. As células foram cromossomicamente estáveis, com boa viabilidade antes e após congelamento, e secretaram vesículas de aproximadamente 10 a 200nm de

diâmetro, positivas para Alix e CD9 no Western Blot indicando a presença de exossomos (Exos) em uma população mista VEs. Não houve efeito de tratamento para secreção de PGF2 α e IL-1 β , nem na imunomarcação de TLR-4, Fas-L, PGDH e PGF2 α -R. Houve mudanças morfológicas como hipertrofia, atrofia e hiperplasia celular, bem como dilatação do lúmen glandular, independente do tratamento. Houve diminuição na densidade das glândulas após cultivo, devido à inflamação. Conclui-se que foi possível isolar, cultivar, caracterizar e criopreservar CTM-TA de bovinos, e estas células secretam VEs no meio condicionado de cultivo. Contudo, os achados apontam para inflamação no modelo *in vitro* de cultivo que se sobrepôs aos efeitos inflamatórios do desafio com LPS. Ademais, os tratamentos com V ou MC não resultaram em efeito imunomodulatório.

ABSTRACT

QUEIROZ, C.M. **Extracellular Vesicles and Conditioned Medium from Mesenchymal Stem Cells and its Immunomodulatory Potential in Bovine Endometrial Explants** - Botucatu, 2017, 90f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”.

Keywords: exosomes, microvesicles, inflammation, biotechnology.

The present study aimed to isolate, culture and characterize bovine adipose tissue mesenchymal stem cells (AT-MSC) and obtain extracellular vesicles (EVs) and conditioned medium (CM) from the cell culture in order to evaluate its *in vitro* immunomodulatory potential in bovine endometrial explants. For this, adipose tissue were collected (n=3) and underwent isolation, processing and culture. The samples were submitted to cytogenetic, immunophenotypic characterization (CD44, CD29, vimentin, CD34 and MHCII), viability and differentiation (adipogenic, osteogenic and chondrogenic), and then cryopreserved. After thawing and expansion, the CM of the cell culture was subjected to ultracentrifugation to obtain the EVs that were characterized by electron microscopy and Western Blot (Alix and CD9). Bovine endometrium from slaughterhouse (n=7) were cultured and challenged with LPS. The experimental groups were CN (negative control, no challenge with LPS), CP (positive control, challenge with LPS), V (challenge with LPS and addition of EVs) and MC (challenge with LPS and addition of CM). PGF2 α and IL-1 β secretion was evaluated by Elisa, tissue morphology and Fas-L, TLR-4, PGDH and PGF2 α -R protein expression by Immunohistochemistry. A monolayer with fibroblastoid cell population having plastic adherence, expressing low levels of CD34 and MHCII, and high levels of CD29, CD44 and vimentin was obtained in CTM-TA cell culture. The cells were chromosomally stable, with good viability before and after cryopreservation, and secreted EVs of approximately 10 to 200 nm in diameter, positive for Alix and CD9 in Western Blot indicating the presence of exosomes (Exos) in a mixed EVs population. There was no treatment effect for PGF2 α and IL-1 β secretion, nor in the immunolabeling of TLR-4, Fas-L, PGDH and PGF2 α -R. There were morphological changes such

as hypertrophy, atrophy and cellular hyperplasia, as well as dilation of the glandular lumen, regardless of the treatment. There was a decrease in the density of the glands after culture due to inflammation. It was concluded that it is possible to isolate, culture, characterize and cryopreserve CTM-TA from bovines, and these cells secrete EVs in CM. However, the findings point to inflammation in the *in vitro* culture model that overlapped the inflammatory effects of LPS challenge. In addition, the treatments with EVs or CM did not result in immunomodulatory effect.

LISTA DE ABREVIATURA

AA – Ácido aracdônico
AN – Anexina
BSA – Bovine serum albumins
CA – Corpos apoptóticos
CD – Cluster of differentiation
COX-2 – Cicloxigenase 2
CTM – Células tronco mesenquimais
CTM-TA - Células tronco mesenquimais de tecido adiposo
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
E. coli – *Escherichia coli*
Exos – Exossomos
FADD – Fas-associated death domain
FITC - Conjugação de isotocianato de flouoresceína
H&E – Hematoxilina e Eosina
Hsc – Heat shock cognate
IL – Interleucina
IP – Iodeto de propídio
IV – Intravenoso
LPS – Lipopolissacarídeo
MC – Meio condicionado
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MHC - Major histocompatibility complex
MVs – Microvesículas
P2 – Segunda passagem
PAMPS – Padrões moleculares associados a patógenos
PGDH – 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase
PGF2 α – Prostaglandina F2 alfa
PRR – Receptores de reconhecimento de padrões
RNAm – RNA mensageiro

SFB – Soro fetal bovino

TLR – Receptores do tipo Toll

TNF α – Fator de necrose tumoral

Tris – Tris Hidroximetil Aminometano

TSG - Tumor susceptibility gene

VEs – Vesículas extracelulares

CAPÍTULO I

1. Introdução

As células tronco mesenquimais (CTM) podem ser isoladas de vários tecidos adultos como tecido adiposo e medula óssea. Ao cultivo celular, elas mantêm sua capacidade de crescimento e possuem propriedades interessantes para potencial terapêutico (INT ANKER et al., 2003; CHAMBERLAIN et al., 2007)

As CTM atuam predominantemente através de mecanismos parácrinos (DEN HAAN, et al., 2012; VANKOPPEN et al., 2012), como secreção de vesículas extracelulares (VEs) e fatores solúveis. As VEs compreendem os exossomos e as microvesículas que possuem potencial para mediar comunicação entre células, envolver-se em processos como angiogênese, proliferação celular, diferenciação celular, resposta ao estresse e resposta imunológica (DE JONG et al., 2014). Informações do secretoma de CTM apontam que fatores solúveis, como fatores de crescimento e hormônios, também provêm grande contribuição para atividade parácrina, principalmente em condições imunológicas (SKALNIKOVA et al., 2011; LAVOIE et al., 2013).

Devido sua habilidade de expansão e diferenciação (GIMBLE e GUILAK, 2003), o tecido adiposo é uma fonte promissora de células tronco com aplicabilidade terapêutica regenerativa (ZUK et al., 2002). Além disso esta fonte de tecido possui acesso fácil e demanda procedimento cirúrgico simples (CASTEILLA et al., 2005; OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006). Ademais, o tecido adiposo pode ser obtido repetidamente em grandes quantidades sob anestesia local promovendo desconforto mínimo (SCHÄFFLER e BUCHLER, 2007).

A endometrite é altamente prevalente em vacas, principalmente no pós parto (Sheldon et al., 2002). O endométrio que provê barreira contra infecção bacteriana e a resposta inflamatória acentuada leva a perdas econômicas na bovinocultura pela diminuição da fertilidade e produção (GILBERT et al., 2005).

Novas terapias que modulem a defesa natural do útero têm sido sugeridas como tratamento alternativo a antibióticos e hormônios, por vezes abordagens ineficazes e antieconômicas (HUSSAIN E DANIEL, 1991). Além disso, o uso de sistemas *in vitro* de estudo da endometrite possuem situações bem controladas (ZERBE et al., 2003).

Com base no exposto, o presente estudo tem como objetivo isolar, cultivar e caracterizar as células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino, obter vesículas extracelulares (VEs) e meio condicionado do cultivo celular (MC) e avaliar seu potencial imunomodulador em cultivo de explantes endometriais bovinos *in vitro*. Pouco ainda se sabe sobre a atividade isolada das vesículas extracelulares e meio condicionado de células tronco bovinas e seus potenciais terapêuticos nas células endometriais, o que endossa o tema proposto

2. Revisão de Literatura

2.1. Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais (CTM), também chamadas de estromais, são um grupo heterogêneo de células tronco adultas não hematopoiéticas, capazes de ser isoladas de tecidos adultos como tecido adiposo, medula óssea, fluido amniótico, anexos fetais, periósteo, cérebro e fígado. Embora não sejam imortais, estas células possuem alto potencial de expansão em cultivo mantendo sua capacidade de crescimento. As propriedades das CTM lhes concedem grande potencial terapêutico e vêm sendo usadas amplamente em contextos clínicos (NAKAHARA et al., 1991; IN'T ANKER et al., 2003; CHAMBERLAIN et al., 2007; NAJIMI et al., 2007; KANG et al., 2010).

Células tronco mesenquimais foram descritas primeiramente em cobaias (*Cavia porcellus*) por Friedenstein et al. (1974). Eles depositaram medula óssea em placas de cultivo e após algumas horas removeram as células não aderentes, descartando portanto a maioria das células hematopoiéticas. As células restantes possuíam alta clonicidade e morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico. Também foi observado potencial para diferenciação *in vivo*.

Como as células somáticas possuem meia vida, sugere-se que sua morte deve ser seguida de sua substituição. Desta forma, as CTM seriam a fonte natural destas novas células de substituição no organismo (CAPLAN, 2005; CAPLAN, 2009). Contudo, as CTM possuem potencial de diferenciação limitado em comparação às células tronco embrionárias. Mecanismos imunomoduladores e parácrinos estão entre seus principais efeitos terapêuticos (CAPLAN, 2009). Não foram relatados casos de reação adversa em infusões intravasculares (GAO et al., 2001). Isso se deve ao fato de que nas terapias celulares as CTM não possuem função primária de substituição de tecido mesenquimal, mas sim favorecem um microambiente de regeneração e diminuem os efeitos inflamatórios (CAPLAN, 2009).

Hofstetter et al. (2002) injetaram CTM na coluna espinhal de ratos com paraplegia uma semana após a lesão. Eles observaram que as CTM estavam estreitamente relacionadas com a regeneração da medula espinhal,

promovendo recuperação. O efeito benéfico das CTM nos sítios de lesão podem não necessariamente envolver diferenciação no tipo de tecido lesionado mas sim a produção local de fator de crescimento e outros fatores capazes de guiar a regeneração do próprio tecido (HOFSTETTER et al., 2002).

Isso ocorre porque as CTM secretam moléculas bioativas que inibem a apoptose e limitam a área de dano da lesão, inibem fibrose, estimulam angiogênese, trazem novo suprimento sanguíneo e estimulam a mitose de progenitores específicos e intrínsecos ao tecido. As CTM também secretam agentes imunomodulatórios, inibem processos inflamatórios crônicos e células T, e podem ser efetivas terapeuticamente (CAPLAN E DENIS, 2006; CHAMBERLAIN et al., 2007; MEIRELLES et al., 2008; CAPLAN, 2009).

Sugere-se que as CTM poderiam, portanto, ser utilizadas como células alogênicas universais que funcionariam em qualquer organismo, já que elas não provocam resposta alo-reativa devido sua capacidade de imunomodulação. Para suportar esta hipótese, já foi documentado que as CTM cultivadas e expandidas não possuem marcadores de superfície para MHC classe II e nenhuma molécula co-estimuladora (LE BLANK et al., 2003).

Os registros de reações adversas em usos clínicos realizados com CTM de medula óssea autóloga ou alogênica em humanos são escassos (Caplan et al., 2009). Revisão sistemática e metanálise de dados de testes clínicos em humanos já foram realizadas e revelaram segurança satisfatória da terapia (LALU et al., 2012).

Apesar de grande parte das CTM ficarem retidas nos pulmões após entrarem na circulação venosa, evidências mostram que as células são capazes de migrar para o tecido lesado após aplicação intravenosa (IV; CHEN et al., 2001). Um estudo mostrou que, após o transplante IV de CTM em ratos com rejeição de alo-enxerto cardíaco, as células migraram vigorosamente para os sítios de rejeição (WU et al., 2003). Esta habilidade de migrar da circulação para tecidos se dá em resposta a sinais regulados sob condições de injúria. Os mecanismos prováveis envolvem quimiocinas e seus receptores (CHAMBERLAIN et al., 2007).

Com o objetivo de caracterizar as CTM humanas de modo uniforme e para facilitar a comparação entre grupos de pesquisa, o Comitê de Células

Tronco Teciduais e Mesenquimais da Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs um mínimo de quatro critérios:

1. CTM devem ser aderentes ao plástico quando mantidas sob condições padrões de cultivo
2. CTM devem possuir a habilidade de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica
3. CTM devem expressar CD73, CD90, CD105
4. CTM não podem expressar marcadores da linhagem hematopoiética c-kit como CD14, CD11b, CD34, CD19, CD79, e antígeno leucocitário humano (HLA)-DR (SCHAFFLER e BÜCHLER, 2007)

De modo geral, o fenótipo imune das CTM (amplamente descrito como MHC I⁺, MHC II⁻, CD 40⁻, CD 80⁻, CD 86⁻) tem relação com sua característica não imunogênica e, desta forma, o transplante em hospedeiro alogênico não necessita de imunossupressão. MHC classe I presente pode ativar as células T, porém na ausência de substâncias co-estimuladoras um sinal secundário não acontece, deixando as células T anérgicas (JAVAZON et al., 2004).

CTM de outras espécies podem não expressar as mesmas moléculas que as células humanas. Em geral, é aceito que todas CTM são desprovidas de marcadores hematopoiéticos CD45 e marcador de células endoteliais CD31, por exemplo. Ademais, é importante notar que a expressão de marcadores de superfície celular pode ser influenciada por fatores secretados por células acessórias em passagens iniciais e, por isso, a expressão *in vitro* de alguns marcadores de CTM nem sempre se correlaciona com seu padrão de expressão *in vivo* (GRONTHOS et al., 2001). Outras variáveis na expressão dos marcadores incluem variação na fonte de tecido e método de isolamento (BADOO et al., 2003; JAVAZON et al., 2004).

Além da identificação das CTM de outras espécies com base em suas características morfológicas e fenotípicas, ainda há a possibilidade de identificar populações de CTM pela sua capacidade de ser induzida a diferenciar-se em osso, gordura e cartilagem *in vitro*. O método clássico para diferenciação das CTM *in vitro*, envolve incubação das CTM com meio de diferenciação comercial. Como exemplo, no caso da diferenciação osteogênica, as CTM formam agregados, aumentam sua expressão de fosfatase alcalina, e

acúmulo de cálcio pode ser visto com o tempo. Estes agregados coram positivamente nas técnicas específicas como Vermelho de Alizarina e Von Kossa. Contudo, estas condições não refletem os sinais fisiológicos *in vivo* recebidos pelas CTM e que induzem a osteogênese (PITTENGER et al., 1999; CHAMBERLAIN et al., 2007).

Fatores que influenciam a sobrevivência celular em cultivo, quando há necessidade de criopreservação, são o crioprotetor usado e a curva de congelamento (HAYES et al., 2005). O uso de redução progressiva de temperatura e DMSO como crioprotetor é um método simples e economicamente acessível que pode ser implementado sem alterar as características celulares após descongelamento (MIRANDA-SAYAGO et al., 2012)

2.2. Células tronco mesenquimais de tecido adiposo

O tecido adiposo é um reservatório de gordura na forma de triglicérides. Ele é classificado em tecido adiposo branco e marrom. A maior porcentagem de cobertura do corpo de mamíferos é feita pelo tecido adiposo branco que tem maior número de adipócitos e age como tecido regenerativo. O tecido adiposo branco tem como função isolamento térmico, amortecimento mecânico e, principalmente, fonte de energia (ALBRIGHT e STERN, 1998).

Considerado altamente complexo, o tecido adiposo é constituído de adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, musculatura vascular lisa, células endoteliais, macrófagos/monócitos residentes, células tronco, células progenitoras e células sanguíneas (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003; RESHAK et al., 2013). A porção estromal do tecido adiposo é heterogênea, e seu isolamento é afetado por e fatores como espécie, raça, idade e deposição de tecido adiposo que afetam a quantidade de célula tronco do tecido. Um estudo comparou métodos de isolamento de CTM-TA de humanos e bovinos percebendo diferenças nas exigências de concentração de colagenase e tempo de digestão (RESHAK et al., 2013).

Há uma inconsistência na literatura com relação ao uso dos termos que descrevem os precursores celulares oriundos do estroma do tecido adiposo, usando, por exemplo, termos como células de lipoaspirado processado, células estromais derivadas de tecido adiposo, preadipócitos, fração de células

vasculares do estroma adiposo, entre outros. O termo fração de célula estromal-vascular bem como células estromais derivadas de tecido adiposo descrevem células obtidas imediatamente após digestão por colagenase (SCHÄFFLER e BUCHLER, 2007) e será mencionado como células tronco mesenquimais de tecido adiposo sob a sigla CTM-TA.

Após a primeira descrição de isolamento de células tronco a partir de medula óssea, há mais de 40 anos (FRIEDENSTEIN et al., 1974), o uso desta fonte se tornou padrão para obtenção de células tronco adultas devido ao seu grande potencial de uso na medicina regenerativa e baixa morbidade durante a coleta (JAISWAL et al., 2011). Contudo, a coleta de medula óssea por aspiração é um procedimento doloroso, o número de células adquiridas é geralmente baixo (aproximadamente 1 célula para cada 10000 células nucleadas) e há declínio no potencial de diferenciação com o aumento de idade do doador (ZUK et al., 2002; CHAMBERLAIN et al., 2007). O tecido adiposo pode, portanto, ser considerado uma fonte alternativa de grande interesse (ZUK et al., 2002).

As CTM-TA são uma fonte atrativa por serem abundantes e possuírem aplicabilidade terapêutica em diversos campos para o reparo e regeneração de danos teciduais agudos e crônicos (ZUK et al., 2002). Isso se deve à sua habilidade de expansão e capacidade de diferenciar-se em linhagem adipogênica, osteogênica, condrogênica e neurogênica *in vitro* (GIMBLE e GUILAK, 2003; LIN et al., 2006) bem como o procedimento cirúrgico simples que demanda e o isolamento descomplicado (CASTEILLA et al., 2005; OEDAYRAJSINGH-VARMA et al., 2006). Adicionalmente, o tecido adiposo pode ser obtido repetidamente em grandes quantidades sob anestesia local promovendo desconforto mínimo (SCHÄFFLER e BÜCHLER, 2007).

O uso das CTM oriundas tecido adiposo contorna problemas éticos que as células tronco embrionárias enfrentam e possuem menor custo em comparação com a produção das células tronco de pluripotência induzida (IPS) (LINDROOS et al., 2011). Além disso, uma análise comparativa das CTM obtidas da medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical mostrou claramente que CTM-TA se igualam quanto à morfologia, fenótipo imune, taxa de sucesso de isolamento de células tronco, frequência de colônia e

capacidade de diferenciação (KERN et al., 2006; IZADPANAHA et al., 2006). Em CTM-TA humanas, algumas características como frequência de formação e colônias e manutenção de habilidade de proliferação em cultivo parecem ser inclusive superiores se comparadas às CTM oriundas de medula óssea. Ainda, um maior número de adipócitos pode ser obtido de culturas com plaqueamento inicial baixo (LEE et al., 2004).

Contudo, fatores como idade do doador, tipo (tecido adiposo branco ou marrom), localização (subcutânea ou visceral), condições de cultivo, densidade de plaqueamento, e formulação do meio de cultivo podem influenciar tanto na taxa proliferação quanto na capacidade de diferenciação das CTM-TA. A fonte de obtenção do tecido pode influenciar características a longo termo pois diferentes localizações anatômicas do tecido adiposo possuem suas próprias características metabólicas como atividade lipolítica, composição de ácidos graxos, e perfil de expressão gênica (SCHÄFFLER e BUCHLER, 2007).

2.3. Meio condicionado

Estudos anteriores com células tronco focavam principalmente no potencial de diferenciação dessas células em vários tecidos. No entanto, a maioria das diferenciações são incomuns *in vivo*. Ademais, estudos de biodistribuição mostraram que, independentemente do modo de administração das células ou do fenótipo da doença, as CTM possuem meia vida relativamente curta após injeção, sendo detectáveis em vários órgãos ou tecidos de 48 horas a três meses (TOMA et al., 2002; EGGENHOFER et al., 2012).

As pesquisas atuais afirmam que a atividade antiinflamatória e parácrina desempenham um papel predominante na ação das CTM (LAVOIE et al., 2013). A supressão de reações imunes foi primeiramente relatada por Di Nicola et al. (2002) co-cultivando CTM de medula óssea com células imunes ativas. As CTM inibiram a proliferação das células-T sem contato direto com elas.

De modo geral, três aspectos principais da ação imunomoduladora já foram relatados: contato célula-célula, produção de moléculas inibitórias e indução das células-T reguladoras. Desta forma, há a geração de um microambiente tecidual permissivo à reparação e regeneração. A liberação de

fatores solúveis no secretoma de CTM tem mostrado desempenhar papel primordial e levou a investigações para avaliar potencial terapêutico das moléculas derivadas de CTM em condições imunológicas (LAVOIE et al., 2013). Em um estudo evidenciaram-se as propriedades imunomoduladoras das células tronco e seu meio condicionado, e o papel crucial dos fatores solúveis em inibir células mononucleares do sangue periférico *in vitro*, bem como a eficácia do meio condicionado no tratamento de injúria espontânea do tendão e ligamento em equinos *in vivo* (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013).

As moléculas secretadas mediam a interação intercelular a curta distância via espaço intersticial ou entram nos fluidos corporais como plasma ou líquido cérebro espinhal e participam na manutenção da homeostase de órgãos e até mesmo de todo o organismo (PAVLOU e DIAMANDIS, 2010). As moléculas secretadas incluem proteínas séricas (como albumina, transferrina e imunoglobulinas), proteínas da matriz extracelular (colágenos, proteoglicanos, fibronectina, lamininas), enzimas digestivas, ou proteínas do leite (LODISH et al., 2000). Já as proteínas altamente bioativas, mesmo em baixa quantidade, como fatores de crescimento, hormônios, citocinas ou proteases de processamento de matriz extracelular, possuem papel chave na regulação de renovação e diferenciação celular (SKALNIKOVA et al., 2011).

O secretoma é definido pelas proteínas produzidas por uma célula, tecido ou organismo através de mecanismos de secreção clássicos e não clássicos. No mecanismo clássico as proteínas recém sintetizadas são translocadas para o lúmen do retículo endoplasmático, transportada até o complexo de Golgi e liberadas por exocitose (VAN VLIET et al., 2003). Já o mecanismo não clássico engloba a secreção de várias proteínas reguladoras do sistema imune, crescimento celular, diferenciação e angiogênese, e não segue a rota do retículo endoplasmático e complexo de Golgi. O mecanismo completo para secreção dessas proteínas permanece desconhecido (NICKEL e RABOUILLE, 2009). Pesquisas caracterizando o secretoma das CTM tem comumente por alvo moléculas como fatores de crescimento e hormônios, com papéis conhecidos na prevenção da apoptose, indução da proliferação celular e diferenciação ou regulação das respostas imune e inflamatória (LAVOIE et al., 2013).

O isolamento de meio condicionado para detecção de proteínas é influenciado por fatores como população pura de células tronco e a diminuição do estresse celular. Além disso, a sobrevivência da maioria das células *in vitro* depende da presença de soro fetal bovino (SFB) no meio de cultivo, o que frequentemente compromete a análise das proteínas que são secretadas em pequena quantidade. Portanto, para obtenção de meio condicionado, as células são frequentemente incubadas em meio livre de SFB por várias horas (de 18 a 48h; PLANQUE et al., 2009).

2.4. Vesículas Extracelulares

Vesículas extracelulares (VEs) são vesículas de membrana lipídica contendo uma variedade de tipos de RNA, incluindo mRNA e miRNA, proteínas solúveis e proteínas transmembrana (THERY et al., 2002; VALADI et al., 2007). A identificação de pequenas vesículas liberadas por muitos, senão todos os tipos celulares como ferramentas de comunicação intercelular foi proposta décadas atrás (BASTIDA et al., 1984). Está se tornando cada vez mais evidente que o papel desempenhado pelos mecanismos parácrinos das células tronco auxiliam o reparo celular através de secreção de VEs (DEN HAAN, et al., 2012; VAN KOPPEN et al., 2012). VEs desempenham papel em muitos processos incluindo comunicação intercelular, reciclagem de proteínas de membrana e lipídios, imunomodulação, senescência, angiogênese, proliferação celular e diferenciação (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 2005; VAN BALKOM et al., 2013; XU e TAHARA, 2013). Em algumas situações, como coagulação ou inflamação, as vesículas extracelulares não são apenas mensageiras mas necessárias para coordenar o desenvolvimento de processos de sinalização (MÜLLER et al., 2003; DEL CONDE et al., 2005).

As células liberam no microambiente extracelular, inclusive nos fluidos corpóreos, vários tipos de vesículas com diferentes propriedades fisiológicas, conteúdo e função. Dentre elas estão os exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (COCUCCI et al., 2009; EL ANDALOUSSI et al., 2013). Estas vesículas tem sido estudadas com o auxílio de uma variedade de estratégias de isolamento e foram categorizadas de acordo com suas propriedades estruturais e bioquímicas distintas (SIMPSON et al., 2008). O primeiro passo

para padronização de nomenclatura é considerar o mecanismo pelo qual a vesícula é liberada da célula: se por fusão e exocitose dos corpos multivesiculares, se por protrusão da membrana plasmática ou se liberação vesicular após morte ou apoptose da célula. O termo vesículas extracelulares pode ser usado para designar uma população mista de exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (MATHIVANAN et al., 2010).

Os Exossomos (Exos) são nanovesículas com 30 a 150nm de tamanho e se formam a partir de corpos multivesiculares (CMV). Estes CMV se originam do endossomo tardio da célula e se fundem com a membrana plasmática liberando seu conteúdo (MATHIVANAN et al., 2010; VADER et al., 2014). Eles foram descritos pela primeira vez enquanto pesquisadores cultivavam reticulócitos (PAN e JOHNSTONE, 1983).

Os Exos estão envolvidos na comunicação intercelular permitindo troca de proteínas e lipídios entre as células produtoras e alvo (THERY et al., 2006). Durante sua biogênese, Exos são preenchidos com proteínas, RNA e lipídios oriundos da célula hospedeira (MATHIVANAN et al., 2010).

Como não há nenhum marcador específico de Exos, proteínas presentes em grande quantidade são usadas para sua detecção. Há proteínas como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81), proteínas associadas ao citoesqueleto (ezrin) bem como proteínas relacionadas à biogênese do corpo multivesicular (Alix e TSG101) que podem ser usadas como marcadores. Outras proteínas também comumente detectadas são Flotilin e Hsc70, bem como as proteínas Rab (LÄSSER et al., 2012). Uma combinação de métodos é necessária para caracterizar Exos, incluindo avaliação do seu conteúdo e marcadores de superfície por citometria de fluxo ou Western Blot, determinação de seu tamanho, morfologia e pureza da amostra por microscopia eletrônica (LÄSSER et al., 2012).

Os vários processos em que os Exos estão envolvidos, bem como a diversidade de maneiras como podem influenciar as células, fazem das deles uma fonte interessante de aplicação terapêutica. Pascucci et al. (2014) afirmam que os Exossomos possuem potencial para serem explorados no uso terapêutico na medicina veterinária regenerativa. Atualmente, os exossomos são muito mais detalhados que as microvesículas, como documentado em

revisões recentes. Entre suas funções encontram-se coagulação, apresentação de antígeno e crescimento celular (FERVIER e RAPOSO, 2004; LAKKARAJU e RODRIGUEZ-BOULAN, 2008; SCHOREY e BHATNAGAR, 2008).

ExoCarta é um banco de dados online que cataloga informações específicas sobre exossomos com relação a proteínas, RNA e lipídios. Inicialmente descrita em 2009, ExoCarta mostra em seu resultado de busca diferentes tipos de dados incluindo espectrometria de massa, Western Blot, interação proteína-proteína entre outros. Desde seu lançamento, dois outros bancos de dados foram descritos (Vesiclepedia e EVpedia). Enquanto ambos os bancos de dados catalogam dados de vários tipos de vesículas extracelulares, ExoCarta é a fonte primária de carregamento de dados de exossomos (KEERTHIKUMAR et al., 2016).

Os possíveis mecanismos pelos quais os exossomos se comunicam com as células alvo incluem: 1) interação da membrana exossomal com a célula alvo em sinalização contato-dependente, 2) clivagem de proteínas de membrana exossomais por proteases e os fragmentos resultantes agindo como ligantes de receptores da superfície da célula alvo, ou ainda, 3) exossomos podem se fundir com a célula alvo resultando em transferência não seletiva de proteínas e RNA (MATHIVANAN et al., 2010).

As Microvesículas (Mvs) são grandes vesículas membranosas com mais de 100 nm (100 – 1000nm) de diâmetro, que são expelidas por vários tipos celulares (THERY et al., 2001; AL-NEDAWI et al., 2008). Após a protrusão da membrana plasmática, segue-se o seu desprendimento resultando na formação das microvesículas (COCUCCI et al., 2009).

A presença de proteínas específicas nas Mvs, além das proteínas presentes na membrana plasmática e citosol, já foi comprovada (COCUCCI et al., 2007; MOSKOVICH E FISHELSON, 2007). Células em repouso podem liberar microvesículas, embora a taxa de liberação aumente dramaticamente após estímulo. Além disso, o cálcio induz grade resposta de liberação de Mvs (PILZER et al, 2005; MOSKOVICH e FISHELSON, 2007).

Em termos de composição, algumas proteínas possuem ampla expressão, como a b1 integrina concentrada na membrana das microvesículas (DEL CONDE et al., 2005; DOLO et al., 1998). As Mvs provenientes de células distintas, podem ser molecularmente diferentes umas das outras, apesar de

serem geradas por processos análogos de brotamento da superfície celular (FLAUMENHAFT et al., 2008).

A população de Mvs recuperada de fluidos extracelulares ou meio condicionado está inevitavelmente misturada aos exossomos, o que caracteriza um desafio no estudo destas vesículas isoladamente. Além disso, em diferentes condições, as Mvs podem mudar sua proporção microvesícula:exossomo, e também a homogeneidade de acordo com as células de origem (COCUCCI et al., 2009).

Após liberação das Mvs de suas células de origem, elas interagem apenas com células específicas que reconhecem como alvo (FLAUMENHAFT et al., 2008). A interação em muitos casos se restringe à superfície celular, ficando limitada à sinalização (GASSER e SCHIFFERLI, 2004). Outras vezes a interação se dá por fusão da Mv e da célula alvo por captação endocítica (KOPPLER et al., 2006).

Células apoptóticas ou em processo de morte liberam vesículas que são remanescentes condensados das células referidos como corpos apoptóticos (CA). Estes CA possuem de 50 a 500nm, aproximadamente o mesmo tamanho das plaquetas (THERY et al., 2001; HRISTOV et al., 2004). O termo CA surgiu em 1972 (KERR et al., 1972) e eles são caracterizados por externalização de fosfatidilserina e podem conter fragmentos de DNA (BEYER et al., 2010). Exemplos de funções dos corpos apoptóticos incluem transferência horizontal de oncogenes (BERGSMEDH et al., 2001), transferência horizontal de DNA (HOLMGREN et al., 1999) e apresentação de epítomos de células T para células fagocíticas (BELLONE et al., 1997). Ao invés de isolar os corpos apoptóticos, a maioria dos estudos usa co-culturas de células sofrendo apoptose para investigar a função destas estruturas (GYÖRGY et al., 2011)

Os exossomos são menores e homogêneos em tamanho, enquanto que as microvesículas e corpos apoptóticos possuem tamanhos heterogêneos (THERY et al., 2001).

O padrão ouro para determinação do tamanho das vesículas é a microscopia eletrônica de transmissão (MET). A MET é capaz de determinar natureza e tamanho da partícula, bem como sua estrutura (VAN DER POL et al., 2010). Para os estudos de MET as vesículas precisam estar concentradas

por ultracentrifugação. Contudo, há algumas preocupações com relação à confiabilidade das análises das vesículas na MET uma vez que a centrifugação, desidratação e fixação podem alterar o tamanho e morfologia das vesículas. Técnicas mais recentes levaram à descoberta de que o formato em forma de raquete era um artefato relacionado à fixação, por exemplo (THERY et al., 2006).

Já foi demonstrado que tanto o meio condicionado quanto as vesículas extracelulares podem ser usados *in vitro* e *in vivo* para reparo de dano tecidual, aumentando a taxa de cura (LANGE-CONSIGLIO et al., 2013; BIANCONE et al., 2012; BRUNO et al., 2012).

2.5. Endometrite em bovinos

O útero é composto de três porções sendo elas: o perimétrio, miométrio e endométrio (PRIEDKALNS e LEISER, 2006). O endométrio compreende células epiteliais, estromais, endoteliais e imunes, cujas funções são moduladas pelos hormônios ovarianos estradiol e progesterona, bem como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (LEWIS, 2003; SCHÄFER et al., 2011). As interações parácrinas, autócrinas e endócrinas entre células são fundamentais para funcionamento normal do tecido e dependem da correta organização espacial das células e arquitetura tecidual (VOGEL e SHEETZ, 2006).

O endométrio, assim como a maioria das superfícies mucosas, é a linha de frente da defesa imune contra bactérias. A resposta imune do endométrio a patógenos envolve o sistema complemento, peptídeos antimicrobianos, imunoglobulinas, proteínas de fase aguda e receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (WIRA e FAHEY, 2004). O papel dos PRRs no endométrio parece ser de particular importância, pois eles reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) conservados e sintetizados por microorganismos (BEUTLER, 2009; TAKEUCHI e AKIRA, 2010). A detecção dos PAMPs pelos PRRs sobre ou dentro das células imunes especializadas e células endometriais desencadeia a produção de citocinas e quimiocinas que orquestram uma resposta imune para eliminar infecção e resultar no reparo tecidual. Os PRR compreendem 4 classes principais de moléculas solúveis e

que se ligam à membrana, dentre elas a mais estudada é a dos receptores tipo-Toll (TLR) (HIRATA et al., 2005; HERATH et al., 2006; HERATH et al., 2009; SHELDON E BROMFIELD, 2011).

Doenças uterinas como a endometrite são altamente prevalentes em vacas, principalmente vacas leiteiras de alta produção (GILBERT et al., 2005; LEBLANC et al., 2002) e levam a perdas econômicas devido a diminuição da produção de leite e da fertilidade, acarretando em repetição de serviço e aumento do intervalo entre partos (BARTLETT et al., 1986; GILBERT et al., 2005). A endometrite é a condição na qual vacas falham em eliminar os contaminantes bacterianos (SHELDON e DOBSON, 2004) e é definido por aumento no número de polimornucleares no útero (GILBERT et al., 2005; BARLUND et al., 2008).

Quando a infecção uterina acontece, há dano tecidual no endométrio. Nas células endometriais, os TLR detectam moléculas associadas aos patógenos, como o LPS, por exemplo, e levam à secreção de quimiocinas, citocinas e peptídeos antimicrobianos. As quimiocinas, por sua vez, atraem neutrófilos e macrófagos ao local. Vacas com infecção uterina possuem menos chances de ovular porque possuem crescimento folicular mais lento do folículo dominante, menores concentrações plasmáticas de estradiol, bem como função hipotalâmica pituitária comprometida. A regulação da imunidade do endométrio depende de hormônios esteroides, somatotrofinas e proteínas regulatórias locais. Desta forma as doenças uterinas de origem microbiana causam infertilidade por prejudicar a função ovariana. Avanços no conhecimento sobre a infecção e a imunidade do trato genital feminino devem ser explorados para o desenvolvimento de novas terapias para doenças uterinas (HERATH et al., 2006; SHELDON et al., 2009).

Embora grande parte das vacas consiga eliminar as bactérias uterinas com resposta imune inata, 17 a 37% desenvolvem endometrite clínica enquanto 14 a 53% desenvolvem endometrite subclínica (CHEONG et al. 2011; GILBERT et al. 2005; KIM e KANG 2003; MADDOZ et al. 2014). A endometrite subclínica também possui efeitos negativos na performance reprodutiva. Existe um limiar de aceitabilidade para presença de polimorfonucleares (10 a 18%) na citologia, no lúmen endometrial, acima do qual o animal é diagnosticado com

endometrite subclínica (KASIMANICKAM et al., 2004). A biópsia provê informações detalhadas sobre o estado de saúde uterina (CHAPWANYA et al., 2009).

Apesar do grande uso de antibióticos sistêmicos e locais, antisépticos, sulfonamidas e hormônios, as taxas de recuperação da endometrite em vacas com subsequente fertilidade não aumenta consideravelmente. Além disso, os custos com tratamento, a frequência de sua administração e o descarte do leite após o tratamento faz com que estas abordagens sejam antieconômicas. Desta forma, terapias alternativas que estimulem a defesa natural do útero tem sido sugeridas como tratamento na endometrite bovina (HUSSAIN e DANIEL, 1991).

2.5.1. Prostaglandina

De modo geral as prostaglandinas podem ser produzidas por todo o corpo e estão presentes em diversas atividades, tanto patológicas quanto fisiológicas, exercendo efeito nas funções reprodutivas durante o ciclo estral e parto, participando de fenômenos como luteólise e ovulação (BARROS e DI STASI, 2012; SHRESTHA et al., 2012). Por este motivo os análogos da Prostaglandina F₂ α (PGF₂α) podem ser utilizados na sincronização de estro em bovinos, agindo como agente luteolítico, como terapêutico em casos de endometrite ou no processo de involução uterina prolongada (TENHAGEN et al., 2000; BARROS e DI STASI, 2012).

O útero apresenta-se como fonte primária de produção da PGF₂α, e o tecido caruncular é um sítio ativo de síntese e metabolização. (GUILBAULT et al., 1984). *In vivo*, a prostaglandina é rapidamente metabolizada em 13,14-dihidro-15-keto PGF₂α. *In vitro*, em culturas primárias, o metabolismo da PGF₂α é muito mais limitado e pode ser coletada e mensurada facilmente (SENGER et al., 2003).

A PGF₂α é sintetizada a partir do ácido aracdônico (AA) sob regulação da cicloxigenase 2 (COX-2; SMITH et al., 1996). As células epiteliais do útero secretam PGF₂α (ASSELIN et al., 1996), e sua secreção em resposta à ativação dos receptores de ocitocina uterinos induz regressão do corpo lúteo (luteólise) e inicia uma nova fase folicular no ovário (POYSER, 1995). Portanto

a infecção bacteriana do útero e consequente secreção de PGF2 α iniciam um processo de luteólise causando a regressão prematura do corpo lúteo e perturbando o ciclo ovariano (NEELY et al., 1979; OPSOMER et al., 2000; SHELDON et al., 2002). A perda embrionária precoce pode ser causada pela pelo aumento da secreção de PGF2 α devido inflamação uterina (NEELY et al., 1979). Desta forma, estratégias para aumentar sobrevivência embrionária pode incluir diminuição da ação de PGF2 α (MATTOS et al., 2003; CALDARI-TORRES et al., 2006).

Nos bovinos a contaminação bacteriana do útero após o parto é frequente (DOHMEN et al., 2000; SHELDON et al., 2002). Em muitos desses animais a infecção bacteriana persiste por mais de 3 semanas após o parto causando doenças clínicas variando de uma infecção aguda a uma endometrite crônica (SHELDON e DOBSON, 2004).

O corpo lúteo dos ruminantes produz ocitocina que estimula as células endometriais a sintetizar PGF2 α . Quando os receptores de ocitocina estão disponíveis em número suficiente, ocorre a secreção pulsátil de PGF2 α e a luteólise ocorre (SENGER et al., 2003).

Os bovinos são um bom modelo para o estudo dos efeitos da infecção uterina nas funções endócrinas e imunes pois na espécie a doença uterina é bem caracterizada, há disponibilidade de tecidos e também similaridade dos patógenos bacterianos entre os mamíferos (HERATH et al., 2006). *Escherichia coli* é a bactéria patogênica mais comumente isolada dos casos de doença uterina em bovinos (DOHMEN et al., 2000; SHELDON et al., 2002). No lúmen uterino, há alta concentração de LPS, o principal fator patogênico da *E. coli* (DOHMEN et al., 2000).

O endométrio provê uma barreira contra infecção e uma oportunidade de identificação da bactéria pelos receptores do sistema imune inato (BEUTLER, 2004). Um grupo importante de receptores que reconhecem esses patógenos são os receptores tipo-Toll (TLR; BEUTLER et al., 2003; STROBER, 2004; YOUNG et al., 2004). Estes receptores conseguem iniciar uma cascata de sinalização estimulando a produção de mediadores imunes que orquestram a resposta imune para acabar com a infecção (BEUTLER et al., 2003). Os TLR

podem também estimular a produção de prostaglandinas pelas células imune (UEMATSU et al., 2002).

O endométrio é regulado pela mudança de concentração dos hormônios sexuais da fêmea como estradiol e progesterona durante o ciclo ovariano, e estes esteroides possuem profundo efeito no estabelecimento de infecções. Por exemplo, em bovinos a progesterona suprime função imune uterina pela diminuição da capacidade proliferativa dos linfócitos, aumentando assim a suscetibilidade à infecção (BEAGLEY e GOCKEL, 2003; LEWIS, 2004). Além disso, concentrações elevadas de progesterona estão associadas com diminuição da produção de PGF₂α (ASSELIN et al., 1996). Inversamente, estradiol pode desempenhar um papel de recrutamento de células imunes pois mais macrófagos estão presentes no endométrio quando as concentrações de estradiol são altas (BEAGLEY e GOCKEL, 2003).

A enzima 15-hidroxi prostaglandina desidrogenase (PGDH) é a principal enzima responsável pelo metabolismo da PGF₂α (SANGHA et al., 1994) e serve como barreira metabólica para o transporte transmembrana da prostaglandina ativa dos sítios de síntese até os sítios de ação. Portanto, o PGDH tem papel importante na manutenção da gestação, por exemplo (CHALLIS e MITCHELL, 1994). *In vivo*, no útero, a diminuição de PGDH frente à infecção mantém a ação da prostaglandina prevenindo sua metabolização e inativação (VAN MEIR et al., 1996).

No corpo lúteo, por exemplo, há produção de PGDH que degrada a própria PGF₂α sintetizada (MIYAMOTO et al., 2009; MONDAL et al., 2011). PGDH cataliza o primeiro passo da degradação da família das moléculas prostanoídes, oxidando o grupo prostanoide 15-hidroxil a cetona e portanto anulando a ligação do metabólito aos receptores de prostaglandina (TAI et al., 2002).

Em cultivo de células trofoblásticas de placenta humana, o desafio bacteriano com *L. rhamnosus* ou LPS + *L. rhamnosus* estimularam a expressão de PGDH, o que pode ser um mecanismo para evitar partos prematuros (YEGANEKI et al., 2009).

2.5.2 Apoptose no endométrio

Apoptose é influenciada por uma grande variedade de estímulos e desempenha papel crítico na homeostase tecidual através de mecanismo fisiológico para eliminar células disfuncionais ou excedentes (SONG et al., 2002).

O sistema Fas/Fas-L de apoptose celular foi originalmente descrito no contexto de apoptose mediada por linfócitos. Linfócitos T produzem marcadores citotóxicos que são responsáveis por duas principais rotas para apoptose: exocitose mediada por grânulos, e interação Fas/Fas-L (STENGER et al., 1999; PODACK et al., 1985; SHI et al., 1992). Contudo, novos dados mostram que Fas e Fas-L são amplamente expressos e agem em vários tecidos além do sistema imunológico (BELLGRAU et al., 1995; GRIFFITH et al., 1995; BAMBERGER et al., 1997).

A apoptose pode estar envolvida com processos fisiológicos ou não (BRILL et al., 1999). O útero como órgão reprodutor é caracterizado por contínuos ciclos de crescimento e apoptose das células endometriais em resposta a mudanças hormonais. O endométrio apresenta mudanças cíclicas significativas dependentes de esteroide, tanto em sua estrutura quanto função, como por exemplo, o desenvolvimento glandular no pró-estro (SONG, et al., 2002; SENGER, 2003; FLUHR et al., 2013).

Dentre os receptores de morte celular, Fas é o mais importante, e sua interação com seu ligante (Fas-L) resulta no recrutamento das proteínas adaptadoras FADD (Fas-associated Death Domain) e ativação de Caspases, que levam a dano celular irreversível e morte através de vias de sinalização autócrinas e parácrinas no tecido (NAGATA, 1994; SLOAND et al.,

LPS foi previamente usado para induzir mudanças apoptóticas incluindo fragmentação de DNA e ativação de caspase. Acredita-se que o método de indução de apoptose com lipopolissacarídeo mimetiza parcialmente a resposta celular a patógeno e consequente inflamação (VEREKER et al., 2000; TSUJI et al., 2010).

Em casos de infecção e sepse, além da necrose direta do epitélio do órgão causada por fatores mecânicos e isquemia local (GALANI et al., 2010),

há evidências de que o sistema Fas/Fas-L desempenhe papel central na apoptose celular em tecidos (PIRES-NETO et al., 2013).

2.5.3. Cascata de inflamação na endometrite

A cascata da inflamação é um processo complexo iniciando-se com o reconhecimento dos patógenos, seguido do recrutamento de células inflamatórias e terminando com a resolução da resposta inflamatória. As células inicialmente liberam mediadores pró-inflamatórios desencadeando vasodilatação, exsudação de plasma, migração de leucócitos e destruição de tecido local. Citocinas anti-inflamatórias ou imunomodulatórias também são liberadas durante o evento inflamatório para inibir a ação das citocinas pró-inflamatórias prevenindo destruição de tecido local (PARHAM, 2009).

Na endometrite, após contato com patógenos, o endométrio é estimulado a produzir citocinas e quimiocinas para atrair e ativar neutrófilos e monócitos (DAVIES et al., 2008; HERATH et al., 2006; TZIANABOS, 2000). Os macrófagos residentes no endométrio também contribuem com o processo inflamatório pela liberação de citocinas e quimiocinas após fagocitose dos invasores (TZIANABOS, 2000). Fator de necrose tumoral α (TNF α) e IL-1 β também estimulam a expressão de quimiocinas (i.e. IL-8 e proteína quimiotática para monócito MCP1) bem como moléculas de adesão nas células do endotélio vascular, levando a uma diapedese e quimiotaxia (ROACH et al., 2002; SICA et al., 1990). Ademais, o TNF α e IL-1 β ativam neutrófilos e monócitos promovendo aumento da fagocitose e morte bacteriana (ROACH et al., 2002; WANG et al., 1991).

Alguns marcadores de inflamação uterina que modulam resposta inflamatória de fase aguda incluem IL-1 β , IL-6 e IL-8 e também TNF e são responsáveis pela adesão de neutrófilos ao endotélio vascular (FAHEY et al. 2005). IL-6 regula a transição do processo de inflamação precoce dominada por macrófagos (MOSHAGE 1997; JANEWAY et al. 2001) e IL-8 coordena migração de neutrófilos para o local da lesão ou da infecção (QUAYLE, 2002). Citocinas, juntamente com proteínas de fase aguda e peptídeos antimicrobianos, são mediadores chave da imunidade inata necessários para

limpeza da infecção ou resolução da inflamação (HANCOCK e SCOTT, 2000; BROGDEN et al. 2003).

2.5.4. Avaliação histológica na endometrite

Tradicionalmente a avaliação do útero bovino envolve palpação transretal e ultrassonografia transretal (SILVA et al., 2007). Estas técnicas são limitadas pois não obtêm detalhamento do processo patológico através de análise objetiva do tecido (RIES et al., 2000; NIELSEN, 2005).

Biópsias endometriais foram primeiramente realizadas em éguas como uma ferramenta para investigar infertilidade (BRANDT e MANNING, 1969). A técnica tem potencial para desempenhar um importante papel na avaliação da saúde uterina, investigação de processos patológicos e fisiológicos. É possível realizar uma boa avaliação histológica, celular e molecular usando o mesmo tecido obtido de biópsia (BONNET et al., 1991; MORAES et al., 2016).

Há 30 anos o valor da biópsia uterina ainda não era conhecido, mas com o aumento do conhecimento em relação à imunidade juntamente com avanço de tecnologias de ponta como biologia molecular e as “-ômicas”, as biópsias ganharam mais espaço na pesquisa de reprodução em bovinos. A utilização da avaliação histológica do endométrio provê avaliação profunda da saúde tecidual (HERATH et al., 2006; GABLER et al., 2009).

Na avaliação histológica da endometrite *in vivo*, é importante considerar a integridade do tecido, epitélio endometrial, presença de infiltrado inflamatório e número de leucócitos, quantidade de glândulas endometriais (CHAPWANYA et al., 2012, MAIA et al., 2016)

3. Objetivo geral

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito imunomodulador de vesículas extracelulares e do meio condicionado provenientes de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino em tecido endometrial bovino.

3.1. Objetivo específico

-Coletar, isolar e cultivar as células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino.

-Caracterizar células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino através da capacidade de formação de colônias fibroblásticas, análise de marcadores de superfície celular (CD44, CD29, Vimentina, CD34 e MHCII) utilizando a técnica de citometria de fluxo, potencial de diferenciação nas linhagens mesodermas osteogênica, adipogênica e condrogênica, bem como análise do cariótipo.

-Criopreservar as CTM-TA em queda lenta de temperatura e descongelá-las para garantir estabilidade à criopreservação.

-Isolar as vesículas extracelulares (VEs) do meio condicionado (MC) do cultivo das CTM-TA, caracterizá-las através da técnica de Western Blot e Microscopia Eletrônica de Transmissão.

- Realizar cultivo *in vitro* de explante endometrial bovino e realizar desafio com LPS.

- Avaliar a capacidade imunomoduladora das VEs e do MC no explante endometrial bovino através da dosagem de PGF2 α , IL-1 β por ELISA, imunistoquímica para TLR-4, Fas-L, R-PGF2 α , PGDH e análise morfológica tecidual.

3.2. Hipóteses

-As CTM-TA de bovinos secretam vesículas extracelulares capazes de ser isoladas e caracterizadas por Western Blot e Microscopia Eletrônica.

-As células endometriais elevam a secreção de IL-1 β , PGF2 α , e expressão de TLR-4, Fas-L e PGF2 α -R, e PGDH frente ao estímulo por LPS *in vitro*.

- Após desafio com LPS, ocorrem mudanças histológicas condizentes com inflamação no endométrio.

-As VEs e MC possuem potencial de imunomodulação em modelo de cultivo de explantes endometriais desafiados com LPS.

4. Referências

ALBRIGHT, A.N.; STERN, J.S. Adipose tissue. In: **Encyclopedia of Sports Medicine and Science**. Internet Society for Sport Science. 1998.

AL-NEDAWI, K.; MEEHAN, B.; MICALLEF, J.; LHOTAK, V.; MAY, L.; GUHA, A.; RAK, J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. **Nature Cell Biology**, v.10, p.619–624, 2008.

ASSELIN, E.; GOFF, A.K.; BERGERON, H.; FORTIER, M.A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F₂ α and E₂ and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v.54, p.371–379, 1996.

BADDOO, M.; HILL, K.; WILKINSON, R.; GAUPP, D.; HUGHES, C.; KOPEN, G.C.; PHINNEY, D.G. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.89, p.1235–1249, 2003.

BAMBERGER, A., SCHULTE, H.M.; THUNEKE, I.; ERDMANN, I.; BAMBERGER, C.M.; ASA, S.L. Expression of the apoptosis-inducing Fas ligand (FasL) in human first and third trimester placenta and choriocarcinoma cells. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.82, p.3173–3175, 1997.

BARLUND, C.S.; CARRUTHERS, T.D.; WALDNER, C.L.; PALMER, C.W. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. **Theriogenology**, v.69, p.714–723, 2008.

BARROS, C.M.; DI STASI, L.C. **Farmacologia veterinária**. 2012.

BARTLETT, P.C.; KIRK, J.K.; WILKE, M.A.; KANEENE, J.B.; MATHER, E.C. Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. **Preventive Veterinary Medicine**, p:235– 48, 1986.

BASTIDA, E.; ORDINAS, A.; ESCOLAR, G.; JAMIESON, G.A. Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces

coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. **Blood** v.64, p.177–184, 1984.

BEAGLEY, K.W.; GOCKEL, C.M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.38, p.13–22, 2003.

BELGRAU, D.; GOLD, D.; SELAWRY, H.; MOORE, J.; FRANZUSOFF, A.; DUKE, R.C. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. **Science**, v.377, p.630–632, 1995.

BELLONE, M.; IEZZI, G.; ROVERE, P.; GALATI, G.; RONCHETTI, A.; PROTTI, M.P.; DAVOUST, J.; RUGARLI, C.; MANFREDI, A.A. Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. **The Journal of Immunology**, v.159, n.11, p.5391–5399, 1997.

BERGSMEDH, A.; SZELES, A.; HENRIKSSON, M.; BRATT, A.; FOLKMAN, M.J.; SPETZ, A.L.; HOLMGREN, L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.98, n.11, p.6407–6411, 2001.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v.40, p.845–859, 2004.

BEUTLER, B.; HOEBE, K.; DU, X.; ULEVITCH, R.J. How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers. **Journal of Leukocyte Biology**, v.74, p.479–485, 2003.

BEUTLER, B.A. TLRs and innate immunity. **Blood**, p.113:1399–1407, 2009.

BEYER, C.; PISETSKY, D.S. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v.6, n.1, p.:21–29, 2010.

BIANCONE, L.; BRUNO, S.; DEREGIBUS, M.C.; TETTA, C.; CAMUSSI, G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v27, n.8, p.3037–3042, 2012.

BONNETT, B.N.; MILLER, R.B.; MARTIN, S.W.; ETHERINGTON, W.G.; BUCKRELL, B.C. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II.

Correlations between histological criteria. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.55, p.162–167, 1991.

BRANDT, G.W.; MANNING, J.P. Improved uterine biopsy technics for diagnosing infertility in the mare. **Veterinary Medicine, Small Animal Clinician**, v.64, p.977–983, 1969.

BRILL, A.; TORCHINSKY, A.; CARP, H.; TODER, V. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.16, p.512-519, 1999.

BROGDEN, K.A.; ACKERMANN, M.; MCCRAY, P.B.; TACK, B.F. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. **International journal of antimicrobial agents**, v.22, n.5, p.465-478, 2003.

BRUNO, S.; GRANGE, C.; COLLINO, F.; DEREGIBUS, M.C.; CANTALUPPI, V.; BIANCONE, L.; TETTA, C.; CAMUSSI, G. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. **PLoS One**, v.7, n.3, p.33115, 2012.

CALDARI-TORRES, C.; RODRIGUEZ-SALLABERRY, C.; GREENE, E.S.; BADINGA, L. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F2alpha production by bovine endometrial cells. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.971–977, 2006.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cell: cell-based reconstructive therapy in orthopaedics. **Tissue Engineering**, v.11, p.1198–1211, 2005.

CAPLAN, A.I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of pathology**, v.217, n.2, p.318-324, 2009.

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J.E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.98, p.1076–1084, 2006.

CASTEILLA, L.; PLANAT-BENARD, V.; COUSIN, B.; SILVESTRE, J.S.; LAHARRAGUE, P.; CHARRIÈRE, G.; CARRIÈRE, A.; PÉNICAUD, L. Plasticity of adipose tissue: A promising therapeutic avenue in the treatment of cardiovascular and blood diseases. **Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux**, v.98, p.922–926, 2005.

CHALLIS, J.R.G.; MITCHELL, M.D. Basic mechanisms of pre-term labour. **Research and Clinical Forums**, v.16, p.39-52, 1994.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem Cells**, v.25, p.2739–2749, 2007.

CHAPWANYA, A.; MEADE, K.G.; DOHERTY, M.L.; CALLANAN, J.J.; MEE, J.F.; O'FARRELLY, C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: Toward an improved understanding of uterine innate immunity. **Theriogenology**, v.71, p.1396–1407, 2009.

CHEN, J.; LI, Y.; WANG, L.; ZHANG, Z.; LU, D.; LU, M.; CHOPP, M. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. **Stroke**, v.32, p.1005–1011, 2001.

CHEONG, S.H.; NYDAM, D.V.; GALVÃO, K.N.; CROSIER, B.M.; GILBERT, R.O. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.762–770, 2011.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; MELDOLESI, J. Shedding microvesicles: artefacts no more. **Trends in cell biology**, v.19, n.2, p.43-51, 2009.

COCUCCI, E.; RACCHETTI, G.; PODINI, P.; MELDOLESI, J. Enlargeosome traffic: exocytosis triggered by various signals is followed by endocytosis, membrane shedding or both. **Traffic**, v.8, p.742–757, 2007.

DAVIES, D.; MEADE, K.G.; HERATH, S.; ECKERSALL, P.D.; GONZALEZ, D.; WHITE, J.O.; CONLAN, R.S.; O'FARRELLY, C.; SHELDON, I.M. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. **Reproductive Biology Endocrinology**, v.6, n.1, p.53, 2008.

DE JONG, O.G.; VAN BALKOM, B.W.M.; SCHIFFELERS, R.M.; BOUTEN, C.V.C.; VERHAAR, M.C. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. **Frontiers in Immunology**, v.5, n.608, p.1:13, 2014.

DEL CONDE, I.; SHRIMPTON, C.N.; THIAGARAJAN, P.; LÓPEZ, J.A. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. **Blood**, v.106, p.1604–1611, 2005.

DEN HAAN, M.C.; GRAUSS, R.W.; SMITS, A.M.; WINTER, E.M.; VAN TUYN, J.; PIJNAPPELS, D.A.; STEENDIJK, P.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; VAN DER LAARSE, A.; FIBBE, W.E.; DE VRIES, A.A.; SCHALIJ, M.J.; DOEVENDANS, P.A.; GOUMANS, M.J.; AT SMA, D.E. Cardiomyogenic differentiation-independent improvement of cardiac function by human cardiomyocyte progenitor cell injection in ischaemic mouse hearts. **Journal of Cellular and Molecular MEDICINE**, v.16, n.7, P.1508–1521, 2012.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli, **Blood**, v.99, p.3838-3843, 2002.

DOHMEN, M.J.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P.E.; LOHUIS, J.A. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. **Theriogenology**, v.54, p.1019–1032, 2000.

DOLO, V.; GINESTRA, A.; CASSARÀ, D.; VIOLINI, S.; LUCANIA, G.; TORRISI, M.R.; NAGASE, H.; CANEVARI, S.; PAVAN, A.; VITTORELLI, M.L. Selective localization of matrix metalloproteinase 9, b1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. **Cancer Research**, v.58, p.4468–4474, 1998.

EGGENHOFER, E.; BENSELER, V.; KROEMER, A.; POPP, F.C.; GEISSLER, E.K.; SCHLITT, H.J.; BAAN, C.C.; DAHLKE, M.H.; HOOGDUIJN, M.J.; Mesenchymal stem cells are shortlived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. **Frontiers in Immunology**, v3, p.297, 2012.

EL ANDALOUSSI, S.; LAKHAL, S.; MAGER, I.; WOOD, M.J. Exosomes for targeted siRNA delivery across biological barriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v65, n.3, p.391–397, 2013.

FAHEY, J.V.; SCHAEFER, T. M.; CHANNON, J.Y.; WIRA, C.R. Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. **Human Reproduction**, v.20, p.1439–1446, 2005.

FEVRIER, B.; RAPOSO, G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. **Current Opinion in Cell Biology**, v16, p.415–421, 2004.

FLAUMENHAFT, R.; DILKS J.R.; RICHARDSON J.; ALDEN E.; PATEL-HETT S.R.; BATTINELLI E.; KLEMENT G.L.; SOLA-VISNER M.; ITALIANO J.E.J.R.L. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. **Blood**, v.113, n.5, p.1112-1121, 2008.

FLINT, A.P.F.; LAMMING, G.E.; STEWART, H.J.; ABAYASEKARA, D.R.E. The role of the endometrial oxytocin receptor in determining the length of the sterile oestrous cycle and ensuring maintenance of luteal function in early pregnancy in ruminants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences**, v.344, p.291–304, 1994.

FLUHR, H.; SPRATTE, J.; BREDOW, M.; HEIDRICH, S.; ZYGMUNT, M. Constitutive activity of Erk1/2 and NF- κ B protects human endometrial stromal cells from death receptor-mediated apoptosis. **Reproductive Biology**, v.13, n.2, p.113-121, 2013.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHYAN, R.K.; LATSINIK, N.V.; PANASYUK, A.F.; KEILISS-BOROK, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning In Vitro and Retransplantation In Vivo. **Transplantation**, v17, n.4, p.331-340, 1974.

GABLER, C.; DRILLICH, M.; FISCHER, C.; HOLDER, C.; HEUWIESER, W.; EINSPIANIER, R. Endometrial expression of selected transcripts involved in prostaglandin synthesis in cows with endometritis. **Theriogenology**, v.71, p.993–1004, 2009.

GALANI, V.; TATSAKI, E.; BAI, M.; KITSOULIS, P.; LEKKA, M.; NAKOS, G.; KANAVAROS, P. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review. **Pathology - Research and Practice**, v.206, n.3, p.145–150, 2010.

GAO, J.; DENNIS, J.E.; MUZIC, R.F.; LUNDBERG, M.; CAPLAN, A.I. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, v.169, p.:12–20, 2001.

GASSER, O.; SCHIFFERLI, J.A. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. **Blood**, v.104, p.2543–2548, 2004.

GILBERT, R.O.; SHIN, S.T.; GUARD, C.L.; ERB, H.N.; FRAJBLAT, M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. **Theriogenology**, v.64, p.1879–1888, 2005.

GIMBLE, J.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v,5, p.362–369. 2003.

GRIFFITH, T.; BRUNNER, T.; FLETCHER, S.; GREE, D.; FERGUSON, T. Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. **Science**, v.270, p.1189–1192, 1995.

GRONTHOS, S.; SIMMONS, P.J.; GRAVES, S.E.; ROBEY, P.G. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. **Bone**, v.28, p.174 –181, 2001.

GUILBAULT, L.A.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; HOPKINS, S.M. Source of F series prostaglandins during the early postpartum period in cattle. **Biology of reproduction**, v.31, n.5, p.879-887, 1984.

GYÖRGY, B.; SZABÓ, T.G.; PÁSZTÓI, M.; PÁL, Z.; MISJÁK, P.; ARADI, B.; LÁSZLÓ, V.; PÁLLINGER, E.; PAP, E.; KITTEL, A.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZÁS, E.I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and molecular life sciences**, v.68, n.16, p.2667-2688, 2011.

HANCOCK, R.E.; SCOTT, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceedings of the national Academy of Sciences**, v.97, n.16, p.8856-8861, 2000.

HAYES, O.; RODRIGUEZ, L.L.; GONZALEZ, A.; FALCON, V.; AGUILAR, A.; CASTRO, F.O. Effect of cryopreservation on fusion efficiency and in vitro

development into blastocysts of bovine cell lines used in somatic cell cloning. **Zygote**, v.4, p.277–282, 2005.

HERATH, S.; FISCHER, D.P.; WERLING, D.; WILLIAMS, E.J.; LILLY, S.T.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. **Endocrinology** v.147, n.1, p.562–570, 2006.

HERATH, S.; LILLY, S.T.; FISCHER, D.P.; WILLIAMS, E.J.; DOBSON, H.; BRYANT, C.E.; SHELDON, I.M. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F₂α to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. **Endocrinology**, v.150, p.1912–1920, 2009.

HIRATA, T.; OSUGA, Y.; HIROTA, Y.; KOGA, K.; YOSHINO, O.; HARADA, M.; MORIMOTO, C.; YANO, T.; NISHII, O.; TSUTSUMI, O.; TAKETANI, Y. Evidence for the presence of toll-like receptor 4 system in the human endometrium. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.90, p.548–556, 2005.

HOFSTETTER, C.P.; SCHWARZ, E.J.; HESS, D.; WIDENFALK, J.; EL MANIRA, A.; PROCKOP, D.J.; OLSON, L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. "**Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**", v.99, p.2199–2204, 2002.

HOLMGREN, L.; SZELES, A.; RAJNAVOLGYI, E.; FOLKMAN, J.; KLEIN, G.; ERNBERG, I.; FALK, K.I. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. **Blood**, v.93, n.11, p.3956–3963, 1999.

HRISTOV, M.; ERL, W.; LINDER, S.; WEBER, P.C. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. **Blood**, v.104, n.9, p.2761–2766, 2004.

HUSSAIN, A.M.; DANIEL, R.C. Bovine endometritis: current and future alternative therapy. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.38, n.9, p.641-651, 1991.

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

IZADPANAH, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J.M.; BUNNELL, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.99, p.1285–1297, 2006.

JAISWAL, R.K.; JAISWAL, N.; BRUDER, S.P.; MBALAVIELE, G.; MARSHAK, D.R.; PITTENGER, M.F. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.7, p.269–291, 2011.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. In: **Immunobiology: the immune system in health and disease**. Singapura: Current Biology, v.1, p.11, 2001.

JANOWSKA-WIECZOREK, A.; WYSOCZYNSKI, M.; KIJOWSKI, J.; MARQUEZ-CURTIS, L.; MACHALINSKI, B.; RATAJCZAK, J. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. **International Journal of Cancer**, v.113, n.5, p.752–760, 2005.

JAVAZON, E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v.32, p.414–425, 2004.

KANG, S.G.; SHINOJIMA, N.; HOSSAIN, A.; GUMIN, J.; YONG, R.L.; COLMAN, H.; MARINI, F.; ANDREEFF, M.; LANG, F.F. Isolation and perivascular localization of mesenchymal stem cells from mouse brain, **Neurosurgery**, v. 67,p.711-720, 2010.

KASIMANICKAM, R.; DUFFIELD, T.F.; FOSTER, R.A.; GARTLEY, C.J.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S.; JOHNSON, W.H. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.62, p.9–23, 2004.

KEERTHIKUMAR, S.; CHISANGA, D.; ARIYARATNE, D.; AL SAFFAR, H.; ANAND, S.; ZHAO, K.; SAMUEL, M.; PATHAN, M.; JOIS, M.; CHILAMKURTI, N.; GANGODA, L.; MATHIVANAN, S. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. **Journal of Molecular Biology**, v.428, p.688–692, 2016.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells**, v.24, p.1294–1301, 2006.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, n.4, p.239–257, 1972.

KIM, I.H.; KANG, H.G. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. **Journal of Reproduction and Development**, v.49, p.485–491, 2003.

KOPPLER, B.; COHEN, C.; SCHLÖNDORFF, D.; MACK, M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. **European Journal of Immunology**, v.36, p.648–660, 2006.

LAKKARAJU, A.; RODRIGUEZ-BOULAN, E. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. **Trends Cell Biology**, v.18, p.199–209, 2008.

LALU, M.M.; MCINTYRE, L.; PUGLIESE, C.; FERGUSON, D.; WINSTON, B.W.; MARSHALL, J.C.; STEWART, D.J. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. **PloS one**, v.7, n.10, p.e47559, 2012.

LANGE-CONSIGLIO, A.; ROSSI, D.; TASSAN, S.; PEREGO, R.; CREMONESI, F.; PAROLINI, O. Conditioned medium from horse amniotic membrane-derived multipotent progenitor cells: immunomodulatory activity in vitro and first clinical application in tendon and ligament injuries in vivo. **Stem Cells and Development**, v.22, n.22, p.3015–3024, 2013.

LÄSSER, C.; ELDH, M.; LÖTVALL, J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. **Journal of Visualized Experiments**, v.59, p.3037, 2012.

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

LE BLANC, K.; TAMMIK, C.; ROSENDAHL, K.; ZETTERBERG, E.; RINGDEN, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v.31, p.890, 2003.

LEBLANC, S.J.; DUFFIELD, T.F.; LESLIE, K.E.; BATEMAN, K.G.; KEEFE, G.P.; WALTON, J.S.; JOHNSON, W.H. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2223–2236, 2002.

LEE, R.H.; KIM, B.; CHOI, I.; CHOI, H.S.; SUH, K.; BAE, Y.C.; JUNG, J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.14, p.311–324, 2004.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine immune defenses. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.281–294, 2004.

LEWIS, G.S. Steroidal regulation of uterine resistance to bacterial infection in livestock. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.117, 2003.

LIN, Y.; CHEN, X.; YAN, Z.; LIU, L.; TANG, W.; ZHENG, X.; LI, Z.; QIAO, J.; LI, S.; TIAN, W. Multilineage differentiation of adipose derived stromal cells from GFP transgenic mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.;285, p.69–78, 2006.

LINDROOS, B.; SUURONEN, R.; MIETTINEN, S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. **Stem Cell Reviews and Reports**, v.7, n.2, p.269-291, 2011.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. In: **Molecular Cell Biology**. New York: W. H. Freeman; 2000.

MADOZ, L.V.; GIULIODORI, M.J.; MIGLIORISI, A.L.; JAUREGUIBERRY, M.; DE LA SOTA, R.L. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.195–201, 2014.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R.J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v.73, p.1907–1920, 2010.

MATTOS, R.; GUZELOGLU, A.; BADINGA, L.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2 alpha and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase- A2 in bovine endometrial cells. **Biology of Reproduction**, v.69, p.780 –787, 2003.

MEIRELLES, L.S.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p.2287–2299, 2008.

MIRANDA-SAYAGO, J.M.; FERNANDES-ARCAS, N.; BENITO, C.; REYES-ENGEL, A.; HERRERO, J.R.; ALONSO, A. Evaluation of a low cost cryopreservation system on the biology of human amniotic fluid derived mesenchymal stromal cells. **Cryobiology**, v.64, p.160–166, 2012..

MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K.; SASAHARA, K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: impact of angiogenic and vasoactive factors. **Domestic animal endocrinology**, v.37, n.3, p.159-169, 2009.

MONDAL, M.; SCHILLING, B.; FOLGER, J.; STEIBEL, J.P.; BUCHNICK, H.; ZALMAN, Y; IRELAND, J.J.; MEIDAN, R.; SMITH, G.W. Deciphering the luteal transcriptome: Potential mechanisms mediating stage specific luteolytic response of the corpus luteum to prostaglandin F2 α . **Physiological genomics**, v.43, p.447–456, 2011.

MORAES, C.N.; MAIA, L.; QUEIROZ, C.M.; SUDANO, M.J.; CHAPWANYA, A.; OBA, E. Temporal histologic evaluation of the endometrium of Nelore cows (*Bos Taurus Indicus*) in Southeast Brazil treated with Cloprostenol Sodium at the postpartum. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, p. 351-363, 2016.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute-phase response. **The Journal of Pathology**, v.181, p.257–266, 1997.

MOSKOVICH, O.; FISHELSON, Z. Live cell imaging of outward and inward vesiculation induced by the complement c5b-9 complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v.282, p.29977–29986, 2007.

MÜLLER, I.; KLOCKE, A.; ALEX, M.; KOTZSCH, M.; LUTHER, T.; MORGENSTERN, E.; ENGELMANN, B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. **The FASEB Journal**, v.17, n.3, p.476-478, 2003.

NAGATA, S. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. **Advances in immunology**, v.57, p.129-144, 1994.

NAJIMI, M.; KHUU, D.N.; LYSY, P.A.; JAZOULI, N.; ABARCA, J.; SEMPOUX, C.; SOKAL, E.M. Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? **Cell Transplantation**, v16, p.717-728, 2003.

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

NEELY, D.P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L.E.; HUGHES, J.P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.27, p.181–189, 1979.

NICKEL, W.; RABOUILLE, C.; Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.10, p.148–155, 2009.

NIELSEN, J.M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v.64, p.510–518, 2005.

OEDAYRAJSINGH-VARMA, M.; VAN HAM, S.; KNIPPENBERG, M.; HELDER, M.N.; KLEIN-NULEND, J.; SCHOUTEN, T.E.; RITT, M.J.; VAN MILLIGEN, F.J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. **Cytotherapy**, v.8, p.166–177, 2006.

OPSOMER, G.; GROHN, Y.T.; HERTL, J.; CORYN, M.; DELUYKER, H.; DE KRUIF, A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. **Theriogenology**, v.53,p.841–857, 2000.

PAN, B.T.; JOHNSTONE, R.M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v.33, p.967–978,1983.

PARHAM P. In: **The immune system**. New York: Garland Science. 2009; 506p., 3ed.

PASCUCCI, L.; ALESSANDRI, G.; DALL'AGLIO, C.; MERCATI, F.; COLIOLO, P.; BAZZUCCHI, C.; CECCARELLI, P. Membrane vesicles mediate pro-angiogenic activity of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells. **The Veterinary Journal**, v.202, n.2, p.361-366, 2014.

PAVLOU, M.P.; DIAMANDIS, E.P. The cancer cell secretome: a good source for discovering biomarkers? **Journal of Proteomics**, v.73, p.1896–1906, 2010.

PILZER, D.; GASSER, O.; MOSKOVICH, O.; SCHIFFERLI, J.A.; FISHELSON, Z. Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. **Springer Seminars in Immunopathology**, v.27, p.375–387, 2005.

PIRES-NETO, R.C.; MORALES, M.M.; LANCAS, T.; INFORSATO, N.; DUARTE, M.I.; AMATO, M.B.; CARVALHO, C.R.; SILVA, L.F.; MAUAD, T.; DOLHNIKOFF, M. Expression of acute-phase cytokines, surfactant proteins, and epithelial apoptosis in small airways of human acute respiratory distress syndrome. **Journal of Critical Care**, v.28, n.1, p.111.e9 – 111.e15, 2013.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R.. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, p.143–147, 1999.

PLANQUE, C.; KULASINGAM, V.; SMITH, C.R.; RECKAMP, K.; GOODGLICK, L.; DIAMANDIS, E.P. Identification of five candidate lung cancer biomarkers by proteomics analysis of conditioned media of four lung cancer cell lines. **Molecular & cellular proteomics**, v.8, n.12, p.2746-2758, 2009.

PODACK, E.; YOUNG, J.; COHN, Z. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. **Proceedings National Academic Science USA**, v.2, p.8629-8633, 1985.

POYSER, N.L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, v.53, p.147–195, 1995.

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

QUAYLE, A. J. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. **Journal of Reproductive Immunology**, v.57, p.61–79, 2002.

RESHAK, A.H.; SHAHIMIN, M.M.; BUANG. F. Comparative study on human and bovine AT-SC isolation methods. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v.113, p.295-298, 2013.

RIES, A.; SINGSON, P.; BIDUS, M.; BARNES, J.G. Use of the endometrial pipelle in the diagnosis of early abnormal gestations. **Fertility and Sterility**, v.74, p.593–595, 2000.

ROACH, D.R.; BEAN, A.G.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M.P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W.J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **Journal of Immunology**, v.168, p.4620-4627, 2002.

SANGHA, R.K.; WELTON, J.C.; ENSOR, C.M.; TAI, H.H.; CHALLIS, J.R.G. Immunohistochemical localization, mRNA abundance and activity of 15-PGDH in placenta and fetal embrances during term and preterm labor. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.78, p.982-989, 1994.

SCHÄFER, W.R.; FISCHER, L.; ROTH, K.; JÜLLIG, A.K.; STUCKENSCHNEIDER, J.E.; SCHWARTZ, P.; WEIMER, M.; ORLOWSKA-VOLK, M.; HANJALIC-BECK, A.; KRANZ, I.; DEPPERT, W.R.; ZAHRADNIK, H.P. Critical evaluation of human endometrial explants as an ex vivo model system: a molecular approach. **Molecular Human Reproduction**, v.17, p.255–265, 2011.

SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: Adipose Tissue-Derived Stromal Cells - Basic and Clinical Implications for Novel Cell-Based Therapies. **Stem Cells**, v.25, p.818–827, 2007.

SCHOREY, J.S.; BHATNAGAR, S. Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. **Traffic**, v.9, p.871–881, 2008.

SENGER, P.L. In: **Pathways to pregnancy and parturition**. Washington EUA. 2ed, 381p., 2003.

SHELDON, I.M.; BROMFIELD, J.J. Innate immunity in the human endometrium and ovary. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.66, p.:63–71, 2011.

SHELDON, I.M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.82, p.295–306, 2004.

SHELDON, I.M.; NOAKES, D.E.; RYCROFT, A.N.; PFEIFFER, D.U.; DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v.123, p.837–845, 2002.

SHELDON, M.; CRONIN, J.; GOETZE, L.; DONOFRIO, G.; SCHUBERTH, H. Defining Postpartum Uterine Disease and the Mechanisms of Infection and Immunity in the Female Reproductive Tract in Cattle. **Biology of Reproduction** v.81, p.1025–1032, 2009.

SHI, L.; KAM, C.M.; POWERS, J.C.; AEBERSOLD, R.; GREENBERG, A.H. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. **Journal of Experimental Medicine**, v.176, p.1521-1529, 1992.

SHRESTHA, H.K.; BEG, M.A.; BURNETTE, R.R.; GINTHER, O.J. Plasma clearance and half-life of prostaglandin F₂alpha: a comparison between mares and heifers. **Biology of reproduction**, v.87, n.1, p.18, 2012.

SHRESTHA, H.K.; BEG, M.A.; BURNETTE, R.R.; GINTHER, O.J. Plasma clearance and half-life of prostaglandin F₂alpha: a comparison between mares and heifers. **Biology of reproduction**, v.87, n.1, p.18-1-6, 2012.

SILVA, E.; STERRY, R.A.; FRICKE, P.M. Assessment of a practical method for identifying anovular dairy cows synchronized for first postpartum timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3255–3262, 2007.

SIMPSON, R.J.; JENSEN, S.S.; LIM, J.W. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. **Proteomics**, v.8, p.4083–4099, 2008.

SKALNIKOVA, H.; MOTLIK, J.; GADHER, S.J.; KOVAROVA, H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. **Proteomics**, v.11, n.4, p.691-708, 2011.

SLOAND, E.M.; YOUNG, N.S.; KUMAR, P.; WEICHOLD, F.F.; SATO, T.; MACIEJEWSKI, J.P. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4⁺ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. **Blood**, v.89, p.1357-1363, 1997.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.33157–33160, 1996.

SONG, J.; RUTHERFORD, T.; NAFTOLIN, F.; BROWN, S.; MOR, G. Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fas ligand system in human endometrial cells. **Molecular human reproduction**, v.8, n.5, p.447-455, 2002.

SONG, J.; SAPI, E.; BROWN, W.; NILSEN, J.; TARTARO, K.; KACINSKI, B.M.; CRAFT, J.; NAFTOLIN, F.; MOR, G. Roles of Fas and Fas ligand during mammary gland remodeling. **Journal of Clinical Investigation**, v.106, n.10, p.1209, 2000.

SPINOZI, F.; FIZZOTI, M.; AGEA, E.; PIATTONI, S.; DROETTO, S.; RUSSANO, A.; FORENZA, N.; BASSOTTI, G.; GRIGNANI, F.; BERTOTTO, A. Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary T cells from patients with asthma. **Annals of Internal Medicine**, v.128, p.363-369, 1998.

STENGER, S.; ROSAT, J.P.; BLOOM, B.R.; KRENSKY, A.M.; MODLIN, R.L. Granulysin: a lethal weapon of cytotoxic T cells. **Immunology Today**, v.20, p.390-394, 1999.

STROBER, W. Epithelial cells pay a Toll for protection. **Nature Medicine**, v.10, p.898–900, 2004.

TAI, H.H.; ENSOR, C.M.; TONG, M.; ZHOU, H.; YAN, F. Prostaglandin catabolizing enzymes. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v.68, p.483-493, 2002.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v.140, p.805–820, 2010.

TENHAGEN, B.A.; BIRKELBACH, E.; HEUWIESER, W. Serum Progesterone Levels in Post-Partum Dairy Cows after Repeated Application of the Prostaglandin F_{2α} Analogue D (+) Cloprostenol Sodium. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.47, n.4, p.213-220, 2000.

THERY, C.; AMIGORENA, S.; RAPOSO, G.; CLAYTON, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, cap.3, un.3, 2006.

THERY, C.; BOUSSAC, M.; VERON, P.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; RAPOSO, G.; GARIN, J.; AMIGORENA, S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. **The Journal of Immunology**, v.166, p.7309–7318, 2001.

THERY, C.; ZITVOGEL, L.; AMIGORENA, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, v.2, n.8, 569-579, 2002.

TOMA C.; PITTENGER M.F.; CAHILL, K.S.; BYRNE, B.J.; KESSLER, P.D. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. **Circulation** v.105, p.93-98, 2002.

TSUJI, T.; ASANO, Y.; HANDA, T.; HONMA, Y.; ICHINOSE, Y.; YOKOCHI, T. Induction of apoptosis in lymphoid tissues of mice after intramuscular injection of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin. **Immunobiology**, v.201, n.3–4, p.377–390, 2010.

TZIANABOS, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.523–533, 2000.

UEMATSU, S.; MATSUMOTO, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E2 production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E2 synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. **The Journal of Immunology**, v.168, p.5811–5816, 2002.

VADER, P.; BREAKFIELD, X.O.; WOOD, M.J. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v.20, n.7, p.385–393, 2014.

VALADI, H.; EKSTROM, K.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; LEE, J.J.; LOTVALL, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v.9, n.6, p.654–9, 2007.

VAN BALKOM, B.W.; DE JONG, O.G.; SMITS, M.; BRUMMELMAN, J.; DEN OUDEN, K.; DE BREE, P.M.; VAN EIJNDHOVEN, M.A.; PEGTEL, D.M.; STOORVOGEL, W.; WÜRDINGER, T.; VERHAAR, M.C. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. **Blood**, v.121, n.19, p.3997–4006, 2013.

VAN DER POL, E.; HOEKSTRA, A.G.; STURK, A.; OTTO, C.; VAN LEEUWEN, T.G.; NIEUWLAND, R. Optical and non-optical methods for

detection and characterization of microparticles and exosomes. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.8, n.12, p.2596–2607, 2010.

VAN KOPPEN, A.; JOLES, J.A.; VAN BALKOM, B.W.; LIM, S.K.; DE KLEIJN, D.; GILES, R.H.; VERHAAR, M.C. Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. **PLoS One**, v.7, n.6, p38746, 2012.

VAN MEIR, C.A.; SANGHA, R.K.; WALTON, J.C.; MATTHEWS, S.G.; KEIRSE, M.J.N.C.; CHALLIS, J.R.G. Immunoreactive 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (PGDH) is reduced in fetal membranes from patients at preterm delivery in the presence of infection. **Placenta**, v.17, n.5-6, p.291-297, 1996.

VAN VLIET, C.; THOMAS, E.C.; MERINO-TRIGO, A.; TEASDALE, R.D.; GLEESON, P.A. Intracellular sorting and transport of proteins. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, v.83, p.1–45, 2003.

VEREKER, E.; CAMPBELL, V.; ROCHE, E.; MCENTEE, E.; LYNCH, M.A. Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. *The Journal of Biological Chemistry*, v.275, n.34, p.26252–26258, 2000.

VOGEL, V.; SHEETZ, M. Local force and geometry sensing regulate cell functions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.265–275, 2006.

WANG, J.M.; SICA, A.; PERI, G.; WALTER, S.; PADURA, I.M.; LIBBY P, CESKA M, LINDLEY I, COLOTTA F, MANTOVANI A. Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v.11, p.1166 –1174, 1991.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, v.112, n.12, 1796-1808, 2003.

WIRA, C.R.; FAHEY, J.V. The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. **Immunology**, v.111, p.13–15, 2004.

WU, G.D.; NOLTA, J.A.; JIN, Y.S.; BARR, M.L.; YU, H.; STARNES, V.A.; CRAMER, D.V. Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection. **Transplantation**, v.75, p.679–685, 2003.

XU, D.; TAHARA, H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, n.3, p368–375, 2013.

XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; CHOU, C.J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A.; CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.112, p.1821–1830, 2003.

YEGANEHI, M., WATSON, C. S., MARTINS, A., KIM, S. O., REID, G., CHALLIS, J. R., & BOCKING, A. D. Effect of Lactobacillus rhamnosus GR-1 supernatant and fetal sex on lipopolysaccharide-induced cytokine and prostaglandin-regulating enzymes in human placental trophoblast cells: implications for treatment of bacterial vaginosis and prevention of preterm labor. **American journal of obstetrics and gynecology**, v.200, n.5, p.532-e1, 2009.

YOUNG, S.L.; LYDDON, T.D.; JORGENSON, R.L.; MISFELDT, M.L. Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.52, p.67–73, 2004.

ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.J.; ENGELKE, F.; FRANK, J.; KLUG, E.; LEIBOLD, W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. **Theriogenology**, v.60, p209–223, 2003.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, p.4279-4295, 2002.

CAPÍTULO II

Artigo 1

Artigo a ser submetido à revista *Microscopy Research and Technique*,
ISSN 1097-0029

Obtenção de Vesículas Extracelulares de Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo Bovino

CARLA MARTINS DE QUEIROZ¹, CAROLINA NOGUEIRA DE MORAES MAIA¹, LEANDRO MAIA¹, FERNANDA DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA¹, WELERSON RODRIGO SCARANO², JOÃO CARLOS PINHEIRO FERREIRA^{1*}.

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu - SP

²Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu - SP

PALAVRAS-CHAVE exossomos, microvesículas, criopreservação microscopia eletrônica,

RESUMO O tecido adiposo bovino é uma fonte atrativa e abundante de células tronco mesenquimais, com aplicabilidade terapêutica em diversos campos da terapia regenerativa. Sua ação abrange mecanismos parácrinos como secreção de vesículas extracelulares. Devido à escassez de informações para a espécie bovina, o objetivo desse estudo foi isolar células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) de bovinos, avaliar o potencial de diferenciação, características imunofenotípicas, estabilidade cromossomal e viabilidade para criopreservação, bem como a obtenção de vesículas extracelulares (VEs) secretadas. Para isso CTM-TA foram isoladas (n=3) e submetidas a diferenciação e imunocaracterização para confirmar seu fenótipo e estabilidade genotípica. O meio condicionado do cultivo celular foi submetido à ultracentrifugações para obtenção das vesículas extracelulares, que foram

caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão e Western Blot. Foi obtida uma população celular homogênea e fibroblastóide no cultivo celular, com aderência ao plástico, expressando baixos níveis de CD34 e MHCII, e altos níveis de CD29, CD44 e vimentina. As células foram cromossomicamente estáveis, com boa viabilidade antes e após congelamento, e secretaram vesículas de aproximadamente 10 a 200nm de diâmetro, positivas para Alix e CD9 no Western Blot, indicando a presença de exossomos (Exos) em uma população mista VEs. Conclui-se que foi possível isolar, cultivar, caracterizar e criopreservar CTM-TA de bovinos, e estas células secretam VEs no meio condicionado de cultivo.

1. Introdução

Células tronco mesenquimais despertam grande interesse devido aos benefícios potenciais do seu uso terapêutico. O tecido adiposo é um fonte importante de células tronco adultas, e pode ser acessado facilmente com uso de anestesia local, promovendo desconforto mínimo (Schäfler E Buchler, 2007). Células tronco mesenquimais, apresentam morfologia fibroblastóide, crescimento em monocamada e aderência ao plástico. Porém, tais características são inespecíficas e uma caracterização apropriada das células inclui a avaliação de combinação de marcadores de superfície (cluster of differentiation, CD) e a diferenciação nas linhagens mesodermiais, *in vitro* (Taylor e Clegg, 2011).

Pesquisas afirmam que, *in vivo*, o potencial de diferenciação das células tronco contribui minimamente para os efeitos benéficos atribuídos a elas, enquanto a atividade parácrina desempenha papel primordial (Lavoie et al., 2013). Há, inclusive, sugestão para que seu nome seja mudado de células tronco mesenquimais para células de sinalização medicinais, para que não haja alusão ao potencial de diferenciação, que não rege os resultados terapêuticos (Caplan, 2017). Por isso, as vesículas extracelulares (VEs) secretadas pelas células tronco mesenquimais (CTM), constituintes importantes da via parácrina de ação destas células, são alvo de pesquisa. Pouco ainda se sabe sobre a atividade isolada das vesículas extracelulares de CTM bovinas, mas em outras

espécies já foi comprovado que elas possuem potencial para mediar comunicação entre células, promover angiogênese, diferenciação celular e resposta imunológica (De Jong et al., 2014). Para caracterização das vesículas, é importante determinar sua presença e tamanho por microscopia eletrônica, bem como avaliar marcadores de superfície (Thery et al., 2006; Lässer et al., 2012). Além disso, a avaliação da secreção de VEs de células que sofreram criopreservação é importante pois permite o uso de biobancos celulares alogênicos para uma terapêutica futura.

O propósito deste estudo consistiu no isolamento, cultivo e caracterização e criopreservação das células tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo bovino, bem como a isolamento e caracterização das VEs secretadas em meio condicionado de cultivo. Os resultados deste estudo podem contribuir para novas perspectivas com relação ao estudo e utilização terapêutica dos subprodutos das células tronco mesenquimais em bovinos.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Foram utilizados animais *Bos taurus indicus*, raça Nelore (n=3), fêmeas, com idade média de 9 anos, híginas e com escore de condição corporal de 3 a 4. Os animais eram mantidos em pastos com *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral (Minersal®, Presidente Venceslau, SP, Brasil). Os animais selecionados apresentaram valores de proteína plasmática total e hematócrito dentro do padrão de normalidade.

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais, da Universidade Estadual Paulista, sob o protocolo 13/2016 –CEUA. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções internacionais para uso experimental de animais.

2.2. Coleta

Após antissepsia, foi realizado bloqueio anestésico local com lidocaína 2% (Cristália®, BRA), 4 cm abaixo da tuberosidade isquiática direita. Após

incisão e divulsão do tecido subcutâneo, amostras de tecido adiposo foram excisadas (em média 2,0 g de tecido), lavadas em solução fisiológica com penicilina (100 IU/mL), streptomina (100 µg/mL), anfotericina B (3µg /mL) (Thermo Fisher Scientific®, USA) e amicacina (22 µg/mL) (Teuto®, BRA), e então transferidas para tubos contendo meio DMEM alta glicose (Invitrogen Gibco ®, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific®, USA), penicilina (100 UI/mL), streptomina (100 µg/mL), anfotericina B (3µg /mL) e amicacina (22 µg/mL), onde permaneceram por 4 horas sob refrigeração até serem transportadas por 76km para processamento.

2.3. Processamento, isolamento e cultivo das CTM

Para obtenção das células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM/TA), as amostras foram seccionadas manualmente e digeridas em HBSS (Thermo Fisher Scientific®, USA) contendo 0,4% de colagenase (Sigma®, USA) e 0,5% de SFB (Thermo Fisher Scientific®, USA), durante 40 minutos a 37°C, utilizando vortex a cada 10 minutos para homogeneização. A amostra digerida foi filtrada em filtro 70 µm de Nylon (Becton Dickinson and Company®, USA), seguido de centrifugação a 600 g por 4 minutos. O pellet foi ressuspenso em 1 mL meio DMEM alta glicose/F12 (1:1) suplementado com 20% de SFB, penicilina (100 UI/mL), streptomina (100 µg/mL), anfotericina B (3 µg/mL) e amicacina (11 µg/mL) para nova centrifugação e obtenção do pellet final que foi, por sua vez, ressuspenso em 1 mL de meio.

A concentração e viabilidade das células foram realizadas através da diluição do pellet em Azul de tripan 0,4% (Gibco®, USA) e contagem em câmara de Neubauer. As células foram então cultivadas em frascos de 75 cm² na concentração aproximada de 1x10⁵ /frasco. O cultivo aconteceu a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de manutenção (DMEM alta glicose/F12 (1:1) suplementado com 20% de SFB, penicilina (100 UI/mL), streptomina (100 µg/mL), anfotericina B (3 µg/mL) e amicacina (11 µg/mL) foi trocado a cada dois ou três dias, até uma confluência mínima de 80% ser alcançada, quando as células eram então recuperadas por ação de Tripsina (Sigma®, USA) para posterior passagem.

2.4. Citogenética

Em amostras de segunda passagem (P2) foi realizada a análise de cariótipo usando Metotrexato (MTX)/ Timidina (Tdi) como método de sincronização celular (Maia et al., 2013). Para preparação de lâminas, as células foram tripsinizadas a 37°C, fixadas, coradas em Giemsa 5% e analisadas em microscopia de luz. Em cada amostra (n=3), 12 metáfases foram analisadas. Foram avaliados o número de cromossomos e mutações cromossômicas estruturais.

2.5. Análise imunofenotípica

A análise imunofenotípica das CTM-TA (n=3) foi realizada nas células em segunda passagem (n=3) usando um citômetro de fluxo modelo LSRFortessa (BD Biosciences, USA) e software BD FACSDiva™ (BD Biosciences, USA).

Para a análise, os seguintes anticorpos foram usados: anticorpo monoclonal mouse anti-bovino CD44: FITC (clone IL-A118, MCA2433F, AbD Serotec®, UK), rabbit anti-CD-34: FITC (polyclonal, orb247244, Biorbyt®, USA), mouse anti-CD29: Alexa Fluor 647 (clone TS2/16, 303007, BioLegend®, USA), mouse anti-horse MHC-II: FITC (clone CVS20, MCA1085F, AbD Serotec®, UK), mouse anti-vimentin (clone V9, MCA862, AbD Serotec-Rad®, UK), todos com reatividade para a espécie bovina.

Para o anticorpo mouse anti-vimentin as células foram previamente fixadas e permeabilizadas com Cytfix/Cytoperm™ (Becton Dickinson and Company®, USA) e incubação com anticorpo secundário goat-anti mouse:FITC (ab7064, abcam®, USA). Durante a análise foram registrados 10000 eventos.

A análise de viabilidade foi conduzida antes da criopreservação utilizando citômetro de fluxo (LSRFortessa, BD Biosciences, USA) e empregando os marcadores Iodeto de propídio (IP, Sigma, USA) e APC-conjugado à Anexina V (AN, Becton Dickinson and Company, USA). As amostras foram incubadas no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente. Para controle positivo da apoptose, foi utilizado peróxido de hidrogênio

2.6. Ensaios de diferenciação

Amostras em cultura primária (P1), após atingirem confluência de 80%, foram tripsinizadas e plaqueadas na densidade de 1×10^4 CTM/poço em placa de cultivo de 24 poços. Após 24 horas, para realizar os ensaios de diferenciação, o meio de manutenção foi substituído por meio de diferenciação osteogênico ou adipogênico StemPro (Gibco Invitrogen, USA) e as células permaneceram em cultivo durante 8 dias. O meio comercial de diferenciação adipogênico foi suplementado com soro de coelho 5%.

A diferenciação condrogênica foi realizada em pellet 3D em tubos de 1,1mL em densidade de 1×10^4 células durante 21 dias utilizando meio comercial condrogênico StemPro (Gibco Invitrogen, USA). Os meios de diferenciação foram trocados a cada dois a três dias.

Para confirmação da diferenciação osteogênica pela deposição de matriz contendo cálcio, utilizou-se o vermelho de alizarina 2% pH 4,2. Para confirmação da diferenciação adipogênica pela presença de gotículas intracitoplasmáticas de lipídios utilizou-se coloração de Oil red O 0,5% diluído em álcool isopropílico e Hematoxilina e Eosina. Para demonstração da diferenciação condrogênica os pellets foram corados com Alcian blue, pH 2,5, e azul de toluidina, pH 1, para detecção de proteoglicanos.

2.7. Criopreservação

As células em segunda passagem (P2), foram criopreservadas em uma concentração final de 1×10^6 células/criotubo com meio de criopreservação contendo 90% SFB (Thermo Fisher Scientific®, USA) + dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma®, USA), 10 μ L/mL penicillina/streptomicina, 3 μ g/mL anfotericina B. As amostras foram criopreservadas em recipiente criogênico controlado (Mr. Frosty, Nalgene, 5100-001), mantidas durante 24 horas em freezer -80°C para curva de congelação e conservadas em nitrogênio líquido -196°C. As amostras permaneceram criopreservadas por seis meses.

2.8. Descongelamento e expansão das CTM

Realizou-se o descongelamento rápido das amostras a 37°C por 5 minutos, e a viabilidade das células foi realizada através da diluição do pellet em Azul de tripan 0,4% e contagem em câmara de Neubauer. As células foram

plaqueadas em frascos de cultivo de 75 cm², em uma média de 1,4x10⁶ células / frasco, e expandidas até confluência mínima de 80%.

2.9. Isolamento das vesículas extracelulares do meio condicionado

Após passagem para quatro frascos e confluência (quarta passagem, P4), o meio de manutenção (DMEM alta glicose/F12 (1:1), 20% de SFB, penicilina (100 UI/mL), streptomomicina (100 µg/mL), anfotericina B (3 µg/mL) e amicacina (11 µg/mL) foi substituído por meio de mesmos constituintes mas sem SFB, durante 24 horas, para a obtenção das VEs.

Primeiramente, a centrifugação do meio condicionado foi realizada a 2000 g por 20 minutos para retirada de debris celulares e células mortas. Este sobrenadante foi filtrado em filtro 0,22 µm. Então, a fração livre de células e rica em VEs sofreu duas ultracentrifugações a 100000 g por 70 minutos a 4°C, e o pellet finar ela ressuspenso em 500 µL de PBS e armazenado a -80°C.

2.10. Microscopia eletrônica

Para a microscopia das VEs, 20µL da suspensão em PBS foram colocados em parafilme. Uma grade de níquel revestida em Formvar foi colocada sobre a gota e incubada por 60 minutos em câmara umedecida. As grades foram então lavadas sequencialmente em 3 gotas (30 µL) de PBS. A amostra foi fixada em Paraformaldeído 2% por 10 minutos, lavando a grade em seguida com 3 gotas de PBS. Então, a amostra foi incubada em acetato de uranila 2% por 15 minutos e em seguida incubada em metil celulose 0,13% e acetato de uranila 0,4% por 10 minutos. A grade foi colocada para secagem e a amostra foi lida em Microscopia Eletrônica de Transmissão com equipamento Tecnai Spirit (FEI Company), no Centro de Microscopia Eletrônica - CME – IBB, Unesp de Botucatu.

2.11. Extração e quantificação proteica

Para as amostras de VEs destinada à dosagem proteica e Western Blot, realizou-se extração proteica. As amostras foram homogenizadas a 4°C em tampão RIPA (BioRad®, USA) com coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich®, USA). Após serem mantidas em gelo por 5 minutos, foram

homogenizadas em agitador de tubos e centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas foi então coletado.

A quantificação proteica foi realizada como descrito por Bradford (Bradford, 1976) em placas de ELISA, e a leitura realizada em leitor de ELISA (595nm). Utilizou-se o mesmo protocolo para dosagem de proteína do meio condicionado pobre em vesículas.

2.12. Western Blot

Alíquotas (30 µg de proteína) foram tratadas com solução tampão para corrida de gel (Laemli sample buffer – Bio-rad®) e β-mercaptoetanol a 95°C por 1 minuto. Em seguida, as proteínas foram separadas por eletroforese vertical (Miniprotean, BioRad®) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e após a eletroforese, transferidas para a membrana de nitrocelulose em sistema úmido de transferência.

A ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada através da incubação das membranas em BSA 5% em tampão Tris-HCl (TBS) por 30 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram subsequentemente incubadas com os anticorpos primários: monoclonal rabbit anti-CD9 (ab92726, Abcam, Cambridge, UK) e mouse anti-Alix (ab117600, Abcam, Cambridge, UK) diluídos em BSA 3% em Tris-HCl e incubados 4°C overnight. Após lavagem, as membranas foram incubadas em anticorpos secundários (HRP secondary antibody, clone: ab97051, IgG goat-anti rabbit e goat anti-mouse, Abcam Inc.®, Cambridge, USA); diluídos em BSA 3%, contendo 0,2% de Tween 20 (TBST) por 1 hora. Os componentes imunorreativos foram revelados pelo kit luminescente (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate) da Thermo Scientific® (Rockford, USA) e a densidade óptica de cada banda foi avaliada pelo software ImageJ® 1.47 para Windows.

3. Análises Estatísticas

Os resultados de citometria, diferenciação, microscopia eletrônica, dosagem proteica e Western Blot estão apresentados de forma descritiva. Os dados das análises imunofenotípicas e viabilidade celular estão apresentados como média e erro padrão.

4. Resultados

As células apresentaram morfologia fibroblastóide (Figura 1) e aderência ao plástico nas primeiras 12 horas de cultivo. As células apresentaram ótima clonicidade, e após 72 horas de cultivo primário, as amostras já mostraram confluência >80%.

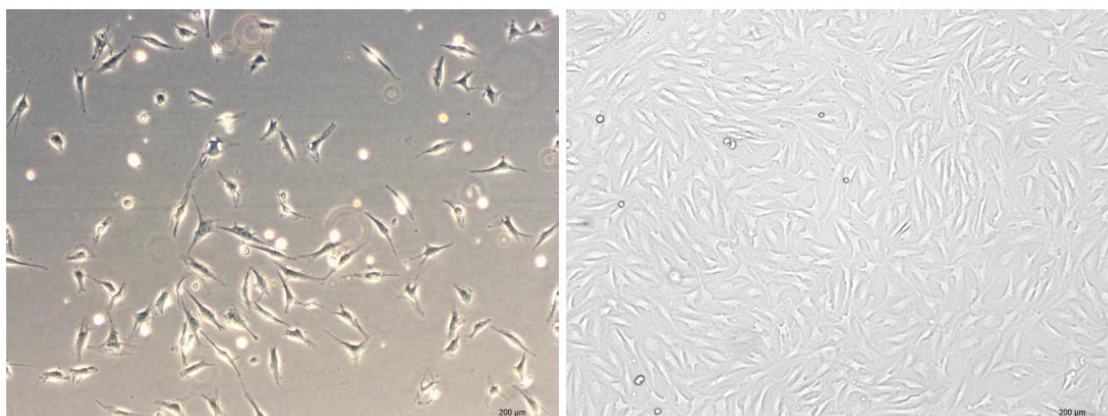


Figura 1. Morfologia fibroblastóide das CTM-TA após 48h e 72 de cultivo. Barra 200µm.

Na análise imunofenotípica, as células apresentaram expressão positiva para os marcadores CD44 ($94,1\pm 2,1\%$), CD29 ($100\pm 0\%$) e Vimentina ($94,7\pm 2,8\%$), baixa expressão para MHCII ($7,3\pm 2,7\%$) e CD34 ($12,9\pm 3,0\%$) (Figura 2). Com relação à viabilidade, os resultados antes do criopreservação celular estão expressos na Tabela 1, e $95,23\pm 1,56\%$ das células apresentavam-se viáveis.

Os ensaios de diferenciação para as linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica foram confirmados em todas as amostras aos 8, 8 e 21 dias de exposição ao meio de diferenciação, respectivamente. Contudo, duas amostras de diferenciação osteogênica começaram a perder aderência ao plástico nos dias finais do ensaio. As células em diferenciação osteogênica adquiriram morfologia predominantemente poligonal, e houve depósito de grandes quantidades de matriz extracelular rica em cálcio, evidenciado pela coloração positiva com Alizarin Red.

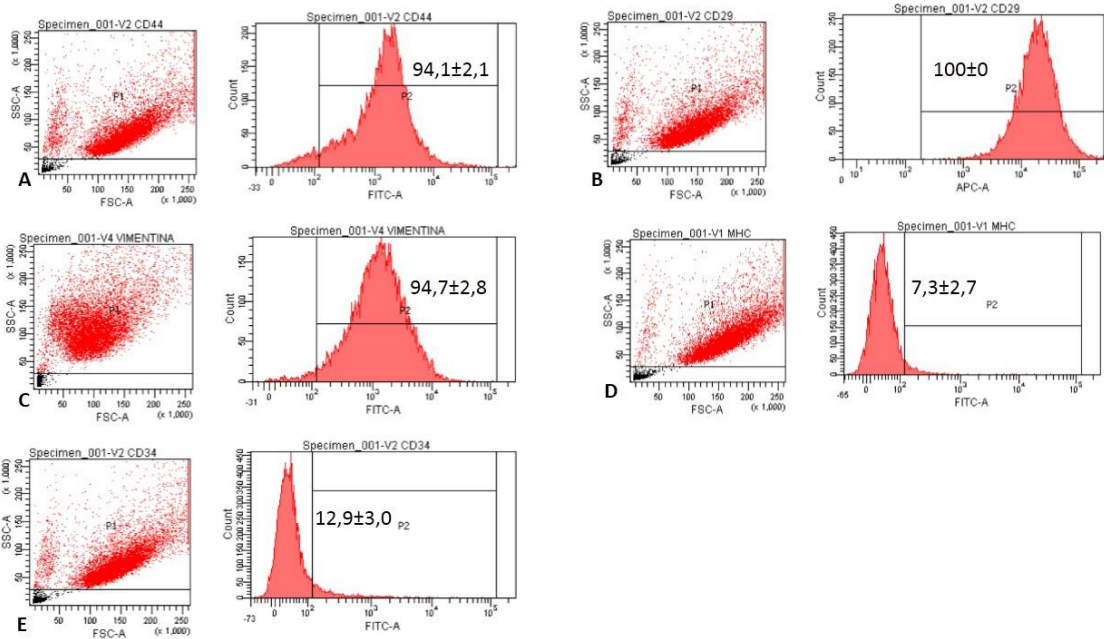


Figura 2. Histograma representativo dos marcadores CD44 (A), CD29 (B), Vimentina (C), MHCII (D) e CD34 (E). Dados apresentados como média e erro padrão da porcentagem;

Tabela 1. Dados da análise de viabilidade das células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino antes da criopreservação usando anexina V (AN) e Iodeto de propídio (IP). Dados expressos como média e erro padrão

Variáveis	Amostras
Viabilidade (PI- AN-)	$95,23 \pm 1,56\%$
Necrose (PI+ AN-)	$0,37 \pm 0,21\%$
Apoptose tardia e necrose (PI+ AN+)	$2,57 \pm 1,22\%$
Apoptose inicial (PI- AN+)	$1,9 \pm 0,62\%$

A diferenciação adipogênica foi confirmada com a coloração de Oil red O, que evidenciou a presença de gotículas de lipídios intracitoplasmáticas. Já na diferenciação condrogênica, houve deposição de matriz rica em proteoglicanos e colágeno tipo II, evidenciados pelas colorações de Azul de Toluidina e Alcian blue.

A análise de citogenética usando a técnica de sincronização celular avaliou o cariótipo das células tronco em segunda passagem, sendo que aneuploidia não foi observada ($2n=60$), revelando um cariótipo normal para a espécie.

A viabilidade celular após descongelamento das células realizada com Azul de tripan 0,4% e contagem câmara de Neubauer foi de $85,22 \pm 10,59$, indicando ótima taxa de sobrevivência celular após criopreservação.

Na microscopia eletrônica de transmissão evidenciou-se inúmeras vesículas arredondadas de aproximadamente 20 a 200 nm de diâmetro (Figura 3) secretadas pelas CTM em cultivo.

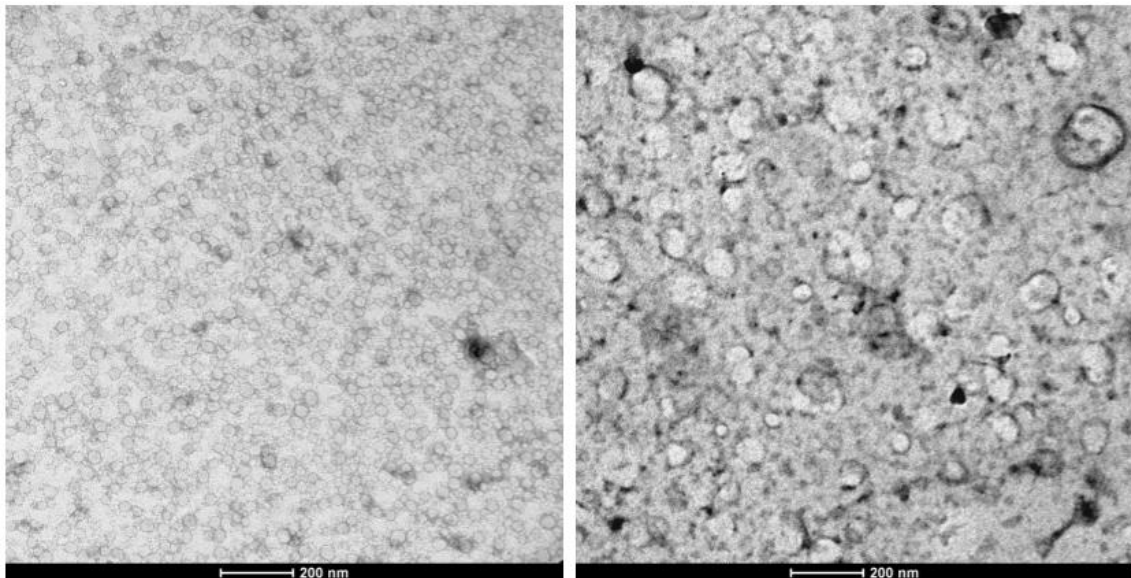


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão das vesículas extracelulares oriundas de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino. Barra 200nm.

A média da quantificação proteica das vesículas, obtido após ultracentrifugação e extração proteica, foi de $4,46 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Já para o meio condicionado pobre em vesículas, a concentração proteica foi de $0,28 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Na técnica de Wester Blot foi possível identificar os anticorpos Alix e CD9 em uma das três amostras, como demonstrado na Figura 4. Alix e CD9 são proteínas da biogênese do corpo multivesicular e de superfície, respectivamente, e são usadas para caracterizá-los.

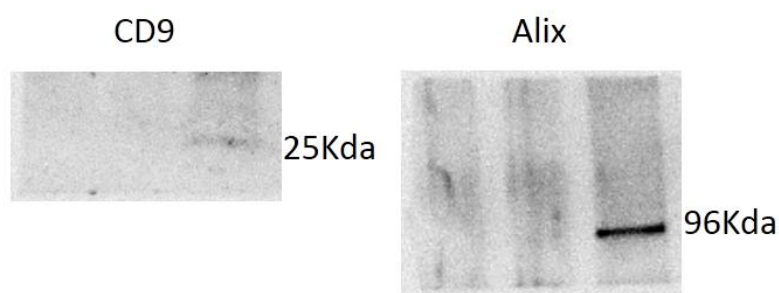


Figura 4. Ensaio de Western Blot (WB) de exossomos oriundos de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino.

5. Discussão

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que descreve sobre isolamento e caracterização de vesículas extracelulares de CTM de tecido adiposo bovino. As CTM isoladas de tecido adiposo bovino foram caracterizadas de acordo com os critérios pré-estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular para CTM humanas (Dominici et al., 2006). As células apresentaram aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, alta expressão de marcadores para células tronco, baixa imunogenicidade, e diferenciação nas linhagens mesodermis osteogênica, adipogênica e condrogênica. Diferentemente de humanos, que possuem um painel de marcadores de superfície específicos para células tronco (Schäffler e Büchler, 2007), marcadores de células tronco mesenquimais para bovinos ainda não são totalmente estabelecidos e dependem por vezes da reação cruzada entre anticorpos.

A expressão de CD44 e CD29 já foi reportada em células mesenquimais de cordão umbilical bovino (Xiong et al., 2014). A marcação positiva para vimentina foi constatada também em células mesenquimais derivadas de líquido amniótico e tecido endometrial bovino (Rossi et al., 2014, Moraes et al., 2017). A baixa expressão de MHCII, por sua vez, indica baixo potencial em causar imunogenicidade frente ao seu uso terapêutico (Javazon et al., 2004). A marcação baixa de CD34 demonstra ausência de quantidade significativa de células da linhagem hematopoiética, assegurando a pureza da amostra

(Schaffler e Büchler, 2007). As análises imunofenotípicas foram realizadas com células em segunda passagem. Talvez em posteriores passagens a pureza das células fosse ainda maior e a marcação para CD34 ainda menor do que a encontrada.

As CTM-TA diferenciaram-se em três linhagens mesodérmicas, corroborando com Gimble e Guilak (2003) e Lin et al (2006) que relatam habilidade de expansão das CTM-TA e capacidade de diferenciar-se em linhagem adipogênica, osteogênica, condrogênica *in vitro*.

Ao ficarem muito tempo em cultivo, células tronco podem ter as taxas de viabilidade reduzidas devido à instabilidade cromossômica e encurtamento da telomerase que culmina com a perda funcional de genes relacionados ao desenvolvimento celular (Cunha et al., 2014). Foi demonstrado neste estudo estabilidade cromossomal e ausência de aneuploidia após as técnicas de isolamento e cultivo ($2n=60$). Isso vai de encontro ao resultado encontrado por Moraes et al (2016) em CTM de tecido endometrial bovino e Maia et al., (2013) em CTM de medula óssea equina.

Cunha et al (2014) demonstraram boas taxas de viabilidade após descongelamento de células tronco de cordão umbilical e líquido amniótico em bovinos. Isso se dá pois a criopreservação usa DMSO que é uma solução protetora, que quando combinada com redução lenta de temperatura, resulta em forma eficiente de congelamento. No presente estudo as células também foram expandidas cultivadas de forma eficiente após o descongelamento rápido, possibilitando a formação de bancos celulares para uso futuro.

Através da microscopia eletrônica, este estudo demonstrou que as VEs derivadas de CTM-TA continham uma população mista de exossomos (30 a 150nm, Mathivanan et al., 2010) e microvesículas (100 – 1000nm, Thery et al., 2001). Estudos prévios já indicaram a dificuldade em isolar as populações de exossomos da de microvesículas (Barile et al., 2012; van der Pol et al., 2012).

Nós encontramos alguma variação na quantidade de proteínas/ μ L entre os pellets, embora não fosse o objetivo analisar o secretoma das vesículas já se sabe que há centenas de proteínas nas vesículas extracelulares (Kim et al, 2012; Keerthikumar et al., 2016).

Com uma combinação de métodos é possível caracterizar exossomos, incluindo determinação de seu tamanho, morfologia e pureza da amostra por microscopia eletrônica, além da avaliação do seu conteúdo e marcadores de superfície por citometria de fluxo ou Western Blot (Lässer et al., 2012). No Western Blot houve marcação para Alix, que é um marcador endocítico de corpo multivesicular de 96kDa (Thery, 2006), bem como para CD9, uma tetraspanina de 25KDa (Lässer et al., 2012), ambos presentes em exossomos.

Contudo, no presente estudo, o ensaio de diferenciação osteogênica poderia ter sido realizado em menos tempo para evitar que duas amostras começassem a perder aderência ao plástico. Além disso, a marcação para Alix e CD9 no Western Blot foi possível em apenas uma das 3 amostras. Western Blot foi feito apenas de maneira qualitativa, e como à microscopia eletrônica de transmissão, todas as amostras apresentaram vesículas semelhantes, uma amostra positiva parece suficiente para caracterização. As alíquotas destinadas para ensaio de Western Blot não foram suficientes para inúmeras repetições.

6. Conclusão

Este estudo demonstrou o sucesso no isolamento, cultivo e caracterização das CTM-TA de bovinos, que apresentaram boa viabilidade antes e após descongelamento. Ademais, no meio condicionado de cultivo celular das CTM-TA foi demonstrada a produção de exossomos em uma população mista de vesículas extracelulares, o que possibilita novos estudos sobre aplicações terapêuticas para a espécie.

7. Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer à CAPES pela bolsa concedida, aos técnicos da Unipex, dentre eles Ana Paula Doria, que nos auxiliaram nas ultracentrifugações, e aos técnicos do Centro de Microscopia Eletrônica, em especial Shelly Carvalho, que nos ajudou no processamento das vesículas. Agradecemos também à Fazenda Marino, em Avaré – SP, pela concessão dos animais.

Os autores asseguram não haver conflito de interesse.

8. Referências

- Barile L, Gherghiceanu M, Popescu LM, Moccetti T, Vassalli G. 2012. Ultrastructural evidence of exosome secretion by progenitor cells in adult mouse myocardium and adult human cardiospheres. *J Biomed Biotechnol* 1–10.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal Biochem*, 72, 248–254
- Caplan, A. I. 2017. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem cells Transl Med*, 6(6), 1445-1451.
- Cunha ER, Martins CF, Silva CG, Bessler HC, Bão SN. 2014. Effects of prolonged *in vitro* culture and cryopreservation on viability, DNA fragmentation, chromosome stability and ultrastructure of bovine cells from amniotic fluid and umbilical cord. *Reprod Domest Anim* 49: 806-8012.
- De Jong OG, Van Balkom BWM, Schiffelers RM, Bouten CVC, Verhaar MC. 2014. Extracellular vesicles: potential roles in regenerative medicine. *Front Immunol* 5(608):1-13.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
- Gimble J, Guilak F. 2003. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5: 362–369.
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. 2004. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32:414–425.
- Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, Samuel M, Pathan M, Jois M, Chilamkurti N, Gangoda L, Mathivanan S. 2016. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol* 428:688–692.
- Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, Kim DW. 2012. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Prot Res* 11: 839–849.

Lässer C, Eldh M, Lötvall J. 2012. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Visual Exp* 59:3037.

Lavoie JR, Rosu-Myles M. 2013. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 95(12):2212-2221.

Lin Y, Chen X, Yan Z et al. 2006. Multilineage differentiation of adipose derived stromal cells from GFP transgenic mice. *Mol Cell Biochem* 285: 69–78.

Maia L, Landim-Alvarenga FC, Mota LSLS, Golim MA, Laufer-Amorim R, De Vita B, Barberini DJ, Listoni AJ, Moraes CN, Heckler MCT, Amorim RM. 2013. Immunophenotypic, immunocytochemistry, ultrastructural and cytogenetic characterization of mesenchymal stem cells from equine bone marrow. *Micros Res Tech* 76:618-624

Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ. 2010. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature, *Mol Cell Proteomics: MCP* 9: 197–208.

Moraes CN, Maia L, Camargos MD, Freitas-Dell' Aqua CP, Mota LSLS, Chapwanya A, Landim-Alvarenga FC, Oba E. 2016. Bovine endometrial cells: a promising source of mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biol Int* 40:1332-1339.

Moraes CN, Maia L, Oliveira E, Dell'Aqua CDPF, Chapwanya A, Landim-Alvarenga FC, & Oba E. 2017. Shotgun proteomic analysis of the secretome of bovine endometrial mesenchymal progenitor/stem cells challenged or not with bacterial lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol* 187:42-47.

Rossi B, Merlo B, Colleoni S, Iacono E, Tazzari PL, Ricci F, Lazzari G, Galli C. 2014. Isolation and in vitro characterization of bovine amniotic fluid derived stem cells at different trimesters of pregnancy. *SCRR* 10(5): 712-724.

Schäffler A, Büchler C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells—basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem cells* 25(4): 818-827.

They C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. 2001. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a

secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166: 7309–18.

Van der Pol E, Boing AN, Harrison P, Sturk A, Nieuwland R. 2012. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev* 64: 676–705.

Xiong H, Bai C, Wu S, Gao Y, Lu T, Hu Q, Guan W, Ma Y. 2014. Biological characterization of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord. *Anim Cells Syst* 18: 56-67.

Link para normas da revista:

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1097-0029/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1097-0029/homepage/ForAuthors.html)

CAPÍTULO III

Artigo 2

Artigo a ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira, ISSN 1678-5150

Vesículas extracelulares e meio condicionado de células tronco mesenquimais: potencial imunomodulador em células endometriais bovinas?

Carla M. Queiroz¹; Carlos E. Fonseca-Alves², Carolina N.M. Maia¹; Fernanda C. Landim-Alvarega¹; João C.P. Ferreira^{1*}

ABSTRACT - Queiroz, C.M., Alves, C.E.F., Maia, C.N.M., Landim-Alvarenga, F.C. & Ferreira, J.C.P. 2017. **[Extracellular vesicles and conditioned medium of mesenchymal stem cells: immunomodulatory potential in bovine endometrial cells *in vitro*?**]. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Distrito de Rubião Jr. s/n, Botucatu – SP. 18618-970. Brazil. *Correspondence author: jcferreira@fmvz.unesp.br.

The stem cells act primarily through paracrine and immunomodulatory mechanisms. The objective of the present study was to evaluate the immunomodulatory effects of extracellular vesicles (V) and conditioned medium (CM) from mesenchymal stem cells of bovine adipose tissue in an *in vitro* culture of bovine endometrial explants challenged with lipopolysaccharide (LPS) 3 µg/ml. For this purpose, bovine endometries from slaughterhouse (n = 7) were used, cultured and challenged with LPS. The experimental groups were CN (negative control, no challenge with LPS), CP (positive control, challenge with LPS only), V (extracellular vesicles, challenge and addition of vesicles) and MC (conditioned medium, challenge and addition of medium). Secretion of PGF2α and IL-1β by Elisa, tissue morphology through histology, tissue expression of Fas-L, TLR-4, PGDH and PGF2α by immunohistochemistry was evaluated. There was no treatment effect in PGF2α and IL-1β secretion. In histology, there were morphological changes such as hypertrophy, atrophy and cellular hyperplasia, as well as dilation of the glandular lumen, regardless of the treatment. There was a significant decrease in the density of the glands after culture, although the

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Distrito de Rubião JR s/n, Botucatu SP. 18618-970. *jcferreira@unesp.br

²Departamento de Clínica Veterinária, FMVZ, UNESP.

glandular diameter did not change significantly. Regarding TLR-4, PGDH and PGF2 α , there was greater expression regardless the treatment. In the Fas-L, there was intermediate expression for the CN. However, there was no statistical difference. These findings point to inflammation in the *in vitro* culture model that overlapped the effects of challenge with LPS. However, there was no significant immunomodulatory effect with V or MC treatment, indicating that the immunomodulatory process may not be restricted to the tissue but maybe to the immune system present *in vivo*.

INDEX TERMS: exosomes, microvesicles, LPS, explant

RESUMO - As células tronco agem principalmente através de mecanismos parácrinos e imunomoduladores. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos imunomoduladores de vesículas extracelulares (V) e meio condicionado (MC) oriundos de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino em um cultivo *in vitro* de explantes endometriais bovinos desafiados com lipopolissacarídeo (LPS) 3 μ g/ml. Para isso foram utilizados endométrios bovinos provenientes de abatedouro (n=7) e submetidos a cultivo e desafio com LPS. Os grupos experimentais foram CN (controle negativo, sem desafio com LPS), CP (controle positivo, apenas desafio com LPS), V (vesículas extracelulares, desafio e adição de vesículas) e MC (meio condicionado, desafio e adição de meio). Avaliou-se secreção de PGF2 α e IL-1 β por Elisa, morfologia do tecido através de histologia, expressão tecidual de Fas-L, TLR-4, PGDH e PGF2 α por Imunoistoquímica. Não houve efeito de tratamento na secreção de PGF2 α e IL-1 β . Na histologia houve mudanças morfológicas como hipertrofia, atrofia e hiperplasia celular, bem como dilatação do lúmen glandular, independente do tratamento. Houve diminuição significativa na densidade das glândulas após cultivo, embora o diâmetro glandular não tenha variado de forma significativa. Com relação à marcação de TLR-4, PGDH e PGF2 α , houve maior expressão independente do grupo experimental. Já no Fas-L, houve marcação intermediária para o CN, contudo sem diferença estatística. Estes achados apontam para inflamação no modelo *in vitro* de cultivo que se sobrepôs aos efeitos do desafio com LPS. Contudo, não houve efeito imunomodulatório significativo com o tratamento de V ou MC, indicando que o processo

imunomodulador pode não estar restrito ao tecido mas sim ao sistema imune presente *in vivo* no animal.

TERMOS INDEXADORES: exossomos, microvesículas, LPS, explante

1. Introdução

A endometrite é a condição na qual vacas falham em eliminar os contaminantes bacterianos uterinos (Sheldon e Dobson 2004). Doenças uterinas como a endometrite são altamente prevalentes em bovinos e levam a grandes perdas econômicas (Bartlett et al. 1986, Leblanc et al. 2002, Gilbert et al., 2005). Embora mais de 70% das vacas consiga eliminar as bactérias uterinas com resposta imune inata, 17% a 37% desenvolvem endometrite clínica enquanto 14% a 53% desenvolvem endometrite subclínica (Kim e Kang 2003; Gilbert et al. 2005; Cheong et al. 2011, Madoz et al. 2014).

Sheldon et al. (2009) and Drillich et al. (2001) estimam que os custos com doença uterina em bovinos associada à infertilidade chegam a U\$ 650 milhões por ano nos Estados Unidos. Além disso, os custos com tratamentos convencionais, a frequência de sua administração e o descarte do leite após o tratamento tornam esta abordagem antieconômica. Desta forma, terapias alternativas que estimulem a defesa natural do útero têm sido sugeridas como tratamento na endometrite bovina (Hussain e Daniel 1991).

Uma alternativa emergente está relacionada ao emprego de terapia utilizando CTM e os subprodutos do seu cultivo, tais como as vesículas extracelulares (VEs) e fatores solúveis presentes no meio. Os principais efeitos das células tronco são desencadeados por mecanismos parácrinos, sendo o efeito imunomodulador uma das principais resposta terapêutica (Caplan 2009, Den Haan et al. 2012, VanKoppen et al. 2012).

As VEs desempenham importante papel em muitos processos biológicos incluindo comunicação intercelular e imunomodulação (Janowska-Wieczorek et al. 2005, Van Balkom et al. 2013, Xu e Tahara 2013) e possuem maior eficácia terapêutica que as células tronco das quais se originaram. Esse efeito possivelmente ocorre devido à demora na sua degradação no sítio de lesão (Collino et al. 2010, Martinez e Andriantsitohaina 2011, Shai e Varon 2011).

Os fatores solúveis presentes no meio condicionado (MC) de cultivo das células tronco mesenquimais (CTM), como fatores de crescimento e hormônios, possuem papéis conhecidos na prevenção da apoptose ou regulação das respostas imune e inflamatória (Lavoie et al. 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos imunomoduladores de VEs e MC pobre em vesículas oriundos de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino em um cultivo *in vitro* de explantes de endométrio bovino desafiado com LPS. Este trabalho parte da hipótese que as vesículas extracelulares e o meio condicionado das células tronco mesenquimais são capazes de apresentar ação imunomoduladora em tecido endometrial, frente à inflamação.

2. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais, da Universidade Estadual Paulista, sob o protocolo 13/2016 –CEUA.

2.1. Obtenção de meio condicionado e vesículas extracelulares

Células tronco de tecido adiposo (CTM-TA) bovino (n=3), após serem isoladas e cultivadas, foram caracterizadas pela morfologia fibroblastóide e aderência ao plástico, imunomarcção positiva para CD44, CD29 e Vimentina, baixa marcação para MHCII e CD34, bem como sucesso na diferenciação celular nas linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica (Queiroz et al., 2016a). Após as células serem criopreservadas por 6 meses para simular um biobanco celular, elas foram descongeladas e expandidas. Após confluência, o meio de cultivo foi substituído por meio sem SFB para causar estresse nas células e porque o próprio SFB poderia conter VEs e representar um viés. As vesículas secretadas em cultivo e o meio condicionado pobre em vesículas foram então obtidos através de centrifugação a 20000g, filtração em filtro de 0,22 µm e duas ultracentrifugações a 100000g, e armazenados a -80°C (Queiroz et al., 2016b).

Para o teste funcional, após descongelamento, foi obtido um pool das VEs e dos MC secretados (n=3) para posterior utilização.

2.2. Delineamento experimental

Os úteros (n=7) que apresentavam endométrio macroscopicamente de aspecto homogêneo e livre de inflamação, em fase luteínica I a IV (Ireland et al. 1980), foram obtidos de abatedouro logo após abate e foram mantidos em HBSS (Thermo Fisher Scientific®, USA) e transportando sob refrigeração (5°C), durante uma hora, até o Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (Lança).

Um dos cornos uterinos, selecionado ao acaso sequencialmente lavado em álcool 70% (Chapwanya et al. 2013) e HBSS com penicilina (100 UI/mL), streptomomicina (100 µg/mL), anfotericina B (3 µg/mL) (Thermo Fisher Scientific®, USA) e amicacina (22µg/mL) (Teuto®, BRA). Subsequentemente, o tecido endometrial foi separado do miométrio por avulsão e fragmentos de 1 mm³ foram manualmente obtidos. Os fragmentos foram pesados e amostras contendo 50 mg de tecido endometrial foram transferidas para placas de 6 poços. Cada poço foi previamente preenchido com 2,5 ml de meio base [DMEM alta glicose contendo 10% de soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomomicina, 2,5 µg de anfotericina, 10 µl/ml de ITS (insulina, transferrina e selênio)]. Após 24 horas de cultivo em estufa a 37°C a 5% de CO₂, em atmosfera úmida, o meio base foi trocado por meio contendo os seguintes tratamentos:

- Controle negativo (CN): meio base;
- Controle positivo (CP): meio base + 3 µg /mL de LPS (*E. coli* serotype 0111: B4, Sigma);
- Vesícula (V): meio base + vesículas extracelulares (750 µg de proteínas) + 3 µg /mL de LPS;
- Meio condicionado (MC): 2,5 ml de meio condicionado (700µg de proteína) + 3 µg /mL de LPS.

A seguir as placas retornaram ao cultivo onde permaneceram por mais 48 horas, quando foram obtidas amostras do sobrenadante, que foram armazenadas em freezer a -20°C, e dos explantes, que permaneceram fixados em formol tamponado 10%.

2.3. Dosagens

As amostras do sobrenadante foram empregadas para a dosagem da concentração de PGF₂α e Interleucina-1β (IL1β) por ELISA (Enzyme Linked

ImmunonoSorbent Assay), empregando-se, respectivamente, os kits comerciais PGF2 α (Cayman®, Ann Arbor, USA) e IL1- β (Genorise®, Devon-Berwyn, USA).

Para o ensaio de PGF2 α foi realizada as amostras foram diluídas (1:1000). Além das amostras, a concentração PGF2 α foi determinada também no meio base e no meio MC. Esses valores foram subtraídos da concentração obtida nas amostras, de acordo com cada tratamento, para a determinação da concentração de real de PGF2 α .

A concentração de IL-1 β também foi dosada nas amostras e no meio base e MC, e a concentração real da interleucina foi do mesmo modo já descrito para a PGF2 α .

Os ensaios foram realizados segundo as recomendações do fabricantes e os limites de detecção para PGF2 α e IL-1 β foram, respectivamente, de 3,9-500 e 1-5000 pg/ml.

2.4. Histopatologia

Para a avaliação histopatológica, os explantes foram emblocados em parafina e cortes de 5 μ m de espessura foram acondicionados em lâminas de vidro (STARFROST, Knittel) e corado por Hematoxilina e Eosina (H&E) (Chapwanya et al. 2010; Moraes et al., 2016).

A leitura das lâminas foi realizada por dois avaliadores, do forma cega, sob microscopia de luz em aumento de 400x, de acordo com o preconizado por Bonnet et al. (1991) e Chapwanya et al. (2012).

De acordo com o preconizado por Thompson et al. (2011) foi empregada uma gradícula de 1cm² e quantificadas, em 5 campos microscópicos (400x), o número de glândulas endometriais. Adicionalmente foram determinados os diâmetros de 10 glândulas por lâmina e avaliada a morfologia do tecido com especial destaque às características do epitélio glandular.

2.5. Imunoistoquímica

Os explantes foram submetidos à imunoistoquímica usando os métodos de peroxidase e DAB. As lâminas foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em etanol graduado. Para recuperação antigênica, as lâminas foram incubadas em tampão de citrato (pH 6.0) por 30 minutos em panela de pressão (PascalVR; Dako,

Carpinteria, USA). As lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 8% em metanol, por 10 minutos, para inibição da atividade da peroxidase endógena.

Os anticorpos primários contra PGDH (sc-98907; rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology – Inc; Dallas, USA), Fas-L (sc-956; rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology – Inc; Dallas USA) e PGF2 α -R (cs-67029 rabbit polyclonal IgG) foram utilizados na diluição 1:200 e contra o TLR-4 (sc-10741; rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology – Inc; Dallas, USA) na diluição 1:50 a 4°C overnight.

Então, um polímero, sistema baseado na peroxidase, foi aplicado (code: K4061, EnVision, Dako, Carpinteria, CA) e 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorato (code: K3468, DAB, Dako, Carpinteria, CA) foi utilizado como cromógeno para revelação por 5 minutos, contra coradas com hematoxilina de Harris (code: 2072, Dinamica, Diadema, Brazil) e reidratadas em álcool para posterior montagem (Fonseca-Ales, 2013 modificado).

A leitura das lâminas foi realizada por dois avaliadores, de forma cega, sob microscopia de luz em aumento de 400x. Foram avaliados estroma e epitélio glandular separadamente. A avaliação utilizou um sistema de escore semi-quantitativo para codificar a distribuição e intensidade da imunomarcação (Fonseca-Alves et al., 2017 modificado). Para distribuição, escore 1 representa <25% de células coradas; escore 2: >25% e <50%; escore 3: >50 e <75%; e escore 4: >75%. Para intensidade, escore 0 representa célula não marcada, 1 representa célula fracamente marcada, 2: moderadamente marcada e 3: fortemente marcada. Os escores determinados em cada uma das avaliações foram multiplicados e o resultado do produto obtido foi denominado de índice de imunomarcação e empregado para expressar os resultados.

As lâminas foram fotografadas usando microscópio óptico Leica DM50® equipado com uma câmera 186 Leica® DC300F, sob aumento de 400X.

3. Análises estatísticas

Os efeitos dos tratamentos na secreção de PGF2 α e IL-1 β , quantidade e diâmetro das glândulas endometriais foram analisados com análise de variância (ANOVA) unidirecional não paramétrica, seguida pelo teste de Tukey, para determinar os efeitos dos tratamentos na secreção de PGF2 α e IL-1 β , quantidade e

diâmetro das glândulas endometriais, ou seguida pelo teste de Mann Whitney, para os resultados da imunomarcção. Foram considerados como diferença estatística valores de $P < 0,05$. Utilizou-se o programa SAS 9.3 (SAS Institute 2011) e GraphPad 5 (San Diego, USA) para análises e confecção dos gráficos.

4. Resultados

Apesar dos elevados valores de $\text{PGF2}\alpha$ presentes nas amostras do meio de cultivo 48 horas após o desafio com LPS, não foi observado efeito de tratamento, ou seja, os grupos CN, CP, V e MC não diferiam entre si ($P=0,73$). Do mesmo modo, não foi verificado efeito de tratamento para as concentrações de $\text{IL-1}\beta$ ($P=0,79$, Figura 1).

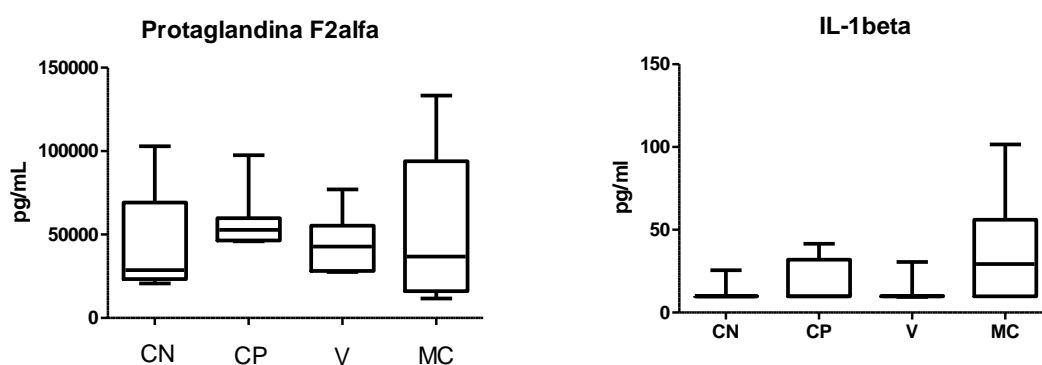


Figura 1. Boxplot da concentração de $\text{PGF2}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ (pg/mL) no explante de endométrio bovino. CN: controle negativo, CP: controle positivo, V: tratamento com vesículas extracelulares, MC: tratamento com meio condicionado ($n=7$, $P=0,73$ e $P=0,079$, respectivamente)

Na avaliação da histopatologia dos tecidos endometriais, as glândulas antes do cultivo apresentaram epitélio colunar simples. Após o cultivo em todos os tratamentos, surgiram alterações morfológicas como atrofia, hipertrofia, hiperplasia do epitélio das glândulas e dilatação glandular, que apareceram de modo indistinto em todos os tratamentos (Figura 2, Tabela 1).

Além disso, observou-se diminuição significativa no número de glândulas em todos os tratamentos ($P=0,009$) às 48 horas pós desafio com LPS. Não houve efeito de tratamento no diâmetro das glândulas endometriais ($P=0,45$) (Figura 3).

A imunomarcção tecidual em estroma e glândula para os anticorpos Fas-L ($P=0,0059$ e $P=0,0093$), TLR-4 ($P=0,0047$ e $P=0,008$), PGDH ($P=0,0240$ e $P=0,0262$) e PGF2 α -R ($P=0,0159$ e $P=0,0241$) estão expressos nas Figuras 4-7. Apesar de ter havido notável diferença entre o Antes e os demais tratamentos, em nenhum dos anticorpos a imunomarcção foi diferente entre CN e CP. Na imunomarcção do Fas-L, o CN apresentou valores intermediários mas não diferiu entre os outros tratamento. Também não houve diferença na imunomarcção entre os tratamentos CP, V e MC para nenhum dos anticorpos testados.

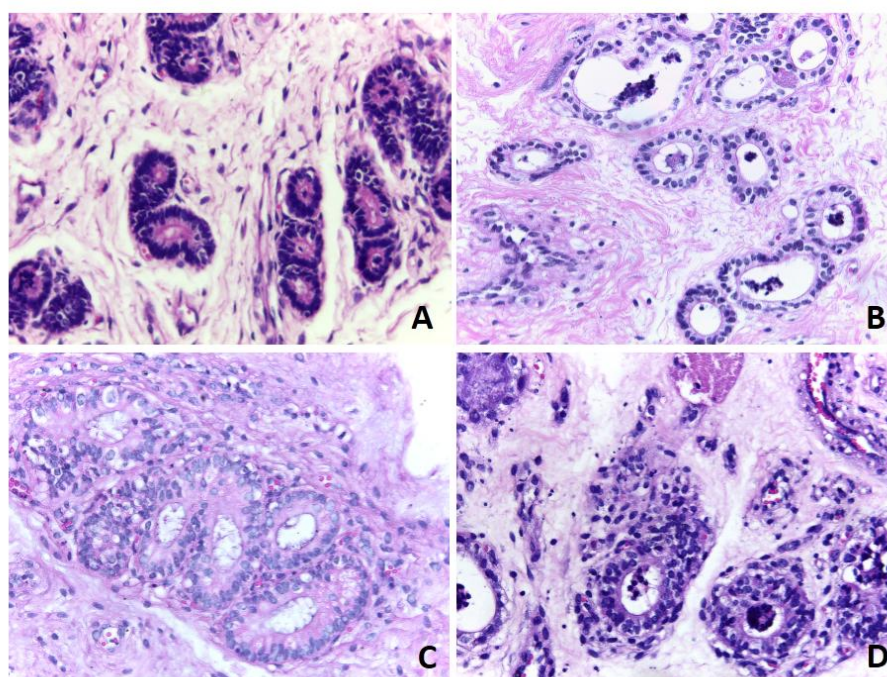


Figura 2. Histologia das glândulas endometriais. A – antes, B, C, D - 48 horas após desafio com LPS. Independente do tratamento observou-se dilatação da glândula e atrofia do epitélio glandular (B), hipertrofia do epitélio das glândulas (C) e hiperplasia do epitélio das glândulas (D). Aumento 400x, hematoxilina eosina.

Tabela 1. Frequência das alteração histológica observadas nos explantes endometriais bovinos após desafio com LPS. CN: controle negativo, CP: controle positivo, V: tratamento com vesículas extracelulares, MC: tratamento com meio

condicionado. EG CS – epitélio glandular colunar simples; EG HT – epitélio glandular hipertrófico; EG AT - epitélio glandular atrófico; EG HP - epitélio glandular hiperplásico; Dilatação – dilatação do diâmetro do lúmen glandular.

	<i>EG CS</i>	<i>EG HT</i>	<i>EG AT</i>	<i>EG HP</i>	<i>Dilatação</i>
Antes	7 100%	0 0%	0 0%	0 0%	0 0%
CN	0 0%	4 36%	2 18%	1 9%	4 36%
CP	0 0%	1 9%	4 36%	1 9%	5 45%
V	0 0%	3 21%	5 36%	1 7%	5 36%
MC	0 0%	1 8%	5 38%	2 15%	5 38%

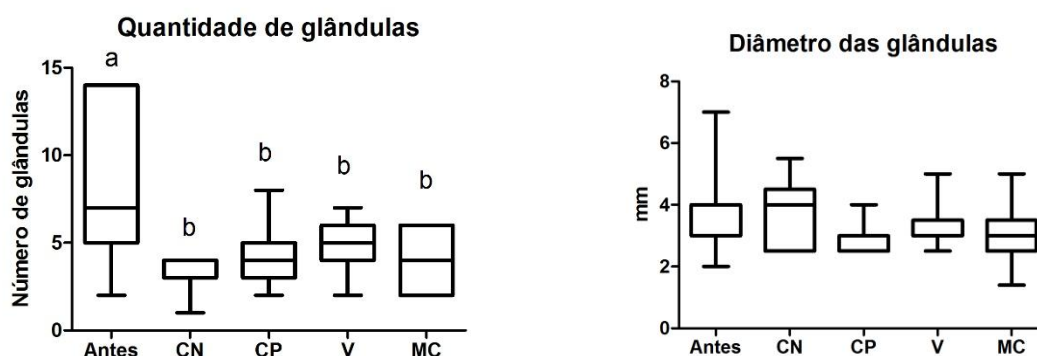


Figura 3. Quantidade média de glândulas endometriais bovinas observadas em 5 campos microscópicos sob aumento de 400x e diâmetro médio das glândulas endometriais. Antes - amostra não cultivada, CN: cultivo sem desafio de LPS, CP: desafio com LPS sem tratamento, V: desafio com LPS e tratamento com vesículas, MC: desafio com LPS e tratamento com meio condicionado. (Teste Anova, $n=7$, $P=0,009$ e $P=0,485$, respectivamente).

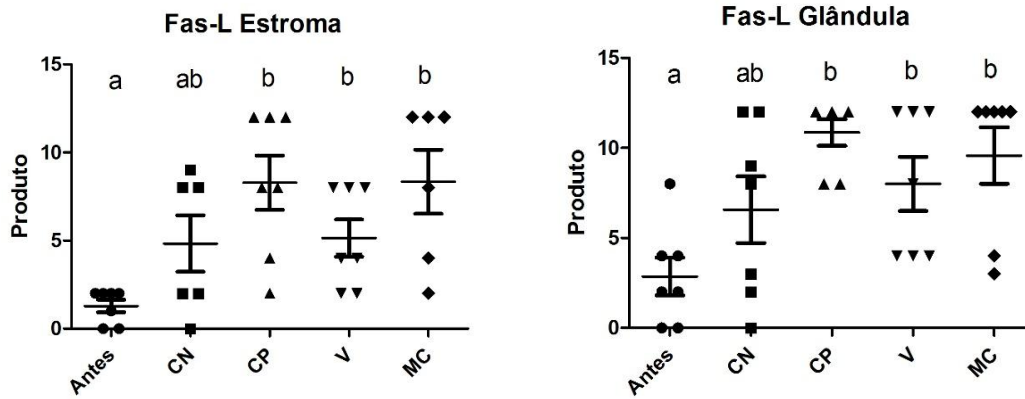


Figura 4. Índice de imunomarcção para Fas-L nas glândulas e estroma endometriais bovinos 48 horas após desafio com LPS. Antes: amostra não cultivada, CN: controle negativo (sem desafio), CP: controle negativo (desafio com LPS apenas), V: desafio com LPS e tratamento com vesículas, MC: desafio com LPS e tratamento com meio condicionado (n=7, p=0,0059 e p=0,0093, respectivamente)

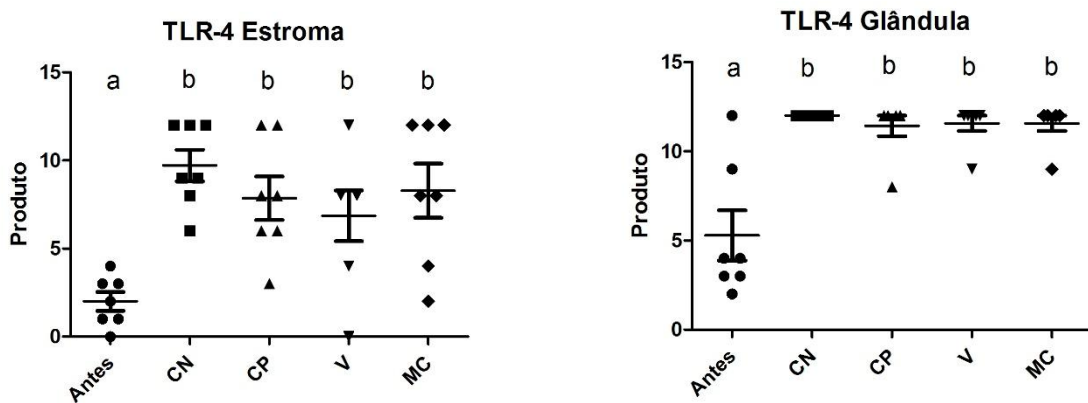


Figura 5. Índice de imunomarcção para TLR-4 nas glândulas e estroma endometriais bovinos 48 horas após desafio com LPS. Antes: amostra não cultivada, CN: controle negativo (sem desafio), CP: controle negativo (desafio com LPS apenas), V: desafio com LPS e tratamento com vesículas, MC: desafio com LPS e tratamento com meio condicionado (n=7, P=0,0047 e P=0,008, respectivamente).

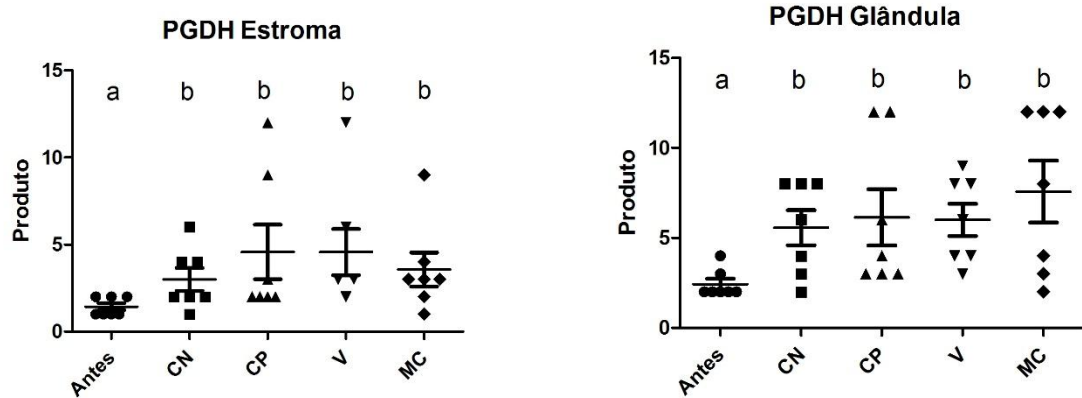


Figura 6. Índice de imunomarcção para PGDH nas glândulas e estroma endometriais bovinos 48 horas após desafio com LPS. Antes: amostra não cultivada, CN: controle negativo (sem desafio), CP: controle negativo (desafio com LPS apenas), V: desafio com LPS e tratamento com vesículas, MC: desafio com LPS e tratamento com meio condicionado (n=7, $P=0,0240$ e $P=0,0262$).

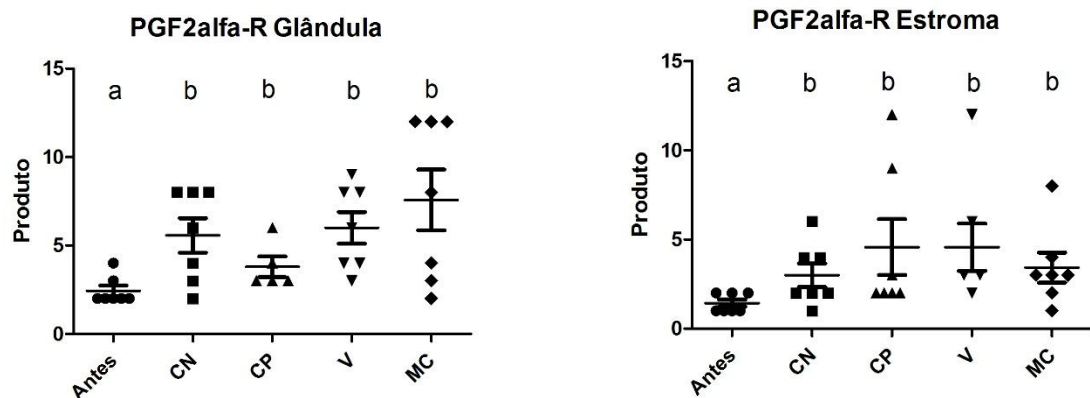


Figura 7. Índice de imunomarcção para PGF2 α -R nas glândulas e estroma endometriais bovinos 48 horas após desafio com LPS. Antes: amostra não cultivada, CN: controle negativo (sem desafio), CP: controle negativo (desafio com LPS apenas), V: desafio com LPS e tratamento com vesículas, MC: desafio com LPS e tratamento com meio condicionado (n=7, $P=0,0159$ e $P=0,0241$, respectivamente).

5. Discussão

Até o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que utiliza vesículas extracelulares e meio condicionado provenientes de Células Tronco Mesenquimais de tecido adiposo bovino com o objetivo de imunomodular resposta inflamatória do tecido endometrial bovino.

O trato reprodutivo inicialmente responde à infecção através do sistema imune inato e mecanismos de defesa da mucosa (Sheldon et al., 2006; Gilbert et al., 2005). As células endometriais respondem ao LPS a partir do seu reconhecimento pelo Toll-like receptor 4 (TLR-4) (Davies et al. 2008; Heralth et al. 2009) que, quando ativado, induz a produção de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas e prostaglandinas pelas células (Akira et al., 2004; Li et al., 2002). No endométrio bovino, as células epiteliais e estromais secretam prioritariamente $\text{PGF2}\alpha$ e PGE_2 , nesta ordem (Asselin et al. 1996).

Contudo, nenhum dos resultados referentes às dosagens de $\text{PGF2}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, histopatologia e imunomarcção evidenciou efeito de tratamento no presente estudo. Isto sinaliza que o cultivo foi provavelmente o principal fator de indução de inflamação endometrial, sendo que o desafio com LPS não foi capaz de amplificar essa resposta. Além disso os grupos de V e MC não diferiram do grupo CP, indicando ausência de imunomodulação no presente modelo, no momento proposto.

A escolha do sistema de cultivo de explantes baseou-se em estudos preliminares que envolveram diversos métodos (Queiroz et al. 2016c). O principal critério da escolha foi a menor taxa de alterações morfológicas e o menor índice de morte celular. Contudo, a despeito desse cuidado, é possível que o ambiente de cultivo tenha sido ainda um fator agressor e tenha desencadeado os efeitos observados no presente estudo.

A maioria dos modelos de explantes usa corte mecânico do tecido e, embora o corte facilite a nutrição tissular e perfusão de nutrientes e oxigênio, há relatos de que o corte lesa a arquitetura tecidual e estimula uma resposta inflamatória estéril via sistema imune inato (Matzinger 1994, Krysko et al. 2011). No presente estudo, cortes de 1 mm^3 foram obtidos, o que pode ter desencadeado um quadro de

inflamação estéril e, conseqüentemente, os efeitos inflamatórios observados, que por si foram suficientes para sobrepor os efeitos do desafio por LPS.

A dose de LPS usada nos modelos de desafio endometrial *in vitro* varia bastante: 0,03 µg/ml (Heralth et al. 2006; Nash et al., 2008), 1 µg/ml (Heralth et al. 2006), 3 µg/ml (Nash et al. 2008), 8 ng/ml, 16 ng/ml (Piras et al. 2017), 100 ng/ml (Swangchan-Uthai et al. 2012). A dose 3 µg/ml empregada neste estudo foi escolhida baseada nos resultados de Nash et al. (2008) que a empregaram e obtiveram importante resposta inflamatória.

Apesar da capacidade do LPS em estimular a expressão de TLR-4 (Fu et al. 2013), no presente estudo, considerando-se o escore de imunomarcagem para este antígeno, não foi possível evidenciar esse efeito.

Swangchan-Uthai et al. (2016), ao avaliarem a resposta endometrial ao desafio com LPS (100 ng/ml), constataram que o RNAm para a IL-1b teve seu pico de expressão 6 h após desafio, sendo que às 48 h as concentrações já se apresentavam semelhantes às do grupo controle. A taxa de secreção de PGF2α apresentou comportamento semelhante, tendo sido documentado o pico 6 h após de desafio e queda significativa após 24 horas. Contudo, Nash et al. (2008) verificaram aumento persistente na secreção de PGF2α pelas células endometriais de égua até 72 h após o desafio com LPS *in vitro*. Neste estudo, foi realizada uma dosagem única 48 h após o desafio com LPS. Contudo, não é possível afirmar que 6 horas após o desafio elas não ocorreram.

Cronin et al. (2002) encontraram aumento na expressão de RNAm de IL-1β em células endometriais de bovino após desafio com LPS. Contudo, não observaram elevação nas concentrações desta interleucina no meio de cultivo 6 ou 24 horas após o desafio. Esse tipo de achado pode estar relacionado ao fato da IL-1b ser expressa em uma pró-forma inativa, sendo sua ativação dependente da ativação pela caspase 1 (Schroder e Tschopp 2010)

De acordo com a fase luteal, há variação de secreção de PGF2α devido à mudança na disponibilidade do número de receptores endometriais de ocitocina, que quando estimulados estimulam a produção de PGF2α (Senger et al. 2003). Neste estudo, foram selecionados úteros de fase luteal indistinta (I a IV) (Ireland et

al. 1980), portanto diferenças na capacidade potencial de produção de $\text{PGF2}\alpha$ *in vitro* pelos explantes selecionados pode ter representado um viés.

No presente estudo houve aumento da expressão endometrial de PGDH, enzima responsável pela degradação da $\text{PGF2}\alpha$, independente do tratamento empregado. Em cultivo de células trofoblásticas de placenta humana, o desafio bacteriano estimula a expressão de PGDH, o que pode ser um mecanismo para evitar partos prematuros (Yeganegi et al. 2009). É possível as células endometriais bovinas, de acordo como o momento do ciclo estral possam apresentar esse tipo de resposta de modo a não responderem sempre com elevada produção de $\text{PGF2}\alpha$.

No presente estudo, o aumento de expressão da $\text{PGF2}\alpha$ -R associada ao cultivo dos explantes não estava relacionado a efeito de tratamento. Em células endometriais humanas cultivadas *in vitro*, a expressão desses receptores é estimulada pela presença da $\text{IL-1}\beta$ (10ng/nl por 24h) (Zaragoza et al. 2005). Esse achado é compatível, portanto, como a ausência de efeito observada para as concentrações de $\text{IL-1}\beta$.

Uma das vias de desencadeamento da apoptose muito bem caracterizada envolve a transdução de sinal do Fas (Song et al. 2000), que após ligar-se com seu ligante (Fas-L) induz apoptose através de vias de sinalização autócrinas e parácrinas no tecido (Nagata 1994). Selam et al. (2002) constataram que a elevação da concentração de Fas-L é dependente de IL-8 nas células endometriais humanas cultivada *in vitro* (Selam et al., 2002). No presente estudo, o grupo CN apresentou valores intermediários de marcação para Fas-L, mas não o suficiente para caracterizar efeito de tratamento. Além disso, os grupos V e MC não mostraram diminuição de marcação de FAS-L com consequente prevenção de apoptose.

Com relação à concentração glandular do tecido endometrial, vacas que receberam prostaglandina sintética 26 dias após o parto tiveram maior densidade glandular e menores índices de inflamação uterina 40 dia pós-parto (Bonnet et al., 1990). No presente estudo houve redução da densidade glandular, talvez pela intensa inflamação presente, *in vitro*, já que não houve diferença no diâmetro das mesmas.

As adaptações celulares acontecem quando o estresse patológico ou fisiológico induz um novo estado capaz de alterar a célula, porém preservando sua viabilidade. Estas alterações incluem hipertrofia (aumento do tamanho de cada célula), hiperplasia (aumento do número de células) e atrofia (redução do tamanho da célula) (Kumar et al, 2012). De acordo com Walter et al. (2001), a dilatação glandular é um achado específico da histologia uterina em éguas com endometrite. De fato, nos explantes em cultivo houve aparecimento de epitélio glandular hiperplásico, hipertrófico e atrófico, bem como edema glandular, indicando lesões reversíveis frente a estresse e inflamação, porém todos os tratamentos apresentaram alterações.

Mesmo frente à inflamação do desafio com LPS somada à do cultivo, os tratamentos com vesículas extracelulares e meio condicionado de células tronco endometriais não apresentaram efeito. Isto pode ter acontecido devido à soma de fatores inflamatórios, ou porque este estudo analisou apenas o efeito das vesículas e meio condicionado sobre a resposta celular do endométrio cultivado. *In vivo*, na presença de células do sistema imune, esta resposta pode ser distinta.

2. Conclusão

De acordo com os achados do presente estudo, o modelo de cultivo *in vitro* de explantes do endométrio causou inflamação, que se sobrepôs ao efeito do desafio com LPS. Além disso, os tratamentos com vesículas extracelulares e meio condicionado não modularam a resposta a nível celular no endométrio.

3. Referências

Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4: 499–511.

Asselin E., Goff A.K., Bergeron H., Fortier M.A. 1996. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod*, 54: 371–379.

Bartlett P.C., Kirk J.K., Wilke M.A., Kaneene J.B., Mather E.C. 1986. Metritis complex in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Prev Vet Med* 235– 48.

Bonnett B.N., Etherington W.G., Martin S.W., & Johnson W.H. 1990. The effect of prostaglandin administration to Holstein-Friesian cows at Day 26 postpartum on clinical findings, and histological and bacteriological results of endometrial biopsies at Day 40. *Theriogenol.* 33(4): 877-890.

Bonnett B.N., Miller R.B., Etherington W.G., Martin S.W., Johnson W.H. 1991. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can. J. Vet. Res.* 55: 155–61

Caplan, A.I. 2009. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J. Pathol.* 217(2):318-324.

Chapwanya A., Meade K. G., Doherty M. L., Callanan, J.J. & O'Farrelly C. 2013. Endometrial epithelial cells are potent producers of tracheal antimicrobial peptide and serum amyloid A3 gene expression in response to *E. coli* stimulation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151(1):157-162.

Chapwanya A., Meade K.G., Foley C., Narciandi F., Evans A.C., Doherty M.L. & O'Farrelly C. 2012. The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reprod. Fertil. Dev.*, 24(8): 1028-1039.

Chapwanya A., Meade K.G., Narciandi F., Stanley P., Mee J.F., Doherty M.L. & O'farrelly C. 2010. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. *Theriogenol.* 73(7):988-994.

Cheong S.H., Nydam D.V., Galvão K.N., Crosier B.M., Gilbert R.O. 2011. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94:762–770.

Collino F., Deregibus M.C., Bruno S., Sterpone L., Aghemo G., Viltono L., Tetta C., Camussi G. 2010. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue

specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One* 5:1–15.

Cronin J.G., Turner M.L. Goetze L., Bryant C.E. & Sheldon I.M. 2012. Toll-like receptor 4 and MYD88-dependent signaling mechanisms of the innate immune system are essential for the response to lipopolysaccharide by epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol. Reprod.* 86(2):51-1.

Davies D., Meade K.G., Herath S., Eckersall P.D., Gonzalez D., White J.O., Conlan R.S., O'Farrelly C., Sheldon I.M. 2008. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6:53.

Den Haan M.C., Grauss R.W., Smits A.M., Winter E.M., Van Tuyn J., Pijnappels D.A., Steendijk P., Gittenberger-De Groot A.C., Van Der Laarse A., Fibbe W.E., De Vries A.A., Schalij M.J., Doevendans P.A., Goumans M.J., Atsma D.E. Cardiomyogenic differentiation-independent improvement of cardiac function by human cardiomyocyte progenitor cell injection in ischaemic mouse hearts. *J. Cell. Mol. Med.* 16(7):1508–1521.

Drillich M., Beetz O., Pfutzner A., Sabin M., Sabin H.J., Kutzer P., Nattermann H., Heuwieser W. 2001. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 84: 2010–2017.

Fonseca-Alves, C.E., Kobayashi, P.E., Palmieri, C., & Laufer-Amorim, R. 2017. Investigation of c-KIT and Ki67 expression in normal, preneoplastic and neoplastic canine prostate. *BMC Vet Res*, 13(1): 380.

Fonseca-Alves C.E., Rodrigues M.M., Moura VM., Rogatto S.R. & Laufer-Amorim R. 2013. Alterations of C-MYC, NKX3.1, and E-cadherin expression in canine prostate carcinogenesis. *Microsc. Res. Tech* 76(12):1250-1256.

Fu Y., Liu B., Feng X., Liu Z., Liang D., Li F. & Zhang, N. 2013. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151(1): 20-27.

Gilbert R.O., Shin S.T., Guard C.L., Erb H.N., Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenol.* 64:1879–1888.

Herath S., Fischer D.P., Werling D., Williams E.J., Lilly S.T., Dobson H., Bryant C.E., Sheldon I.M. 2006. Expression and Function of Toll-Like Receptor 4 in the Endometrial Cells of the Uterus. *Endocrinol.* 147(1):562–570.

Herath S., Lilly S.T., Fischer D.P., Williams E.J., Dobson H., Bryant C.E., Sheldon I.M. 2009. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F₂alpha to prostaglandin E₂ in bovine endometrium. *Endocrinol.* 150:1912–1920.

Hussain A.M., Daniel R.C. 1991. Bovine endometritis: current and future alternative therapy. *Zentralbl Veterinarmed A* 38(9):641-651.

Ireland J.J., Murphee R.L. & Coulson P.B. 1980. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum¹. *J. Dairy Sci.* 63(1):155-160.

Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J., Marquez-Curtis L., Machalinski B., Ratajczak J. 2005. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int. J. Cancer* 113(5):752–760.

Kim I.H., Kang H.G. 2003. Risk factors for postpartum endometritis and the effect of endometritis on reproductive performance in dairy cows in Korea. *J. Reprod. Dev.* 49:485–491.

Krysko D.V., Agostinis P., Krysko O., Garg A.D., Bachert C., Lambrecht BN, Vandenabeele P. 2011. Emerging role of damage-associated molecular patterns derived from mitochondria in inflammation. *Trend Immunol.* 32:157–164.

Lavoie J.R., Rosu-Myles M. 2013. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 95(12):2212-2221.

Leblanc S.J., Duffield T.F., Leslie K.E., Bateman K.G. Keefe G.P., Walton, J.S., Johnson W.H. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2223–2236.

Li Q., Verma I.M. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Ver. Immunol*, 2:725–734.

Madoz L.V., Giuliadori M.J., Migliorisi A.L., Jaureguiberry M., De La Sota R.L. 2014. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:195–201.

Martinez M.C., Andriantsitohaina R. 2011. Microparticles in angiogenesis: Therapeutic potential. *Circ Res.*, 109:110–119.

Matzinger P., 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Ver. Immunol.* 12:991–1045.

Moraes C.N., Maia L., Queiroz, C.M., Sudano M.J., Chapwanya A., Oba E. Temporal histologic evaluation of the endometrium of Nelore cows (*Bos Taurus Indicus*) in Southeast Brazil treated with Cloprostenol Sodium at the postpartum. **Braz J Hygiene Anim Sanity**, v. 10, p. 351-363, 2016.

Nash D., Lane E., Herath S. & Martin Sheldon, I. 2008. Endometrial explant culture for characterizing equine endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.* 59(2):105-117.

Piras C., Guo Y., Soggiu A., Chanrot M., Greco V., Urbani A. & Humblot, P. 2017. Changes in protein expression profiles in bovine endometrial epithelial cells exposed to *E. coli* LPS challenge. *Mol. BioSyst.* 13(2):392-405.

Queiroz C.M., Ikeda T.L., Maia L., Moraes C.N., Landim-Alvarenga F.C., Ferreira J.C.P. Isolamento de vesículas extracelulares a partir do meio condicionado de células tronco mesenquimais de tecido adiposo bovino. In: *Anais XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE*, Foz do Iguaçu, 320, 2016b

Queiroz C.M., Maia L., Moraes C.N., Landim F.C., Ferreira J.C.P. Histopathology of different culture protocols of bovine endometrial explants. In: *Proceedings Workshop in Internationalization in Veterinary Sciences: Perspectives for Research Between UNESP and the University of Glasgow, Scotland, UK*, Botucatu, 1: 27-27, 2016c.

Queiroz C.M., Moraes C.N., Maia L., Landim F.C., Ferreira, J.C.P. Isolation, culture, and characterization of mesenchymal stem cells from bovine adipose tissue. In: Proceedings Workshop in Internationalization in Veterinary Sciences: Perspectives for Research Between UNESP and the University of Glasgow, Scotland, UK, Botucatu, 1:34-34, 2016a.

Kumar V., Aster J. C., & Abbas A. 2012. Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças. Elsevier Brasil.

Schroder K, Tschopp J. 2010. The Inflammasomes. Cell 140:821–832.

Selam B., Kayisli U.A., Garcia-Velasco J.A., Akbas G.E., & Arici A. 2002. Regulation of Fas ligand expression by IL-8 in human endometrium. J. Clin. Endocrinol. Metabol. 87(8):3921-3927.

Senger P.L., 2003. In: Pathways to pregnancy and parturition. Washington EUA. 2nd ed: 381

Shai E., Varon D. 2011. Development, cell differentiation, angiogenesis- Microparticles and their roles in angiogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31:10–14.

Sheldon I.M., Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. Anim. Reprod. Sci. 82:295–306.

Sheldon I.M., Lewis G.S., LeBlanc S., Gilbert R.O. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenol. 65:1516–1530.

Sheldon M., Cronin J., Goetze L., Donofrio G., Schuberth H.J. 2009. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. Biol. Reprod. 81:1025–1032.

Song J., Sapi E., Brown W., Nilsen J., Tartaro K., Kacinski B.M., Craft J., Naftolin F., Mor G. 2000. Roles of Fas and Fas ligand during mammary gland remodeling. J. Clin. Inve. 106(10):1209, 2000.

Nagata S. 1994. Fas and Fas ligand: a death factor and its receptor. Adv. Immunol. 57:129-144,

Swangchan-Uthai T., Lavender C. R., Cheng Z., Fouladi-Nashta A.A. & Wathes D. C. 2012. Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide. *Biol. Reprod.* 87(6):135-1.

Thompson J.J., Yager J.A., Best S.J., Pearl D.L., Coomber B.L., Torres Neto R., Kiupel M., Foster R.A. 2011. Canine subcutaneous mast cell tumors: cellular proliferation and KIT expression as prognostic indices. *Vet. Pathol.* 46:169-81.

Van Balkom B.W., De Jong O.G., Smits M., Brummelman J., Den Ouden K., De Bree Pm., Van Eijndhoven M.A., Pegtel D.M., Stoorvogel W., Würdinger T., Verhaar M.C. 2013. Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood* 121(19):3997–4006.

Van Koppen A., Joles J.A., Van Balkom B.W. Lim S.K., De Kleijn D., Giles R.H., Verhaar M.C. 2012. Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS One* 7(6):38746.

Walter I., Handler J., Reifinger M., Aurich C. 2001. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reprod.* 121:581-586.

Xu D., Tahara H. The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 65(3):368–375.

Yeganegi M., Watson C.S., Martins A., Kim S.O., Reid G., Challis J.R. & Bocking, A. D. 2009. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant and fetal sex on lipopolysaccharide-induced cytokine and prostaglandin-regulating enzymes in human placental trophoblast cells: implications for treatment of bacterial vaginosis and prevention of preterm labor. *Am. J. Obst. Gynecol.* 200(5):532-e1.

Zaragoza D. B., Wilson R. R., Mitchell B. F. & Olson D. M. 2005. The interleukin-1beta induced upregulation of human prostaglandin F2alpha receptor mRNA in human myometrial cells (ULTR) is mediated by the transcription factor, NF-kappa B. *J. Soc. Gynecol. Investig. Supplement 1st International Summit Preterm Birth* 70.

Link para normas da revista:

<http://www.scielo.br/revistas/pvb/iinstruc.htm>

CAPÍTULO IV

6. Considerações Finais

De acordo com os objetivos propostos e com base nos presentes resultados obtidos nas condições experimentais utilizadas, podemos considerar que:

- Houve sucesso no isolamento, cultivo e caracterização das células tronco mesenquimais de tecido adiposo (CTM-TA) de bovinos;

- As CTM-TA apresentaram boa viabilidade antes e após criopreservação, demonstrando ser uma boa opção para criação de banco celular;

- As CTM-TA secretaram vesículas extracelulares que foram isoladas por ultracentrifugações e caracterizadas por Western Blot e Microscopia Eletrônica;

- Não foi possível desenvolver um modelo *in vitro* de inflamação endometrial com desafio por LPS em explantes;

- No presente modelo, os tratamentos com VEs ou meio condicionado (MC) não evidenciaram efeito imunomodulatório significativo com base nas análises de morfologia celular, na secreção de PGF2 α e IL-1 β , e expressão de TLR-4, FAS-L, PGF2 α -R, PGDH.