



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

**ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA, CAPACIDADE
DE DIFERENCIAÇÃO E CARACTERÍSTICAS
IMUNOFENOTÍPICAS DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS EQUINAS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO E
DE TECIDO ENDOMETRIAL**

RAMONA BASTOS BERNARDO

Botucatu, São Paulo
Fevereiro/2021

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

**ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA, CAPACIDADE
DE DIFERENCIAÇÃO E CARACTERÍSTICAS
IMUNOFENOTÍPICAS DE CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS EQUINAS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO E
DE TECIDO ENDOMETRIAL**

RAMONA BASTOS BERNARDO

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

Orientador: Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Botucatu, São Paulo
Fevereiro/2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Bernardo, Ramona Bastos.

Análise comparativa do transcriptoma, capacidade de diferenciação e características imunofenotípicas de células estromais mesenquimais equinas obtidas de tecido adiposo e de tecido endometrial / Ramona Bastos Bernardo.
- Botucatu, 2021

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

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Células estromais mesenquimais. 3. Tecido adiposo. 4. Endométrio. 5. Transcriptoma.

Palavras-chave: Célula estromal mesenquimal; Endométrio; Equino; Transcriptoma.

Nome do autor (a): Ramona Bastos Bernardo

Data de Defesa da Dissertação: 15 de fevereiro de 2021.

Título: ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA, CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO E CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EQUINAS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO E DE TECIDO ENDOMETRIAL

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim

Orientadora

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

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Membro

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

Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Membro

Departamento de Bioestatística, Biologia Vegetal, Parasitologia e Zoologia IBTEC – UNESP – Botucatu/SP

*À minha mãe, Musa Bernardo e
à minha avó, Augusta,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo suporte na fé, pelo caminho trilhado até aqui e pela força que há em mim.

Aos meus pais, por me ajudarem na minha formação como Médica Veterinária, por terem me guiado, sem vocês não teria ido tão longe. Às minhas irmãs, por terem me apoiado, cada uma a seu modo. E a Michel, meu cunhado, que nos momentos de dificuldade se fez tão presente.

Às minhas avós, Josefa (*in memoriam*) e Augusta, pelo carinho, paciência, amor, dedicação, abdicação e apoio. Vocês sempre serão inspiração, guia e luz na minha vida.

Ao Marcelo, pelo amor, carinho, companheirismo, dedicação, atenção e paciência. Muito obrigada pelo apoio, pelo suporte, com certeza meu caminho se tornou mais leve em sua companhia.

À minha orientadora Profa. Fernanda Landim, pela oportunidade única de ser sua mestranda. Sua ajuda, apoio, ensinamentos e conselhos me tornaram a profissional e mulher que sou hoje. Serei eternamente grata e levarei nossa amizade pra vida. Ao Prof. Paulo Ribolla e sua equipe do IBTEC por nos receber no seu laboratório, sendo imprescindível para finalização deste trabalho.

Aos meus amigos pelo companheirismo, pelas risadas, conselhos e momentos únicos. Verônica, Ludimila, Alice, Dani Barberini, Mari Gobato, Vivi, Marina, Keylla e Letícia: obrigada por tudo e por tanto.

A quem esteve ao meu lado nesta jornada, toda equipe do laboratório de cultivo celular, residentes, estagiários, professores e funcionários. A todos meu muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

À FMVZ – UNESP, pela oportunidade de cursar a Pós-graduação, por fazer possível a realização deste trabalho.

E, finalmente, aos animais! Seres inocentes e poderosos, que merecem nossa admiração e respeito, indo muito além da Veterinária.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA = Actina-alfa de músculo liso
CD = Cluster de diferenciação
CD34 = Indicador de células hematopoiéticas
CD90 = Indicador de células progenitoras primitivas
CD105 = Marcador associado à proliferação
CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais
CO₂ = Dióxido de carbono
CT = Célula-tronco
CXCL12/CXCR4 = quimiocina e seu receptor importantes na migração celular
DMEM = Dulbecco's modified eagle medium
DMSO = Dimetil sulfóxido
FITC = Isotiocianato de fluoresceína
HBSS = Hank's Balanced Salt Solution
LANÇA = Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular
MHC II = Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MSC = Célula estromal mesenquimal
MSC-TA = célula estromal mesenquimal de origem adiposa
MSC-TE = célula estromal mesenquimal de origem endometrial
Ig = Imunoglobulina
IL = Interleucina
NK = Células Natural Killers
P = Passagem celular
PD = Population doubling time
PDGFR β = Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas
PG = Prostaglandina
PMN = Polimorfonucleares
RPM = Rotações por minuto
SDF-1 = fator derivado de célula estromal 1
SFB = Soro fetal bovino
TGF- β = Fator de transformação de crescimento beta
TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Médias percentuais de marcação das MSC's originadas nos tecidos adiposo (MSC-TA) e endometrial (MSC-TE) na segunda passagem celular, através da técnica de citometria de fluxo, para os marcadores CD90, CD105, CD34 e MHC II.....	52
TABELA 2 – Os 10 genes mais expressos, comparando MSC's TE com MSC's de tecido adiposo.....	54
TABELA 3 – Os 10 genes menos expressos, comparando MSC's de tecido endometrial com as de tecido adiposo.....	55

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Diferenciação das MSC's do tecido adiposo (A,C,E) e do tecido endometrial (B,D,F) nas duas linhagens mesenquimais durante a segunda passagem. (A,B) MSC's apresentando gotículas lipídicas dentro do citoplasma, confirmando a linhagem adipogênica. (C,D) MSC's coradas com Alizarin Red evidenciando a matriz de cálcio extracelular. (E,F) Grupos controle. Aumento de 100 X (E,F) e 200 X (A-D).....	50
FIGURA 2 - Histogramas representando o perfil das amostras de MSC-TA e MSC-TE analisadas pela técnica de citometria de fluxo após segunda passagem, avaliando-se os marcadores de superfície celular CD90, CD105, CD34 e MHC II. As MSC's foram positivas para CD90 e CD105, negativas para CD34 e apresentaram baixa expressão do MHC II.....	51
FIGURA 3 – Análise de componente principal (PCA) indicando a presença de dois grupos distintos. Tecido adiposo (TA) em rosa e tecido endometrial (TE) em azul.....	53
FIGURA 4 – Gráfico em barras representando os processos biológicos controlados por 427 genes regulados positivamente e 587 genes regulados negativamente nas MSC's endometriais.....	53
FIGURA 5 – Gráfico em barras indicando as vias metabólicas e os processos biológicos relacionados aos 10 genes mais regulados positivamente nas MSC-TE.....	56
FIGURA 6 – Gráfico em barras indicando as vias metabólicas e processos biológicos relacionados aos 10 genes mais significativamente expressos nas MSC-TA.....	57

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Células-tronco mesenquimais.....	3
2.2. Fontes de células-tronco mesenquimais.....	5
2.2.1 Tecido endometrial	6
2.3. Mecanismo de ação das células-tronco mesenquimais.....	9
2.4. Terapia celular na espécie equina	11
2.5. Transcriptômica	13
2.5.1. Heterogeneidade das células estromais mesenquimais	14
REFERÊNCIAS.....	18
CAPÍTULO 2	366
ARTIGO 1: Isolamento, cultivo e caracterização de células estromais mesenquimais de tecido endometrial nos equinos	

BERNARDO, R.B. ANÁLISE COMPARATIVA DO TRANSCRIPTOMA, CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO E CARACTERÍSTICAS IMUNOFENOTÍPICAS DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS EQUINAS OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO E DE TECIDO ENDOMETRIAL. Botucatu – SP. 2021. 83p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus Botucatu, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

As células estromais mesenquimais (MSC's) têm propriedades regenerativas e imunomoduladoras, tornando-as importantes na terapia veterinária. Nos equinos, estas células são frequentemente obtidas da medula óssea e do tecido adiposo, necessitando procedimento cirúrgico, com sedação e anestesia local. Assim, o tecido endometrial, obtido através de biópsia uterina, pode ser uma fonte mais acessível para o futuro uso terapêutico. MSC's de origem endometrial (TE) e adiposa (TA) foram isoladas das mesmas éguas doadoras. As MSC's foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação em tecido adipogênico e osteogênico. As MSC-TE e MSC-TA foram cultivadas *in vitro* e avaliadas quanto a expressão dos marcadores CD90, CD105, CD34 e MHC II, através de citometria de fluxo. Além disso, foi realizada análise transcriptômica comparativa destas células pela extração do RNA total seguido de Sequenciamento de Nova Geração (NGS). Foi analisada a expressão gênica diferencial de mRNA, assim como seus processos biológicos e vias metabólicas mais representadas em cada tipo celular. As MSC's de ambos os tecidos apresentaram características específicas de células estromais mesenquimais, incluindo diferenciação nas linhagens adipogênicas e osteogênicas, além padrão fenotípico esperado. Os transcritos de todos os genes expressos se agruparam de acordo com a origem da MSC. Um total de 427 genes regulados positivamente e 587 genes regulados negativamente foram identificados nas MSC-TE. No entanto, estes valores representam somente 3,3% do total de transcritos identificados. As principais vias metabólicas expressas diferencialmente foram aquelas relacionadas ao alto padrão proliferativo do tecido endometrial. Portanto, as células estromais mesenquimais advindas do endométrio equino são capazes de ser isoladas através de biópsia uterina, podendo se tornar uma fonte usual de coleta de MSC's, para fins terapêuticos, uma vez que apresentaram características imunofenotípica, de multipotencialidade e de produção de transcritos semelhantes ao tecido adiposo.

Palavras-chave: célula estromal mesenquimal, endométrio, equino, expressão gênica

BERNARDO, R.B. TRANSCRIPTOMIC COMPARATIVE ANALYSIS, DIFFERENTIATION POTENTIAL AND IMMUNOPHENOTYPICAL CHARACTERISTICS FROM ADIPOSE AND ENDOMETRIAL DERIVED EQUINE MESENCHYMAL STROMAL CELLS. Botucatu – SP. 2021. 83p. Dissertação (Mestrado) – São Paulo State University - School of Veterinary Medicine and Animal Science.

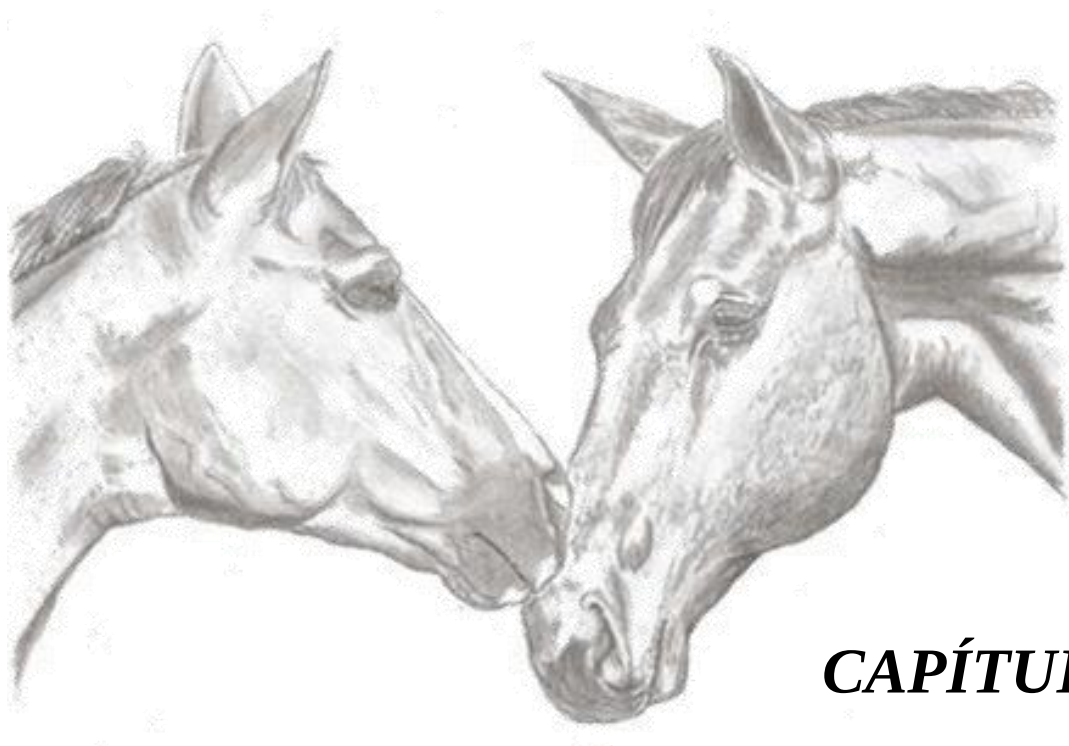
ABSTRACT

Mesenchymal stromal cells (MSC's) have regenerative and immunomodulatory properties, making them important in veterinary therapy. In the equine species, MSC's are frequently isolated from bone marrow and adipose tissue, requiring surgical procedure, with local anesthesia and sedation. Thus, the endometrium, through uterine biopsy, can be a more accessible source for future therapeutic use. Endometrial (TE) and adipose (TA) derived MSC's were isolated from the same donors. MSC's were evaluated in vitro for the potential for adipogenic and osteogenic differentiation. The MSC-TE and MSC-TA were cultured in vitro and the CD90, CD105, CD34 and MHC II markers were tested using flow cytometry. A comparative transcriptomic analysis was performed by extracting the total RNA followed by New Generation Sequencing (NGS). Differential gene expression of mRNA was analyzed, as well as its biological processes and metabolic pathways most represented in each cell type. The MSC's of both tissues showed specific characteristics of mesenchymal stromal cells, including differentiation in adipogenic and osteogenic strains, in addition to the expected phenotypic pattern. The transcripts of all expressed genes were grouped according to the origin of the MSC. A total of 427 positively regulated genes and 587 negatively regulated genes were identified in the MSC-TE. However, these values represent only 3.3% of the total transcripts identified. The main metabolic pathways expressed differentially were those related to the high proliferative pattern of endometrial tissue. Therefore, mesenchymal stromal cells from the equine endometrium are able to be isolated through uterine biopsy, and can become a usual source of collection of MSC's, for therapeutic purposes, since they have immunophenotypic, multipotentiality and production of similar transcripts compared to adipose tissue.

Keywords: endometrium, equine, mesenchymal stromal cells, uterus.

*“Mas o mundo foi rodando
Nas patas do meu cavalo
E nos sonhos
Que fui sonhando
As visões se clareando
Até que um dia acordei”*

Geraldo Vandré.



CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O tratamento clínico com células-tronco (CT) apresenta-se como uma prática crescente na medicina veterinária, já que têm propriedades pró-regenerativas e imunomoduladoras (PAUL; ANISIMOV, 2013). Tais células e também o seu meio de cultivo são uma alternativa promissora para terapia de diversas enfermidades, incluindo as do sistema reprodutivo.

As células-tronco adultas podem ser isoladas do sangue periférico, da medula óssea, do cordão umbilical e do tecido adiposo (HERZOG et al., 2003). No equino, as células estromais mesenquimais (MSC's) são colhidas mais frequentemente da medula óssea ou tecido adiposo, sendo cultivadas *in vitro* para transplante autólogo. Para tanto, é necessário procedimento cirúrgico para obtenção deste tipo de célula, o que aumentou o interesse das pesquisas para fontes menos invasivas como sangue periférico total, sangue do cordão umbilical ou gelatina de Wharton. Desta forma, o tecido endometrial também tem se mostrado atrativo como fonte de células estromais mesenquimais (RINK et al., 2017). Além disso, seria esperado que as MSC's encontradas no endométrio fossem mais eficientes na imunomodulação e reparação tecidual do tecido uterino.

O tecido endometrial é composto por células epiteliais luminais, células do estroma, do endotélio, fibras musculares e leucócitos, além de ser altamente regenerativo. As células estromais endometriais são dinâmicas, capazes de se multiplicar durante o ciclo estral e gestação (DONOFRIO et al., 2008), sob influência de fatores de crescimento e esteroides ovarianos (GARGETT et al., 2008).

MSC's de origem endometrial já foram isoladas de diversas espécies como humanos, roedores, suínos e ovinos (GAAFAR et al., 2014; RINK et al., 2017). A partir do uso terapêutico destas células, já foi possível tratar o endométrio humano em modelos de endometriose, utilizando ratos (MASUDA et al., 2007). Recentemente, as MSC's endometriais da espécie equina foram cultivadas e caracterizadas quanto aos seus marcadores de superfície, a fim de explorar o potencial terapêutico deste tipo de célula-tronco (RINK et al., 2017).

A endometrite persistente pós-cobertura (EPPC) é uma enfermidade inflamatória que se destaca por ser a principal causa de infertilidade nas éguas,

tendo uma prevalência média de 10 a 15% (WOODWARD; TROEDSSON, 2013). O tratamento inclui lavagem uterina, uso de agentes ecbólicos e glicocorticoides, porém não são eficazes, podendo ser utilizados como alternativa os produtos biológicos atuantes na imunomodulação. Portanto, afecções crônicas e degenerativas do trato reprodutivo das éguas, não responsivas aos tratamentos convencionais, se beneficiariam dos efeitos das células estromais mesenquimais (RINK et al., 2017).

Em vista disso, o objetivo deste estudo foi isolar, cultivar e caracterizar amostras de células estromais mesenquimais obtidas a partir do tecido endometrial de éguas em diestro, comparando com as de origem adiposa, avaliando também a transcriptômica a fim de confrontar o perfil de produção de biomoléculas com potencial terapêutico produzidas pelas duas fontes de células estromais.

1.1 Objetivo Geral

- Avaliar o isolamento de células-tronco mesenquimais, também chamadas de células estromais mesenquimais (MSC's), obtidas do tecido endometrial de equinos (*Equus caballus*), realizando a expansão *in vitro*, caracterização e diferenciação.

1.2 Objetivo Específico

- Comparar o transcriptoma de células estromais mesenquimais do tecido endometrial e adiposo de equinos (*Equus caballus*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células-tronco mesenquimais

Células estromais mesenquimais são células-tronco adultas que possuem alta capacidade de se renovar e diferenciar em várias linhagens de tecido conjuntivo. Possuem população heterogênea de células estromais, formato fibroblastóide, multipotentes e não hematopoiéticas, sendo de interesse devido ao potencial terapêutico na regeneração de órgãos e/ou tecidos lesionados (SILVA et al., 2018).

Possuem propriedades anti-apoptóticas contribuindo para homeostase tecidual e também atuam com as células do sistema imunológico nos processos inflamatórios. Além disso, apresentam baixa expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) diminuindo a possibilidade de acionar resposta imune quando transplantadas (CALIARI-OLIVEIRA et al., 2016; LIU et al., 2016).

Estas células são caracterizadas por aspectos demonstrados *in vitro*, como combinação de marcadores fenotípicos e potencial de diferenciação em outras linhagens mesodermas, permitindo transformação em osteoblastos, adipócitos, condrócitos e outros tipos celulares, em resposta a um estímulo apropriado (CONRAD; HUSS, 2005; NOTCH et al., 2010).

O Comitê de Células-Tronco Mesenquimais, da Sociedade Internacional de Terapia Celular, define MSC's humanas como CD105, CD73 e CD90 positivas e negativas para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA (KOLF et al., 2007). Estes marcadores de superfície (*Clusters Designation – CD*) são utilizados como identificação da imunofenotipagem, pois as células contêm proteínas de membrana que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos e, portanto, ser utilizados na caracterização deste tipo celular (TAYLOR et al., 2007).

Ainda não foram validados marcadores de superfície específicos para equinos, devido a limitada disponibilidade de anticorpos monoclonais anti-cavalo e também anticorpos de outras espécies não possuem reação cruzada com a espécie equina (TAYLOR et al., 2007). Desta forma, as MSC's equinas possuem variada expressão de marcadores de superfície como CD29, CD90, CD44, CD166, CD13, CD146, CD117, CD40 e CD80. Enquanto têm baixa expressão dos CD45, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e antígenos de MHC II (De SCHAUWER et al., 2012; MARTINELLO et al., 2010; RANERA et al., 2011).

As MSC's podem ser isoladas a partir de músculo, fígado, baço, cartilagens articulares, derme, timo e tecido adiposo (BIANCO; COSSU, 1999). Mais recentemente, o útero também se mostrou uma fonte de MSC's (MUTLU et al., 2015). Essa grande variedade de fontes no organismo é uma demonstração de que as MSC's estão presentes em praticamente todos os tecidos, no qual interagem com as células locais e, sob condições de inflamação, com células do sistema imune (BERNARDO; FIBBE, 2013).

As MSC's podem ser cultivadas e expandidas *in vitro*, pois são capazes de se aderir ao plástico do frasco e formar colônias quando cultivadas em baixa densidade. A morfologia típica são células com formato fibroblastóide alongadas, fusiformes e pontiagudas, contendo grandes núcleos ovais centralizados e com abundante citoplasma. Na fase de senescência, a morfologia se altera revelando células grandes, achatadas, largas e que se multiplicam lentamente (FEHRER; LEPPERDINGER, 2005).

A relativa capacidade de isolar e expandir MSC's em cultivo, e principalmente seus efeitos regenerativos foi o que levou ao seu uso terapêutico em doenças degenerativas e autoimunes. Experimentos pré-clínicos e também na fase clínica se baseiam neste isolamento a partir da medula óssea, e do tecido adiposo e sua expansão *in vitro*. As MSC's têm função imunomodulatória, pois percebem e controlam a inflamação, além de modificar a proliferação e produção de citocinas dos linfócitos e células mieloides do sistema imune (EGGENHOFER et al., 2014).

2.2. Fontes de células-tronco mesenquimais

Nos equinos, MSC's já foram isoladas a partir de diversos tecidos como medula óssea, tecido adiposo, tecido embrionário, fluido e membrana sinovial, sangue periférico e do cordão umbilical, periósteo, músculo, gengiva, polpa dentária, ligamento periodontal, endométrio e folículo piloso (MENSING et al., 2011; PRADO et al., 2015; RADTKE et al., 2013; RINK et al., 2017).

Entre estas fontes, o tecido adiposo e a medula óssea têm a maior concentração de células, principalmente comparado ao sangue periférico. As originadas na medula óssea têm menor concentração em relação as de tecido adiposo, porém suas células têm maior potencial de diferenciação em tecido musculoesquelético (FRISBIE et al., 2009; KISIDAY et al., 2008; VIDAL et al., 2009).

Cultivos advindos da medula óssea e tecido adiposo têm maior crescimento *in vitro* que o cultivo originado no cordão umbilical (BARBERINI et al., 2014). As células da medula óssea, por sua vez, têm maior potencial condrogênico e osteogênico podendo ter melhor resposta nestes microambientes. A reduzida osteogênese de MSC's de tecido adiposo pode ser

associada com alterada responsividade à estimulação pelas TGF- β e proteína morfogenética óssea (BPM) (ESTES et al., 2006; HENNIG et al., 2007).

A necessidade de fazer um procedimento cirúrgico para a colheita nestes locais têm direcionado as pesquisas para outras fontes menos invasivas, incluindo sangue periférico, sangue do cordão umbilical ou geleia de Wharton (LOVATI et al., 2011; MOHANTY et al., 2014). Neste quesito, o tecido endometrial representa uma atrativa fonte alternativa na espécie equina (RINK et al., 2017). Uma das vantagens é que as células endometriais podem ser colhidas pela biópsia uterina (SCHURING et al., 2011; REVEL, 2009), que é um procedimento menos invasivo usado na clínica equina para diagnóstico e não necessita de sedação ou anestesia local (SNIDER et al., 2011). Além disso, é um procedimento que não deixa cicatrizes visíveis, que têm uma implicação estética importante na indústria do cavalo, principalmente em animais atletas (CABEZAS et al., 2018).

A biópsia quando executada corretamente não resulta em dano ou cicatriz ao útero. Já foi demonstrado que a realização de múltiplas biópsias antes do estro, até cinco amostras de cada vez, não teve efeito negativo nas taxas de prenhez subsequentes nas éguas (WATSON; SERTICH, 1992).

Além de ser uma fonte alternativa acessível de células, comparado ao tecido adiposo e medula óssea, o uso de MSC's endometriais pode representar uma ótima opção terapêutica para afecções uterinas, condição prevalente e multifacetada que frequentemente leva à infertilidade das éguas. As pesquisas também devem explorar o potencial clínico das células-tronco endometriais em outros tecidos que já são alvo das terapias regenerativas, como afecções do tecido musculoesquelético (RINK et al., 2017).

2.2.1 Tecido endometrial

O útero compreende tecido mucoso, ciclicamente renovado, com glândulas e tecido estromal extensivamente vascularizado (GARGETT et al., 2009). Células-tronco uterinas estão presentes no endométrio cíclico durante o ciclo menstrual e também no tecido inativo não-cíclico, possivelmente com função de regenerar o endométrio (GARGETT, 2006). Essa regeneração prepara o endométrio para estímulo esteroideal tornando-o um ambiente receptivo para implantação embrionária (GARGETT et al., 2009). Espécies que

apresentam ciclo estral também incluem fases de crescimento endometrial e apoptose celular (SLAYDEN; BRENNER, 2004). O útero tem características imunológicas privilegiadas que permitem hospedar um organismo semi-alogênico (feto) num ambiente excepcionalmente tolerante (ARCK et al., 2014).

O sistema reprodutivo da fêmea se origina do mesoderma intermediário. Existe a hipótese de que algumas células passam por uma transição entre mesenquimal para epitelial, pois o tecido se prolifera para formar um epitélio celômico, que irá se invaginar para formar os ductos de Muller. Então pode-se assumir que algumas células epiteliais e células estromais permaneçam no tecido endometrial adulto, dando origem às células-tronco endometriais (SNYDER; LORING, 2005).

Uma segunda suposição seria uma origem mesenquimal a partir da medula óssea. As MSC's da medula óssea circulam em pequeno número e podem se estabelecer em outros órgãos, onde fazem uma transdiferenciação para formar células neste novo tecido ou contribuir para angiogênese (KORBLING; ESTROV, 2003).

O primeiro relato de isolamento de células-tronco endometriais foi realizado em humanos, após a histerectomia, em 2006. Foram identificadas raras populações de células epiteliais e estromais com atividade progenitora e características indiferenciadas (GARGETT, 2006). Também já foram descritas nas espécies roedoras, suína, canina e ovina (CHAN; GARGETT, 2006; de CESARIS et al., 2017; LETOUZEY et al., 2015; MIERNIK; KARASINSKI, 2012).

As células-tronco endometriais já foram exploradas, devido sua alta capacidade proliferativa, para promover camadas extras de suporte para cultivo de células-tronco embrionárias (LEE et al., 2005). Similarmente, colônias de células grandes demonstram alta proliferação (30 *population doubling*), maior que algumas das colônias de medula óssea, polpa dentária e tecido adiposo (GRONTHOS et al., 2002; GRONTHOS et al., 2003; KERN et al., 2006).

MSC's do endométrio, assim como de outros tecidos, parecem se originar de um tipo de célula perivascular que apresentam os marcadores endoteliais CD146, NG2, receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR β) e actina-alfa de músculo liso (α -SMA). E a expressão desses marcadores se mantém durante o cultivo (SCHWAB; GARGETT, 2007; CRISAN et al., 2008). Além de terem potencial de diferenciação nas três

linhagens clássicas, adipogênica, condrogênica e osteogênica, as MSC's do endométrio são capazes de se diferenciar em linhagens neurogênicas e miogênicas (CHAN; GARGETT, 2006).

O primeiro relato, na espécie equina, de isolamento, cultivo e caracterização de MSC's endometriais foi conduzida por Rink et al. (2017), pela colheita de tecido *post mortem*. As células exibiram alta taxa de proliferação, marcadores típicos como CD29, CD44, CD90 e CD105 e pouca expressão dos marcadores hematopoiéticos CD34 e CD45. Comparando-as com as de tecido adiposo, células estromais endometriais têm distinta habilidade de se diferenciar em músculo liso e apresentam melhor propriedade imunomodulatória e migratória (RINK et al., 2017).

Além das linhagens mesodermas clássicas, as MSC's de origem endometrial podem ser induzidas para diferenciar *in vitro* em músculo cardíaco e esquelético (HIDA et al., 2008; CUI et al., 2007), células produtoras de insulina (SANTAMARIA et al., 2011), epitélio urinário (SHOAE-HASSANI et al., 2015), células neuronais e neurônios dopaminérgicos (WOLFF et al., 2011; BAYAT et al., 2016). Portanto, este tipo celular pode ser capaz de tratar afecções cardíacas, degeneração muscular, diabetes tipo 1 e doenças neurodegenerativas no futuro, além de produzir modelos animais para o estudo de doenças humanas e veterinárias (LOPEZ et al., 2017).

Em humanos, o uso de células-tronco endometriais já foi explorado em casos de síndrome de Asherman's, caracterizada por atrofia uterina e aderências endometriais por trauma, levando conseqüentemente a uma infertilidade (DEANE et al., 2016).

O potencial terapêutico das células-tronco endometriais já tem sido demonstrado em casos como falência ovariana precoce (LAI et al., 2015), doença de Parkinson (WOLFF et al., 2011) e prolapso de órgãos pélvicos (EMMERSON; GARGETT, 2016), apesar de não terem sido ainda comprovados clinicamente.

Nos equinos, a endometrite crônica é uma doença degenerativa que causa infertilidade nas éguas, sendo originada na fibrose endometrial e alterações glandulares (HOFFMANN et al., 2009; KENNEY, 1992). Atualmente não existe tratamento efetivo para esta afecção, mas já foi relatado o uso de MSC's de origem adiposa com redução na progressão da doença (MAMBELLI

et al., 2013). Por isso, um tratamento com células de origem endometrial para esta afecção pode produzir melhores resultados (LOPEZ et al., 2017).

2.2. Mecanismo de ação das células-tronco mesenquimais

Originalmente imaginou-se que o tratamento com MSC's seria baseado na substituição de células disfuncionais pela potencialidade observada. Porém, as células administradas terapeuticamente apresentaram pouca implantação tecidual, sendo então proposto que o tratamento teria efeito pela secreção de fatores tróficos, citocinas e quimiocinas imunomodulatórias (OTSURU et al., 2012; TOGEL et al., 2005). Além de modular a resposta inflamatória, as MSC's secretam fatores que reestabelecem o suprimento vascular e reparam o tecido lesionado, fazendo com que seja uma fonte promissora de células-tronco para a terapia celular (MONTEIRO et al., 2010).

As MSC's parecem exercer papel crucial na manutenção da homeostase imunológica, pois previnem a ativação dos linfócitos T, gerando um ambiente tolerável ou cessando a resposta imunológica durante o estágio de reparação (MA et al., 2014; PROCKOP; YOUN, 2012). Adicionalmente, diminuem a proliferação e atividade citotóxica das células NK, além de ter pouca ou nenhuma expressão do complexo de histocompatibilidade principal II (MHC II) (CASTRO-MANRREZA; MONTESINOS, 2015). Essas funções são importantes, pois facilitam o uso terapêutico alogênico destas células na medicina regenerativa (LOPEZ et al., 2017).

Estudos mais recentes sugerem que as MSC's tenham curta vida útil após a administração. O motivo pelo qual isso acontece ainda não está bem definido. O rápido desaparecimento das células-tronco levanta o questionamento de como a terapia é capaz de funcionar (EGGENHOFER et al., 2012). É possível que uma pequena fração de células seja capaz de sobreviver e migrar para os locais de injúria e inflamação, podendo explicar os benefícios da terapia celular. Outra possibilidade é que as MSC's sejam capazes de rapidamente passar adiante seu efeito para outras células que mediam o reparo tecidual ou imunomodulação (EGGENHOFER et al., 2014).

Apesar do primeiro compartimento a ser procurado ser a corrente sanguínea, estudo recente sugere que haja MSC's derivadas de tecido adiposo migrando via sistema linfático. Já foi demonstrado que as células podem ser

liberadas do tecido adiposo ou medula óssea em resposta à inflamação acumulando-se nos linfonodos e vasos sanguíneos via mecanismos da CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 (GIL-ORTEGA et al., 2013). Alternativamente, as MSC's podem ser recrutadas dos tecidos para os locais de injúria pela migração através do estroma ou microcapilares, migrando apenas curtas distâncias estreitando a rota da corrente sanguínea (Da SILVA MEIRELLES et al., 2006).

O padrão migratório depende provavelmente da via de administração. Pesquisas que usaram a rota intravenosa e demonstraram que a maior parte das células são sequestradas pelos pulmões na primeira passagem circulatória (ASSIS et al., 2010; EGGENHOFER et al., 2012; FISCHER et al., 2009). Após 24 horas, as MSC's são realocadas para outros órgãos, principalmente fígado e baço, além dos tecidos lesionados (EGGENHOFER et al., 2012; KRAITCHMAN et al., 2005).

Ainda é questionável a viabilidade celular após a passagem pelos pulmões. Há relato de que as MSC's morrem 24 horas após administração, mas ainda seriam rastreáveis no fígado, e a eliminação pode depender de mecanismos imunológicos (EGGENHOFER et al., 2012).

Apesar disso, o rápido desaparecimento de MSC's administradas não exclui o seu efeito terapêutico. Já foi demonstrado que a fagocitose de células-tronco mortas induz a produção de macrófagos com fenótipo regulatório (M₂). Também é possível que uma pequena porcentagem de células escape da eliminação e seja responsável pelo efeito terapêutico (LU et al., 2013).

Os linfócitos T regulatórios são exemplos de células capazes de levar adiante os efeitos das MSC's. As células-tronco produzem TGF- β , enzima idoleamina e IL-2, que atuam na proliferação de linfócitos T regulatórios e são capazes de ativá-los (MELIEF et al., 2013; ENGELA et al., 2013). Além disso, as MSC's produzem PGE₂ induzindo os macrófagos tipo 2 a agirem no controle da inflamação e mediando a reparação do tecido (NEMETH et al., 2009).

Ainda há discussões sobre os mecanismos de atuação das MSC's, não podendo precisar o princípio de funcionamento no organismo. São necessários mais estudos para permitir um protocolo de terapia definitivo e eficiente (EGGENHOFER et al., 2014).

2.4. Terapia celular na espécie equina

A terapia celular na prática veterinária pode servir como base para utilização em medicina humana (VOLK; THEORET, 2013; OJEH et al., 2015). Existem diversas doenças, tanto animal quanto humanas, que têm o mesmo mecanismo fisiopatológico, então a espécie equina pode ser modelo para segurança e eficiência para a terapia na medicina humana (GERSHWIN, 2007).

Nos equinos, a terapia com MSC's tem por principal objetivo os tecidos musculoesqueléticos, e o primeiro modelo experimental foi o reparo do tendão flexor digital superficial (SMITH et al., 2003). Apesar disso, o potencial terapêutico da MSC's no cavalo vai além do sistema locomotor (GUGJOO et al., 2018).

Já foram relatados estudos promissores no tratamento de feridas equinas. As células dão origem a queratinócitos, células epiteliais, glândulas sebáceas e células dendríticas. Além disso, produzem fatores angiogênicos como fator de crescimento vascular endotelial e angiopoetina-1 (WU et al., 2007; BORENA et al., 2009). Assim, as MSC's auxiliam na regeneração tecidual diminuindo as chances de complicações recorrentes, como tecido de granulação exuberante, comuns nos cavalos (THEORET, 2009).

Também já foi relatado sucesso em casos de correções cirúrgicas de palato mole (CARSTANJEN et al., 2006), feridas cutâneas (IACONO et al., 2016), úlceras de decúbito em potros (DYSON, 1997), ceratite ulcerativa (SPAAS et al., 2011) e deslocamento de retina (MARFE et al., 2012). Portanto, as células-tronco em casos de feridas em equinos parecem promissoras. Apesar disso, os estudos mencionados não têm o devido controle, podendo acontecer regeneração espontânea. Fatores como método de cultivo, fonte celular, via de administração, número de células, tipo de substrato e passagem celular podem influenciar o resultado, demandando mais pesquisas para padronização da aplicação clínica (GUGJOO et al., 2018).

A terapia com MSC também se mostra como importante ferramenta nas doenças imunomediadas e afecções isquêmicas, controlando rejeições a enxertos, miocardite autoimune, artrite e encefalomielite (EINSTEIN et al., 2007; SORDI; PIEMONTE, 2011). A imunossupressão advinda das células estromais pode ocorrer através da ação inibitória na proliferação de linfócitos T CD8⁺ em diferentes espécies, incluindo o cavalo (CORTINOVIS et al., 2015).

Diversas afecções autoimunes no equino como uveíte recorrente e lúpus sistêmico eritematoso, têm características similares as da medicina humana (DEEG et al., 2002). A fisiopatologia envolve inflamação ativa e desbalanço de citocinas que podem ser moduladas pela ação de células-tronco (LIANG et al., 2010).

A laminite é uma condição isquêmica comum e usualmente está associada com a perda de células-tronco epidérmicas p63 positivas. A terapia nesses casos aparenta ter ótimo resultado como coadjuvante ao tradicional suporte alopático, principalmente antes do aparecimento da lâmina hiperplásica indiferenciada (MORRISON et al., 2014). Já foram observadas melhoras na qualidade e formato do casco, e também na mobilidade do animal (ANGELONE et al., 2017).

Dentre as desordens reprodutivas, as células estromais já foram utilizadas no tratamento da endometrite (MAMBELLI et al., 2013; CORRADETTI et al., 2014; FALOMO et al., 2015) pois são conhecidas por modularem a resposta inflamatória em processos agudos e crônicos (BARRACHINA et al., 2016). As MSC's são capazes de migrar tanto para os tecidos glandulares quanto aglandulares do útero (MAMBELLI et al 2013), fazendo a imunomodulação na endometrite (FALOMO et al., 2015) e melhorando o aporte de células endometriais quando a pouca proliferação está associada à baixa fertilidade (CORRADETTI et al., 2014).

Células estromais de tecido adiposo coradas (2×10^7), inoculadas de forma semelhante à inseminação artificial no útero não-saudável, puderam ser observadas em amostras de biópsias incluindo tecido glandular e periglandular (MAMBELLI et al., 2013). Células estromais amnióticas variam em seus resultados nos tecidos saudáveis e também na endometrite, e podem ser potenciais candidatas para o tratamento endometrial quando ocorre falha na gestação (FALOMO et al., 2015).

Um único estudo referente à dinâmica folicular relatou aumento no número de folículos, porém sem efeito significativo na dinâmica ovariana após administração de células-tronco (GRADY et al., 2016). Também já foi relatado uso de MSC's autólogas oriundas de biópsia uterina de éguas e após duas semanas infundidas durante diestro, demonstrando propriedades

imunomoduladoras e ação no lúmen uterino por até 24 horas após infusão, não penetrando no endométrio saudável (RINK et al., 2018).

Outro estudo comparou utilização de células de origem adiposa e endometrial no tratamento de endometrite pós-cobertura, com objetivo de analisar as propriedades anti-inflamatórias e de incorporação celular no tecido. As MSC's foram observadas no tecido periglandular em ambos os grupos, sem diferença significativa entre eles, persistindo durante o tempo em que foram analisadas as biópsias, 30 dias pós-infusão. Além disso, a inoculação de MSC's reduziu a inflamação, e este resultado foi semelhante em ambas as origens de MSC's. (NAVARRETE et al., 2020).

As células-tronco aparentam ter potencial terapêutico nas afecções reprodutivas equinas e necessita mais estudos controlados com parâmetros uniformes (GUGJOO et al., 2018).

2.5. Transcriptômica

Para auxiliar no entendimento desta fonte celular é possível utilizar métodos complementares de biologia molecular, como a análise transcriptômica por sequenciamento de RNA (RNAseq), identificando e caracterizando as vias metabólicas envolvidas e mecanismos moleculares responsáveis pelo funcionamento das MSC's. O estudo dos transcritos é essencial para conhecer os elementos funcionais do genoma e os constituintes moleculares de células e tecidos (WANG et al., 2009).

O RNAseq é uma aplicação eficiente, sua técnica foi melhorada a partir de outras tecnologias como ensaios de microarranjos de DNA e análise seriada de expressão gênica (SAGE) (CLOONAN et al., 2009). Uma das técnicas desenvolvidas foi o sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês Next-generation Sequencing), que melhorou a qualidade da análise e reduziu os custos das pesquisas da área genética e epigenética (HAYDEN, 2009). Apesar de recente, o NGS fornece informações sem precedentes sobre a complexidade transcricional de diversos organismos, dentre eles, humanos (SULTAN et al., 2008).

O Transcriptoma é definido pelo conjunto de transcritos (RNA's ribossômicos, RNA's mensageiros, RNA's transportadores e microRNA's) de um

organismo, tecido, órgão ou linhagem celular. Sendo o reflexo direto da expressão dos genes. (COSTA et al., 2010).

As espécies que são modelos experimentais com importância médica têm o transcriptoma completo descrito em alta resolução nas fontes de dados públicas. Os genes e transcritos de outras espécies, como equinos, são sabidos unicamente por uma projeção computacional baseado em comparações genômicas com essas espécies. Experimentos que validem esse modelo genômico ainda são escassos e a maioria dos genes equinos anotados são de único transcrito. (PACHOLEWSKA et al., 2015).

A limitação consiste nas poucas sequências expressas e DNA complementar (cDNA) publicado nas fontes de dados. Porém, isso vem mudando. O RNAseq tornou possível a validação experimental dos transcritos por um custo razoável e grupos de pesquisa estão publicando a expressão gênica de vários tecidos da espécie equina, incluindo músculo, leucócitos, cartilagem, sistema nervoso central, tecido reprodutivo, embrião, sêmen e sangue periférico. (MORETON et al., 2014; COLEMAN et al., 2013; COLEMAN et al., 2010; SERTEYN et al., 2010; DAS et al., 2013; IQBAL et al., 2014). Estes estudos tem catalogado diversos genes não codificantes e também isoformas de genes codificantes de proteínas, além de anotações estruturais de genes já existentes (PACHOLEWSKA et al., 2015).

A análise transcriptômica do tecido endometrial equino já foi realizada com intuito de avaliar a relação entre dietas altamente proteicas com alterações uterinas capazes de levar à infertilidade da égua. O estudo demonstrou que éguas com alta concentração de ureia no sangue exibem uma diminuição do pH uterino e alterações da expressão de genes ligados à regulação do pH, canais de íons, alterações do tecido epitelial e do metabolismo dos ácidos graxos. Evidenciando assim, a importância de avaliar os genes diferencialmente expressos no útero, uma vez que essas alterações podem revelar disfunções endometriais associadas a efeitos adversos na fertilidade da égua. (BOAKARI et al., 2019).

2.5.1. Diferenças no transcriptoma de acordo com a origem do tecido

Heterogeneidade celular é uma característica geral dos tecidos biológicos e, até em populações que seriam teoricamente homogêneas, existe a

diversidade celular, sendo influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos do microambiente ou do “nicho” (WEN & TANG, 2016).

Um mesmo tipo celular também apresenta fenótipos diferentes a depender das mudanças no microambiente em que se encontra. Pesquisando-se o epitélio prostático, foram demonstrados os diferentes fenótipos e morfologias das células basais e dos macrófagos, a depender do microambiente hormonal. Comprovando assim a sua plasticidade. (GOMES, 2020).

Existem evidências que células estromais em cultivo são intrinsecamente heterogêneas nos seus fenótipos e funções (PHINNEY, 2012). As MSC's de diferentes fontes ou origens apresentam distintas capacidades de diferenciação e imunomodulação, e também de expressão de proteínas de superfície (HASS et al., 2011; OCK et al., 2016 & PENNINGTON et al., 2016), mas todas apresentam os critérios mínimos que as definem como MSC's (DOMINIC et al., 2006). Padrões do transcriptoma e potencial de diferenciação *in vivo* das diferentes células estromais também podem variar consideravelmente (REINISCH et al., 2015). Apesar do comportamento potencialmente diferenciado, MSC's de diversas origens estão sendo utilizadas para tratar as mesmas enfermidades em pesquisas em animais e testes clínicos (ZHOU et al., 2019).

Em humanos, uma série de estudos comparativos demonstraram diferenças entre células estromais de origem adiposa e de medula óssea (CHO et al., 2017; DMITRIEVA et al., 2012; FURUHASHI et al., 2013), e ainda não está claro como este fato influencia nos resultados clínicos (ZHOU et al., 2019).

As células de origem da medula óssea apresentaram maior heterogeneidade transcriptômica do que as de origem adiposa. Quanto mais homogênea uma população, mais repetibilidade e confiabilidade nos experimentos realizados, então seria razoável supor que as MSC's de tecido adiposo podem ser mais adequadas para terapêutica específica. (ZHOU et al., 2019).

O perfil metabólico das MSC's adiposas apresentou superioridade em manter a diferenciação quando cultivadas em laboratório, sendo mais tolerantes à senescência do que as de origem medular. E, levando-se em consideração a menor imunogenicidade celular, as de origem adiposa podem ser uma escolha mais adequada para terapia celular alogênica. (ZHOU et al., 2019).

Análise transcriptômica de MSC's endometriais humanas já foi feita com intuito de avaliar o fenótipo terapêutico deste tipo celular. E, pela primeira vez foi descrita a capacidade de células estromais de origem uterina serem fontes de exossomas para a comunicação parácrina. Neste mesmo estudo, as células que foram tratadas com A38-01, inibidor do receptor de TGF- β , tiveram maior potencial angiogênicos, melhora nas propriedades anti-fibróticas e imunoregulatórias do que as do grupo controle. Isto sugere que o transcriptoma e a melhora das propriedades celulares do grupo tratado promovam a utilidade para futuras terapias regenerativas. (GURUNG et al., 2018).

A aplicação terapêutica de MSC's na medicina regenerativa continua crescendo e, por isso, são necessárias mais pesquisas para guiar a utilização clínica apropriada. A escolha da fonte de MSC equina é comumente baseada somente na facilidade de obtenção e disponibilidade, então necessita-se de conhecimento mais aprofundado para esclarecer qual fonte de célula seria ideal para cada tipo específico de enfermidade e tratamento. (HASS et al., 2011; OCK et al., 2016).

Especificamente nos equinos, foram comparados 4 grupos de MSC's diferindo em suas origens: medula óssea, tecido adiposo, sangue do cordão umbilical e tecido do cordão umbilical. Foi demonstrado que MSC's das fontes estudadas, quando ativadas nas regiões inflamatórias, secretam altas taxas de mediadores anti-inflamatórios e são similares às de humanos e roedores nas propriedades imunomodulatórias. (CARRADE et al., 2012).

Outro estudo em equinos investigou a expressão de genes relacionados ao sistema imune das MSC's de diferentes fontes quando estimuladas com a citocina pró-inflamatória IFN- γ . Foram comparadas MSC's advindas de sangue periférico, tecido adiposo e medula óssea, com o objetivo de determinar se alguma delas seria preferível em um ambiente de inflamação. (CASSANO et al. 2018).

Notou-se que a expressão basal dos genes relacionados ao sistema imune, antes do tratamento com o IFN- γ , foi variável a depender da fonte de origem da célula-tronco, com exceção da prostaglandina sintetase 2 (PTGS2). Porém, após a estimulação com a citocina pró-inflamatória, o perfil de expressão gênica se tornou mais homogêneo entre as diferentes fontes, não havendo diferença significativa, sugerindo que as MSC's provavelmente irão responder

de forma similar quando usadas terapeuticamente em lesões inflamatórias. (CASSANO et al. 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A terapia celular nos equinos é cada vez mais explorada nas doenças degenerativas e inflamatórias. As células estromais mesenquimais têm propriedades cruciais na homeostase tecidual, então independente de suas fontes estas células tem apresentado cada vez maior interesse na Medicina Veterinária. A MSC de origem endometrial foi recentemente isolada e caracterizada em equinos, sendo uma opção de colheita mais acessível, podendo ter bom efeito terapêutico em afecções uterinas.

REFERÊNCIAS

- ANGELONE, M.; CONTI, V.; BIACCA, C.; BATTAGLIA, B.; PECORARI, L.; PIANA, F.; GNUDI, G.; LEONARDI, F.; RAMONI, R.; BASINI, G.; DOTTI, S.; RENZI, S.; FERRARI, M.; GROLLI, S. The contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: a proof of concept. **International Journal of Molecular Science**, v.18, p.2122, 2017.
- ARCK, P.; SOLANO, M.E.; WALECKI, M.; MEINHARDT, A. The immune privilege of testis and gravid uterus: Same difference? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.382, p.509-520, 2014.
- ASSIS, A.C.; CARVALHO, J.L.; JACOBY, B.A.; FERREIRA, R.L.; CASTANHEIRA, P.; DINIZ, S.O.; CARDOSO, V.N.; GOES, A.M.; FERREIRA, A.J. Time-dependant migration of sistemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. **Cell Transplantation**, v.19, n.2, p.219-230, 2010.
- BARBERINI, D.J.; PAIVA FREITAS, N.P.; MAGNONI, M.S.; MAIA, L.; LISTONI, A.J.; HECKLER, M.C.; SUCLANO, M.J.; GOLIM, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; AMORIM, R.M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immuno-phenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cells Research & Therapy**, v.5, n.1, p.25, 2014.
- BARRACHINA, L.; REMACHA, A.; ROMERO, A.; VAZQUEZ, F.; ALBAREDA, J.; PRADES, M.; RANERA, B.; ZARAGOZAAI, P.; MARTÍN-BURRIELA, I.; RODELLARA, C. Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.171, p.57-65, 2016.
- BAYAT, N.; EBRAHIMI-BAROUGH, S.; ARDAKAN, M.M.M.; AI, A.; KAMYAB, A.; BABALOO, N.; AI, J. Differentiation of human endometrial stem cells into Schwann cells in fibrin hydrogel as 3D culture. **Molecular Neurobiology**, v.53, p.7170-7176, 2016.
- BERNARDO, M.E.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. **Cell Stem Cell**, v.13, n.4, p.392-402, 2013
- BIANCO, P.; COSSU, G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. **Experimental Cell Research**, v.251, n.2, p.257-263,

1999.

BORENA, B.M.; PAWDE, A.M.; AMARPAL, AITHAL, H.P.; KINJAVDEKAR, P.; SINGH, R.; KUMAR, D. Autologous bone marrow-derived cells for healing excisional dermal wounds of rabbits. **Veterinary Record**, v.165, n.19, p.563-568, 2009.

BOAKARI, Y..L.; ALI, H.E.; DINI, P.; LOUX, S.; FERNANDES, C.B.; SCOGGIN, K.; ESTELLER-VICO, A.; LAWRENCE, L.; BALL, B. A high protein model alters the endometrial transcriptome of mares. **Genes**, v.10, n.576, 2019.

CABEZAS, J.; ROJAS, D.; NAVARRETE, F.; ORTIZ, R.; RIVERA, G.; SARAIVIA, RODRIGUEZ-ALVAREZ; CASTRO, F.O. Equine mesenchymal stem cells derived from endometrial or adipose tissue share significant biological properties, but have distinctive pattern of surface markers and migration. **Theriogenology**, v.106, p.93-102, 2018.

CALIARI-OLIVEIRA, C.; YAOCHITE, J. N. U.; RAMALHO, L. N. Z.; PALMA, P. V. B.; CARLOS, D.; DE QUEIRÓZ CUNHA, F.; SOUZA, D.A.; FRADE, M.A.C.; COVAS, D.T.; MALMEGRIM, K.C.R.; OLIVEIRA, M.C.; VOLTARELLI, J.C. Xenogeneic mesenchymal stromal cells improve wound healing and modulate the immune response in an extensive burn model. **Cell Transplantation**, v.25, n.2, p.201-215, 2016.

CARRADE, D.D.; LAME, M.W.; KENT, M.S.; KLARK, K.C.; WALKER, N.J.; BORJESSON, D.L. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cell. **Cell Medicine**, v.4, p.1-11, 2012.

CARSTANJEN, B.; DESBOIS, C.; HEKMATI, M.; BEHR, L. Succesful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in surgically repaired soft palate defect in an adult horse. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, p.143-147, 2006.

CASSANO, J.M.; FORTIER, L.A.; HICKS, R.B.; HARMAN, R.M.; VAN DE WALLE, G.R. Equine mesenchymal stromal cells from different tissues sources display comparable immune-related gene expression profiles in response to interferon gamma (IFN)- γ . **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.202, p.25-30, 2018.

CASTRO-MANRREZA, M.E.; MONTESINOS, J.J; Immunoregulation by mesenchymal stem cells: Biological aspects and clinical applications. **Journal of Immunology Research**, v.2015, p.1-20, 2015.

- CHAN, R.W.; GARGETT, C.E. Identification of label-retaining cells in mouse endometrium. **Stem Cells**, v.24, p.1529-1538, 2006.
- CHO, K.A.; PARK, M.; KIM, Y.H.; WOO, S.Y.; RYU, K.H. RNA sequencing reveals a transcriptomic portrait of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and palatine tonsils. **Science Report**, v.7, n.1, 2017.
- CLOONAN, N.; XU, QINYING.; FAULKNER, G.J.; TAYLOR, D.F.; TANG, D.T.P.; KOLLE, G.; GRIMMOND, S.M. RNA-MATE: a recursive mapping strategy for high-throughput RNA-sequencing data. **Bioinformatics**, v.25, n.19, p.2615-2616, 2009.
- COLEMAN, S.J.; ZENG, Z.; HESTAND, M.S.; LIU, J.; MACLEOD, J.N. Analysis of unannotated equine transcripts identified by mRNA sequencing. **PLoS One**, v.8, 2013.
- COLEMAN, S.J.; ZENG, Z.; WANG, K.; LUO, S.; KHREBTUKOVA, I.; MIENALTOWSKI, M.J.; SCHROTH, G.P.; LIU, J.; MACLEOD, J.N. Structural annotation of equine protein-coding genes determined by mRNA sequencing. **Animal Genetics**, v.41, p.121-130, 2010.
- CONRAD, C.; HUSS, R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, v.124, p.201-208, 2005.
- CORRADETTI, B.; CORREANI, A.; ROMALDINI, A.; MARINI, M.G.; BIZZARO, D.; PERRINI, C.; CREMONESI, F.; LANGE-CONSIGLIO, A. Amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells and their conditioned media: potential candidates for uterine regenerative therapy in the horse. **Plos One**, v.9, n.10, 2014.
- CORTINOVIS, M.; CASIRAGHI, F.; REMUZZI, G.; PERICO, N. Mesenchymal stromal cells to control donor-specific memory T cells in solid organ transplantation. **Current Opinion in Organ Transplant**, v.20, n.1, p.79-85, 2015.
- COSTA, V.; ANGELINI, C.; DE FEIS, I.; CICCODICOLA, A. Uncovering the Complexity of Transcriptomes with RNA-Seq. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 853916, 2010.
- CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L.; CHEN, C.W.; CORSELLI, M.; PARK, T.S.; ANDRIOLO, G.; SUN, B.; ZHENG, B.; ZHANG, L.; NOROTTE, C.; TENG, P.N.; TRAAS, J.; SCHUGAR, R.; DEASY, B.M.; BADYLAK, S.; BUHRING, H.J.; GIACOBINO, J.P.; LAZZARI, L.; HUARD, J.; PÉAULT, B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. **Cell Stem Cell**, v.3,

p.301-313, 2008.

CUI, C.H.; UYAMA, T.; MIYADO, K.; TERA, M.; KYO, S.; KIYONO, T.; UMEZAWA, A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. **Molecular Biology of th Cell**, v.8, n.5, p.1586-1594, 2007.

DALEY, G.Q. The promise and perils of stem cell therapeutics. **Cell Stem Cell**, v.10, p.740-749, 2012.

MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v.119, n.11, p.2204-2213, 2006.

DAS, P.J.; MCCARTHY, F.; VISHNOI, M.; PARIA, N.; GRESHAM, C.; LI, G.; KACHROO, P.; SUDDERTH, A.K.; TEAGUE, S.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; CHOWDHARY, B.P.; RAUDSEPP, T. Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. **PLoS One**, v.8, n.2, 2013.

DEANE, J.A.; ONG, Y.R.; CAIN, J.E.; JAYASEKARA, W.S.N.; TIWARI, A.; CARLONE, D.L.; WATKINS, D.N.; BREAU, D.T.; GARRETT, C.E. The mouse endometrium contains epithelial, endothelial and leucocyte populations expressing the stem cell marker telomerase reverse transcriptase. **Molecular Human Reproduction**, v.22, p.272-284, 2016.

DE CESARIS, V.; GROLI, S.; BRESCIANI, C.; CONTI, V.; BASINI, G.; PARMIGIANI, E. Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells. **Reproduction in Domestic Animal**, v.52, n.2, p.235-242, 2017.

DEEG, C.A.; EHRENHOFER, M.; THURAU, S.R.; REESE, S.; WILDNER, G.; KASPER, B. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. **Experimental Eye Research**, v.5, p.127-133, 2002.

DE SCHAUWER, C.; PIEPERS, S.; VAN DE WALLE, G.R.; DEMEYERE, K.; HOOGEWIJS, M.K.; GOVAERE, J.L.J.; BRAECKMANS, K.; SOOM, A.V.; MEYER, E. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. **Cytometry Part A**, v.81, n.4, p.312-323, 2012.

DMITRIEVA, R.I.; MINULLINA, I.R.; BILIBINA, A.A.; TARASOVA, O.V.;

ANISIMOV, S.V.; ZARITSKEY, A.Y. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. **Cell Cycle**, v.11, n.2, p.377-383, 2012.

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

DOMINIC, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DYSON, S. Treatment of superficial digital flexor tendinitis: a comparison of conservative management, sodium hyaluronate, and glycosaminoglycan polysulfate. **Proceedings of the AAEP Annual Convention**, v.43, p.297-300, 1997.

EGGENHOFER, E.; BENSELER, V.; KROEMER, A.; POPP, F.C.; GEISLER, E.K.; SCHLITT, H.J.; BAAN, C.C.; DAHLKE, M.H.; HOOGDUIJN, M.J. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. **Frontiers in Immunology**, v.3, p.297, 2012.

EGGENHOFER, E.; LUK, F.; DAHLKE, M.H.; HOOGDUIJN, M.J. The life and fate of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Immunology**, v.5, p.148, 2014.

EGGENHOFER, E.; POPP, F.C.; MENDICINO, M.; SILBER, P.; VAN'T HOF, W.; RENNER, P.; HOOGDUIJN, M.J.; PINXTEREN, J.; VAN ROOIJEN, N.; GEISLER, E.K.; DEANS, R.; SCHLITT, H.J.; DAHLKE, M.H. Heart grafts tolerized through third-party multipotent adult progenitor cells can be retransplanted to secondary hosts with no immunosuppression. **Stem Cells Translational Medicine**, v.2, n.8, p.595-606, 2013.

EINSTEIN, O.; FAINSTEIN, N.; VAKNIN, I.; MIZRACHI-KOL, R.; REIHARTZ, E.; GRIGORIADIS, N.; LAVON, I.; BANIYASH, M.; LASSMANN, H.; BEN-HUR, T. Neural precursors attenuate autoimmune encephalomyelitis by peripheral immunosuppression. **Annals of Neurology**, v.61, p.209-218, 2007.

EMMERSON, S.J.; GARGETT, C.E. Endometrial mesenchymal stem cell as a cell based therapy for pelvic organ prolapse. **World Journal of Stem Cells**, v.8, p.202-215, 2016.

ENGELA, A.U.; HOOGDUIJN, M.J.; BOER, K.; LITJENS, N.H.; BETJES, M.G.;

- WEIMAR, W.; BAAN, C.C. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. **Clinical and Experimental Immunology**, v.173, n.2, p.343-354, 2013.
- ESTES, B.T.; WU, A.W.; GIULAK, F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. **Arthritis & Rheumatology**, v.54, p.1222-1232, 2006.
- FALOMO, M.E.; FERRONI, L.; TOCCO, I.; GARDIN, C.; ZAVAN, B. Immunomodulatory role of adipose-derived stem cells on equine endometriosis. **Biomed Research International**. ArtID:141485, 2015.
- FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental Gerontology**, v.40, n.12, p.926-930, 2005.
- FISCHER, U.M.; HARTING, M.T.; JIMENEZ, F.; MONZON-POSADAS, W.O.; XUE, H.; SAVITZ, S.I.; LAINE, G.A.; COX, C.S. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. **Stem Cells and Development**, v.18, n.5, p.683-692, 2009.
- FORTIER, L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v.34, n.5, p.415–423, 2005.
- FRIEL, E.; SAR, S.; MEE, J.P. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, p.415-423, 2005.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; PETRAKOVA, K.V.; KUROLESOVA, A.I.; FROLOVA, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation**, v.6, n.2, p.230-247, 1968.
- FRISBIE, D.D.; KISIDAY, J.D.; KAWCAK, C.E.; WERP, N.M.; MCLLRAITH, C.W. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone-marrow derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. **Journal of Orthopaedic Research**, v.27, p.1675-1680, 2009.
- FURUHASHI, K.; TSUBOI, N.; SHIMIZU, A.; KATSUNO, T.; KIM, H.; SAKA, Y.; OSAKI, T.; SADO, Y.; IMAI, E.; MATSUO, S.; MARYUAMA, S. Serum-starved adipose-derived stromal cells ameliorate crescentic GN by promoting immunoregulatory macrophages. **Journal of the American Society of nephrology**, v.24, n.4, p.587-603, 2013.
- GAAFAR, T.; HWARY, R.E.; OSMAN, A.; ATTIA, W.; HAMZA, H.; BROCKMEIER, K. Comparative characteristics of amniotic membrane,

endometrium and ovarian derived mesenchymal stem cells: a role of amniotic membrane in stem cell therapy. **Middle East Fertility Society Journal**, v.19, p.156-170, 2014.

GARGETT, C.E. Identification and characterization of human endometrial stem/progenitor cells. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.46, p.250-253, 2006.

GARGETT, C.E.; CHAN, R.W.; SCHAWAB, K.E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.288, n.1-2, p.22-29, 2008.

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

GEARING, A. J. H.; NEWMAN, W. Circulating adhesion molecules in disease. **Immunology Today**, v. 14, p. 506-512, 1993.

GERSHWIN, L.J. Veterinary autoimmunity - autoimmune diseases in domestic animals. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.1109, p.109-116, 2007.

GIL-ORTEGA, M.; GARIDOU, L.; BARREAU, C.; MAUMUS, M.; BREASSON, L.; TARVENIER, G. Native adipose stromal cells egress from adipose tissue in vivo: evidence during lymph node activation. **Stem Cells**, v.31, n.7, p.1309-1320, 2013.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v.103, p.1204-1219, 2008.

GODWIN, E.E.; YOUNG, N.J.; DUDHIA, J.; BEAMISH, I.C.; SMITH, R.K. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. **Equine Veterinary Journal**, v.44, p.25-32, 2012.

GOMES, H.W. **Investigação da plasticidade morfológica e fenotípica de células basais e de macrófagos no epitélio prostático de ratos em diferentes microambientes hormonais**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, p.115. 2020.

GOTTRAND, G.; COURAU, T.; THOMAS-VASLIN, V.; PREVEL, N.; VAZQUEZ, T.; RUOCCO, M.G.; LAMBRECHT, B.; BELLIER, B.; COLOMBO, B.C.;

KLATZMANN, D. Regulatory T-cell development and function are impaired in mice lacking membrane expression of full-length intercellular adhesion molecule-1. **Immunology**, v. 146, p. 657-670, 2015.

GRADY, S.T.; WATTS, A.E.; HINRICHS, K. Effect of mesenchymal stem cells on equine ovarian follicular development. **Journal of Equine Veterinary Science**, p.51-84, 2016.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L.W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **Journal of Dental Research**, v.81, p.531–535, 2002.

GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A.C.W.; HAY, S.J.; SHI, S.T.; GRAVES, S.E.; KORTESIDIS, A.; SIMMONS, P.J. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, v.116, p.1827–1835, 2003.

GUGJOO, M.B.; AMARPAL; MAKHDOOMI, D.M.; SHARMA, G.T. Equine mesenchymal stem cells: properties, sources, characterization and potential therapeutic applications. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.72, p.16-27, 2018.

GURUNG, S.; WILLIAMS, S.; DEANE, J.A.; WERKMEISTER, J.A.; GARGETT C.E. The transcriptome of human endometrial mesenchymal stem cells under TGF β R Inhibition reveals improved potential for cell-based therapies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.6, n.164, 2018.

HASS, R.; KASPER, C.; BOHM, S.; JACOBS, R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. **Cell Communication and Signaling**, v.9, p.12, 2011.

HAYDEN, E.C. Genome sequencing: the third generation. **Nature**, v.457, n.7231, p.768-769, 2009.

HENNIG, T.; LORENZ, H.; THIEL, A.; GOETZKE, K.; DICKHUT, A.; GEIGER, F.; RICHTER, W. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived from stromal cells correlates with and altered TGF- β receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. **Journal of Cellular Physiology**, v.21, p.682-691, 2007.

HERZOG, E.L.; CHAI, L.; KRAUSE, D.S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v.102, p.3483-3493, 2003.

HIDA, N.; NISHIYAMA, N.; MIYOSHI, S.; KIRA, S.; SEGAWA, K.; UYAMA, T.

Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. **Stem Cells**, v.26, n.7, p.1695-1704, 2008.

HOCKING, A.M.; GIBRAN, N.S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Experimental Cell Research**, v.316, n.14, p.2213-2219, 2010.

HOFFMANN, C.; ELLENBERGER, C.; MATTOS, R.C.; AUPPERLE, H.; DHEIN, S.; STIEF, B. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. **Animal Reproduction Science**, v.111, p.261-278, 2009.

IACONO, E.; LANCI, A.; MERLO, B.; RICCI, F.; PIRRONE, A.; ANTONELLI, C.; MARIELLA, J.; CASTAGNETTI, C. Effects of amniotic fluid mesenchymal stem cells in carboxymethyl cellulose gel on healing of spontaneous pressure sores: clinical outcome in seven hospitalized neonatal foals. **Turkish Journal of Biology**, v.40, p.484-492, 2016.

IQBAL, K.; CHITWOOD, J.L.; MEYERS-BROWN, G.A.; ROSER, J.F.; ROSS, P.J. RNA-seq transcriptome profiling of equine inner cell mass and trophectoderm. **Biology of Reproduction**, v.90, p.60, 2014.

JACKSON, J.S.; GOLDING, J.P.; CHAPON, C.; JONES, W.A.; BHAKOO, K.K. Homing of stem cells to sites of inflammatory brain injury after intracerebral and intravenous administration: a longitudinal imaging study. **Stem Cell Research & Therapy**, v.1, n.2, p.17, 2010.

JIN, S.Z.; LIU, B.R.; XU, J.; GAO, F.L.; HU, Z.J.; WANG, X.H. Ex vivo-expanded bone marrow stem cells home to the liver and ameliorate functional recovery in a mouse model of acute hepatic injury. **Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International**, v.11, n.1, p.66-73, 2012.

KENNEY, R.M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v.25, p.186, 1992.

KENNEY, R.M.; DOIG, P.A. Equine endometrial biopsy. **Current Therapy in Theriogenology II**, p.1143, 1968.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLUTER, 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.

KISIDAY, J.; KOPESKY, P.; EVANS, C.; GRODZINSKY, A.; MCLLWRAITH, W.; FRISBIE, D. Evaluation of adult equine bone marrow and adipose derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. **Journal of Orthopaedic**

Research, v.26, p.322-331, 2008.

KOLF, C.M.; CHO, E.; TUAN, R.S. Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation.

Arthritis Research & Therapy, v.9, p.204, 2007.

KÖRBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept? **New England Journal of Medicine**, v.349, p.570–582, 2003.

KRAITCHMAN, D.L.; TATSUMI, M.; GILSON, W.D.; ISHIMORI, T.; KEDZIOREK, D.; WALCZAK, P. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. **Circulation**, v.112, n.10, p.1452-1461, 2005.

KURAITIS, D.; GIORDANO, C.; RUEL, M.; MUSARÓ, A.; SUURONEN, E.J. Exploiting extracellular matrix-stem cell interactions: a review of natural materials for therapeutic muscle regeneration. **Biomaterials**, v.33, p.428-443, 2012.

LAI, D.; WANG, F.; YAO, X.; ZHANG, Q.; WU, X.; XIANG, C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. **Journal of Translational Medicine**, v.13, p.155, 2015.

LAWSON, C.; AINSWORTH, M.; YABOUB, M.; ROSE, M. Ligation of ICAM-1 on endothelial cells leads to expression of VCAM-1 via a nuclear factor- κ B-independent mechanism. **Journal of Immunology**, v. 162, n.5, p. 2990-2996, 1999.

LEE, J.B.; LEE, J.E.; PARK, J.H.; KIM, S.J.; KIM, M.K.; ROH, S.I.; YOON, H.S. Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. **Biology Reproduction**, v. 72, p.42–49, 2005.

LETOUZEY, V.; TAN, K.S.; DEANE, J.A.; ULRICH, D.; GURUNG, S.; ONG, Y.R. Isolation and characterization of mesenchymal/stromal cells in the ovine endometrium. **Plos One**, v.10, n.5, e0127531, 2015.

LIU, X.; FANG, Q.; KIM, H. Preclinical studies of mesenchymal stem cells (MSC) administration in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a systematic review and meta-analysis. **PloS One**, v.11, n.6, e0157099, 2016.

LIANG, J.; ZHANG, H.; HUA, B.; WANG, H.; LU, L.; SHI, S.; HOU, Y.; ZENG, X.; GILKESON, G.S.; SUN, L. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. **Annals of the**

Rheumatic Diseases, v.69, n.8, p.1423-1429, 2010.

LOVATI, A.B.; CORRADETTI, B.; LANGE CONSIGLIO, A.; RECORDATTI, C.; BONACINA, E.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells.

Veterinary Research Communications, v.35, p.103-121, 2011.

LÓPEZ, A.G.S.; MONTESINOS, J.J.M.; ARCE, S.R.A. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells in domestic animals and possible applications in veterinary medicine. **Veterinaria Mexico OA**, v.4, n.3, p.1-18, 2017.

LU, W.; FU, C.; SONG, L.; YAO, Y.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; LI, Y.; MA, G.; SHEN, C. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival.

International Journal of Cardiology, v.165, n.2, p.333-340, 2013.

MA, S.; XIE, N.; LI, W.; YUAN, B.; SHI, Y.; WANG, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **Cell Death & Differentiation**, v.21, p.216, 2014.

MAMBELLI, L.I.; MATTOS, R.C.; WINTER, G.H.Z.; MADEIRO, D.S.; MORAIS, B.P.; MALSCHITZKY, E. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis.

PLoS ONE, v.9, e97889, 2009.

MAMBELLI, L.I.; WINTER, G.H.; KERKIS, A.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R.C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. **Theriogenology**, v.79, n.5, p.744-750, 2013.

MANSOUR, T.A.; SCOTT, E.Y.; FINNO, C.J.; BELLONE, R.R., MIENALTOWSKI, M.C., PENEDO, P.J., ROSS, S.J., VALBERG, J.D., MURRAY, J.D., BROWN, C.T. Tissue resolved, gene structure refined equine transcriptome. **BMC Genomics**, v.18, n.103, 2017.

MARFE, G.; MASSARO-GIORGANO, M.; RANALLI, M.; COZZOLI, E.; DI STEFANO, C.; MALAFOGLIA, V.; POLETTINI, M.; GAMBACURTA, A. Blood derived stem cells: an ameliorative therapy in veterinary ophthalmology. **Journal of Cellular Physiology**, p.1250-1256, 2012.

MARTINELLO, T.; BRONZINI, I.; MACCATROZZO, L.; IACOPETTI, I.; SAMPAOLES, M.; MASCARELLO, F.; PATRUNO, M. Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. **Tissue Engineering Part C**, v.16, p.771-781, 2010.

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

MAUMUS, M.; PEYRAFITTE, J.A.; D'ANGELO, R.; FOURNIER-WIRTH, C.; BOULOUMIE, A.; CASTEILLA, L. Native human adipose stromal cells: localization, morphology and phenotype. **International Journal of Obesity**, v.35, n.9, p.1141-1153, 2011.

MELIEF, S.M.; SCHRAMA, F.; BRUGMAN, M.H.; TIEMESSEN, M.M.; HOOGDUIJIN, M.J.; FIBBE, W.E.; ROELOFS, H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. **Stem Cells**, v.31, n.9, p.1980-1991, 2013.

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

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

MOHANTY, N.; GULATI, B.R.; KUMAR, R.; GERA, S.; KUMAR, P.; SOMASUNDARAM, R.K. Immunophenotypic characterization and tenogenic differentiation of mesenchymal stromal cells isolated from equine umbilical cord blood. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v.50, p.538-548, 2014.

MONTEIRO, B.S.; ARGOLO NETO, N.; DEL CARLO, R.J. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, v.40, p.1, 2010.

MORETON, J.; MALLA, S.; ABOOBAKER, A.A.; TARLINTON, R.E.; ERMES, R.D. Characterisation of the horse transcriptome from immunologically active tissues. **Peer Journal**, v.2, 2014.

MORRISON, S.; DRYDEN, V.C.; BRAS, R.; MORRELL, S. How to use stem cells in clinical laminitis cases. How to choose regenerative medicine and therapies. **AAEP Proceedings**, v.60, p.499-503, 2014.

MUTLU, L.; HUFNAGEL, D.; TAYLOR, H.S. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Biology of Reproduction**, v.92, n.6-138, p.1-11, 2015.

NAVARRETE, F.; FERNANDO, S.; GABRIELA, C.; FERNANDA, R.; PABLO, S.P.; LLERETNY R.A.; DANIELA, R.; JOEL, C.; CAROLINA, M.A.; OVIDIO, C.F. Assessment of the anti-inflammatory and engraftment potential of horse endometrial and adipose mesenchymal stem cells in an in vivo model of post breeding induced endometritis. **Theriogenology**, v.155, p.33-42, 2020.

NEMETH, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P.S.; MAYER, B.; PARMELEE, A.; DOI, K. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. **Nature Medicine**, v.15, n.1, p.42-49, 2009.

NOTCH, U.; RACKWITZ, L.; STEINERT, A.F.; TUAN, R.S. Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.62, p.765-783, 2010.

OCK, S.; BAREGUNDI SUBBARAO, R.; LEE, Y.; LEE, J.; JEON, R.; LEE, S.; PARK, J.; HWANG, S.; RHO, G. Comparison of immunomodulation properties of porcine mesenchymal stromal/stem cells derived from the bone marrow, adipose tissue, and dermal skin tissue. **Stem Cells International**, 2016.

OJEH, N.; PASTAR, I.; TOMIC-CANIC, M.; STOJADINOVIC, O. Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n.10, p.25476-25501, 2015.

OTSURU, S.; GORDON, P.L.; SHIMONO, K.; JETHVA, R.; MARINO, R.; PHILLIPS, C.L. Transplanted bone marrow mononuclear cells and MSCs impart clinical benefit to children with osteogenesis imperfecta through different mechanisms. **Blood**, v.120, n.9, p.1933-1941, 2012.

PACHOLEWSKA, A.; DROGEMULLER, M.; KLUKOWSKA-ROTZLER, J.; LANZ, S.; HAMZA, E.; DERMITZAKIS, E.T.; MARTI, E.; GERBER, V.; LEEB, T.; JAGANNATHAN, V. The transcriptome of equine peripheral blood mononuclear cells. **PLoS One**, v.10, n.3, 2015.

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

PENNINGTON, M.R.; CURTIS, T.M.; DIVERS, T.J.; WAGNER, B.; NESS, S.L.; TENNANT, B.C.; VAN DE WALLE, G.R. Equine mesenchymal stromal cells from

different sources efficiently differentiate into hepatocyte-like cells. **Tissue Engineering Part C Methods**, v.22, p.596-607, 2016.

PHINNEY, D.G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. **Journal of Cell Biochemistry**, v.113, p.2806-2812, 2012.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p.143-147, 1999.

PRADO, A.A.F.; FAVARON, P.O.; CORREIA DA SILVA, L.C.L.; BACCARIN, R.Y.A.; MIGLINO, M.A.; MARIA, D.A. Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. **BMC Veterinary Research**, v.11, p.281, 2015.

PROCKOP, D.J.; YOUN, J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. **Molecular Therapy**, v.20, p.14-20, 2012.

RADTKE, C.L.; NINO-FONG, R.; ESPARZA GONZALEZ, B.P.; STRYHN, H.; MCDUFFEE, L.A. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue- and periosteal tissue-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v.74, n.5, p.790-800, 2013.

RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMEROA, A. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.144, p.147-154, 2011.

REED, S.A.; JOHNSON, S.E. Expression of scleraxis and tenascin C in equine adipose and umbilical cord blood derived stem cells is dependent upon substrata and FGF supplementation. **Cytotechnology**, v.66, p.27-35, 2014.

REINISCH, A.; ETCHART, N.; THOMAS, D.; HOFMANN, N.A.; FRUEHWIRTH, M.; SINHA, S.; CHAN, C.K.; SENARATH-YAPA, K.; SEO, E.; WEARDA, T.; HARTWIG, U.F.; BEHAM-SCHIMD, C.; TRAJANOSKI, S.; LIN, Q.; WAGNER, W.; DULLIN, C.; ALVES, F.; ANDREEFF, M.; WEISSMAN, I.L.; LONGAKER, M.T.; SCHALLMOSER, K.; MAJETI, R.; STRUNK, D. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. **Blood**, v.125, n.2, p.249-260, 2015.

REVEL, A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy as

a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem cells.

Obstetrical & Gynecological Survey, v.64, p.249-257, 2009.

REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C.M. Purification and ex-vivo expansion of post-natal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v.12, p.2615–2625, 2001.

RINK, B.E.; AMILON, K.R.; ESTEVES, C.L.; FRENCH, H.M.; WATSON, E.; AURICH, C.; DONADEU, F.X. Isolation and characterization of equine endometrial mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v.8, p.166, 2017.

RINK, B.E.; BEYER, T.; FRENCH, H.M.; WATSON, E.; AURICH, C.; DONADEU, F.X. The fate of autologous endometrial mesenchymal stromal cells after application in the healthy equine uterus. **Stem Cells and Development**, v.27, n.15, p.1046-1052, 2018.

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

SCHWAB, K.E.; GARGETT, C.E. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. **Human Reproduction**, v.22, p.2903–2911, 2007.

SCHURING, A.N.; SCHULTE, N.; KELSCH, R.; ROPKE, A.; KIESEL, L.; GOTTE, M. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. **Fertility and Sterility**, v.95, p.423-426, 2011.

SERTEYN, D.; PIQUEMAL, D.; VANDERHEYDEN, L.; LEJEUNE, J.P.; VERWILGHEN, D.; SANDERSEN, C. Gene expression profiling from leukocytes of horses affected by osteochondrosis. **Journal of Orthopaedic Research**, v.28, p.956-970, 2010.

SILVA, L.H.A.; ANTUNES, M.A.; DOS SANTOS, C.C.; WEISS, D.J.; CRUZ, F.F.; ROCCO, P.R.M. Strategies to improve the therapeutic effects of mesenchymal stromal cells in respiratory diseases. **Stem Cell Research and therapy**, v.9, n.1, p.45, 2018.

SHOAE-HASSANI, A.; MORTAZAVI-TABATABAEI, S.A.; SHARIF, S.; SEIFALIAN, A.M.; AZIMI, A.; SAMADIKUCHAKSARAEI, A. Differentiation of

human endometrial stem cells into urothelial cells on a three-dimensional nanofibrous silk-collagen scaffold: an autologous cell resource for reconstruction of the urinary bladder wall: human endometrial stem cell differentiation into urothelial cells. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.9, p.1268-1276, 2015.

SLAYDEN, O.D.; BRENNER, R.M. Hormonal regulation and localization of estrogen, progestin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists. **Archives of Histology and Cytology**, v.67, p.393-409, 2004.

SMITH, R.K.W.; KORDA, M.; BLUNN, G.W.; GOODSHIP, A.E. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.99-102, 2003.

SNIDER, T.A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G.R. Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology**, v.75, p.1567-1581, 2011.

SNYDER, E.Y.; LORING, J.F. A role for stem cell biology in the physiological and pathological aspects of aging: Role for stem cell biology in aging. **Journal of the American Geriatrics Society**, v.53, p.S287-S291, 2005.

SORDI, V.; PIEMONTE, L. Therapeutic plasticity of stem cells and allograft tolerance. **Cytotherapy**, v.13, p.647-660, 2011.

SPAAS, J.H.; GAMBACURTA, A.; POLETTINI, M. Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.80, p.129-135, 2011.

SPRINGER, T. A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, p. 425-434, 1990.

SULTAN, M.; SCHULZ, M.H.; RICHARD, H.; MAGEN, A.; KLINGENHOFF, SCHERF, M.; SEIFERT, M.; BORODINA, T.; SOLDATOV, A.; PARKHOMCHUK, D.; SCHIMIDT, D.; O'KEEFFE, S.; HAAS, S.; VINGRON, M.; LEHRACH, H.; YASPO, M. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. **Science**, v.321, n.5891, p.956-960, 2008.

TAYLOR, S.E.; SMITH, R.K.W.; CLEGG, P.D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? **Equine**

Veterinary Journal, v.39, n.2, p.172-180, 2007.

THEORET, C. Tissue engineering in wound repair: the three "R"s - repair, replace, regenerate. **Veterinary Surgery**, v.38, p.905-913, 2009.

TOGEL, F.; HU, Z.; WEISS, K.; ISAAC, J.; LANGE, C.; WESTENFELDER, C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v.289, n.1, p.F31-42, 2005.

TONDREAU, T.; MEULEMAN, N.; DELFORGE, A.; DEJENEFTE, M.; LEROY, R.; MASSY, M. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. **Stem Cells**, v.23, n.8, p.1105-1112, 2005.

VIDAL, M.A.; ROBINSON, S.O.; LOPEZ, M.J. Comparison of chondrogenic potential in equine mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue and bone marrow. **Veterinary Surgery**, v.37, p.713-724, 2009.

VOLK, S.W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: the role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**, v.21, n.3, p.382-394, 2013.

WAGNER, W.; HO, A.D.; ZENKE, M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part B Reviews**, v.16, n.4, p.445-453, 2000.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Review*, Londres, v. 10, p. 57-63, jan. 2009.

WANG, J.; LU, J.; BOND, M.C.; CHEN, M.; REN, X.R.; LYERLY, H.K.; BARAK, L.S.; CHEN, W. Identification of select glucocorticoids as Smoothed agonists: potential utility for regenerative medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.9323-9328, 2010.

WANG, X.; MILLER, D.C.; CLARK, A.G.; ANTEZAK, D.F. Random X inactivation in the mule and horse placenta. **Genome Research**, v.22, p.1855-1863, 2012.

WATSON, E.D.; SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.201, p.438-440, 1992.

WEN, L.; TANG, F. Single-cell sequencing in stem cell biology. **Genome Biology**, v.17, p.71, 2016.

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

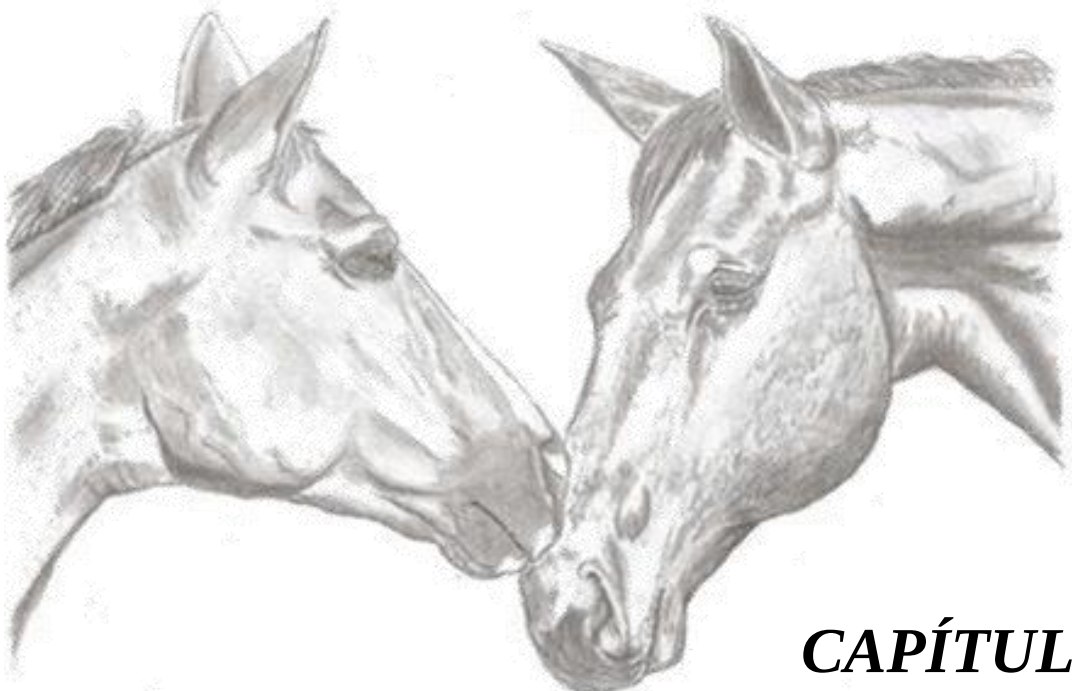
WOODWARD, E.M.; TROEDSSON, M.H. Equine breeding-induced endometritis: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.673-682, 2013.

WU, Y.; CHEN, L.; SCOTT, P.G.; TREDGET, E.E. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. **Stem Cells**, v.25, p.2648-2659, 2007.

ZHOU, W.; LIN, J.; ZHAO, K.; JIN, K.; HE, Q.; HU, Y.; OUYANG, H. Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin. **The American Journal of Sports Medicine**, v.47, n.7, p.1722-1733, 2019.

*“E o futuro é uma astronave que tentamos pilotar
Não tem tempo nem piedade nem tem hora de chegar
Sem pedir licença muda nossa vida
Depois convida a rir ou chorar
Nessa estrada não nos cabe conhecer ou ver o que virá
O fim dela ninguém sabe bem ao certo onde vai dar
Vamos todos numa linda passarela
De uma aquarela que um dia enfim
Descolorirá”*

Toquinho e Vinícius de Moraes



CAPÍTULO 2

1 Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X,
2 ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES quadriênio 2013 – 2016.

3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>

4 **CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DE TECIDO ENDOMETRIAL E DE**
5 **TECIDO ADIPOSEO EQUINO APRESENTAM ASSINATURA**
6 **TRANSCRIPTOMICA SEMELHANTE**

7

8 Ramona Bastos Bernardo, Fernanda da Cruz Landim*

9

10

11 Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de
12 Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio
13 de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brasil

14 *Autor para correspondência Tel.: (+55) 14 99761-1964

15 E-mail: fernanda.landim@unesp.br

16

17 **RESUMO**

18 Células estromais mesenquimais de tecido endometrial e adiposo equino com
19 características imunofenotípicas e de multipotencialidade semelhantes tiveram
20 sua assinatura transcriptômica comparada através de Sequenciamento de Nova
21 Geração. Cinco éguas adultas (n=5), com histórico reprodutivo reconhecido,
22 foram submetidas à biópsia uterina para colheita de tecido endometrial (MSC-
23 TE). Ademais, foi colhido tecido adiposo dos mesmos animais (MSC-TA). As
24 MSC's foram avaliadas *in vitro* quanto ao potencial de diferenciação adipogênico
25 e osteogênico. As MSC-TE e MSC-TA foram cultivadas *in vitro* e testados os
26 marcadores CD90, CD105, CD34 e MHC II, por de citometria de fluxo. A colheita

27 das MSC-TE pela biópsia uterina se mostrou viável, sendo possível isolar e
28 cultivar as células-tronco de origem endometrial. As MSC-TE e MSC-TA foram
29 capazes de se diferenciar nas linhagens adipogênica e osteogênica. As MSC's
30 apresentaram elevada expressão dos marcadores de superfície CD90 e CD105
31 e baixa ou ausência de expressão de MHC II e CD34. Portanto, as células
32 estromais mesenquimais advindas do endométrio equino são capazes de ser
33 isoladas através de biópsia uterina, apresentando características
34 imunofenotípica, de multipotencialidade e de produção de transcritos
35 semelhantes ao tecido adiposo, podendo se tornar, com mais pesquisas na área
36 terapêutica, fonte usual de coleta de MSC's.

37 **Palavras-chave:** célula estromal mesenquimal, endométrio, equino, útero

38

39 1. INTRODUÇÃO

40 As células estromais mesenquimais (MSC's) possuem propriedades
41 regenerativas e imunomodulatórias, sendo cada vez mais utilizadas na prática
42 veterinária [1]. MSC's são capazes de diminuir a inflamação, proteger os tecidos
43 contra hipóxia e injúria por reperfusão e prevenir rejeição alogênica [2]. Além
44 disso, influenciam respostas imunes, tanto adaptativas, como inatas, pela
45 comunicação autócrina e parácrina, destacando-se a liberação de proteínas
46 hidrossolúveis como: quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas [3,4].
47 Portanto, tais células, e também o meio no qual são cultivadas, são alternativas
48 promissoras para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo as do
49 sistema reprodutivo [5].

50 As células tronco estromais mesenquimais ou células-tronco
51 mesenquimais podem ser isoladas de diversos tecidos, sendo os mais comuns:

52 sangue periférico, cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo [6], sendo as
53 duas últimas fontes as mais comuns nos equinos, as quais são utilizadas com
54 sucesso para o tratamento de doenças musculoesqueléticas e lesões tendíneas.
55 Porém, para obtenção das células é necessário realizar procedimento cirúrgico,
56 o que tem aumentado o interesse das pesquisas para fontes menos invasivas
57 como sangue periférico total, sangue do cordão umbilical ou Gelatina de Wharton
58 (matriz do cordão umbilical). Neste contexto, o endométrio, também se mostra
59 atrativo como fonte de células estromais mesenquimais [7].

60 O endométrio é composto de células epiteliais, estromais, endoteliais,
61 fibras musculares e leucócitos. As células do estroma endometrial são
62 dinâmicas, capazes de se proliferar durante o ciclo estral e gestação [8], estando
63 sob influência de fatores de crescimento e esteroides ovarianos [9].

64 As MSC's de origem endometrial (MSC-TE) já foram isoladas de diversas
65 espécies como humanos, roedores, suínos e ovinos [7]. O primeiro isolamento
66 em humanos ocorreu em 2006 com amostras advindas de histerectomia,
67 representando avanço em relação ao mecanismo das doenças endometriais
68 caracterizadas por crescimento anormal, em particular, câncer uterino,
69 hiperplasia endometrial, endometriose e adenomiose [10]. Além disso, já foi
70 demonstrado o potencial terapêutico deste tipo celular em doenças como
71 falência prematura de ovário [11], doença de Parkinson [12] e prolapso de órgãos
72 pélvicos [13].

73 Mais tarde, Schüring et al. [14] isolaram estas células por biópsia uterina
74 comprovando que estão presentes nas camadas mais superficiais do endométrio
75 humano. A biópsia é uma opção viável para a colheita de MSC's, por sua

76 facilidade no procedimento, frequentemente realizado em rotina clínica e
77 preservando o útero [14,15].

78 Estudos similares foram conduzidos em equinos, os quais indicaram uma
79 nova fonte de MSC's, explorando o seu potencial terapêutico [7,15]. Afecções
80 crônicas e degenerativas do trato reprodutivo das éguas, não responsivas aos
81 tratamentos convencionais, podem se beneficiar deste protocolo [16]. E já foi
82 comprovada a segurança da aplicação de MSC's no endométrio equino,
83 corroborando a implementação desta opção terapêutica nas doenças
84 reprodutivas [17].

85 A endometrose é uma doença crônica degenerativa que causa
86 infertilidade nas éguas, sendo originada na fibrose endometrial e alterações
87 glandulares [17,18]. Atualmente não existe tratamento efetivo para esta afecção,
88 mas já foi relatado o uso de MSC's de origem adiposa (MSC-TA) com redução
89 na progressão da doença [19]. Também já foi relatado uso de MSC's da medula
90 óssea em endometrite pós-cobertura, com resultados promissores na modulação
91 da inflamação [20]. Por isso, um tratamento com células de origem endometrial
92 para esta afecção poderia produzir resultados ainda melhores [21].

93 Tendo em vista o exposto acima, o objetivo desse estudo foi caracterizar
94 células estromais mesenquimais de tecido endometrial de éguas em diestro
95 avaliando seu transcriptoma em relação ao de células do tecido adiposo visando
96 traçar um paralelo quanto ao seu potencial terapêutico.

97

98 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

99 Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade
100 de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – Campus de Botucatu, São Paulo,
101 sob protocolo CEUA 0233/2018.

102

103 **2.1. Seleção dos animais**

104 Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas 5 éguas mestiças,
105 entre 12 e 18 anos de idade, com histórico reprodutivo conhecido e escore
106 corporal 5 a 7, numa escala de 9 pontos [22]. Os animais foram selecionados
107 pelas condições uterinas, avaliadas pela palpação retal e ultrassonografia (Sono
108 Scape A5V –Hong Kong-China). Foram utilizados como critérios de inclusão,
109 éguas apresentando boa tonicidade uterina, ausência de líquido no lúmen, sem
110 edema endometrial e presença de corpo lúteo no ovário, caracterizando o diestro
111 [23].

112

113 **2.2. Caracterização das MSC's**

114 Ambos os tecidos, adiposo e endometrial, foram isolados, cultivados e, na
115 segunda passagem celular, uma amostra de MSC's foi usada para
116 caracterização pela expressão de marcadores de superfície celular
117 (imunofenótipo) e avaliação do potencial de diferenciação em duas linhagens
118 mesenquimais: adipogênica e osteogênica. Uma nova amostra foi utilizada para
119 análise transcriptômica.

2.3. Isolamento, expansão e criopreservação das células estromais mesenquimais

2.3.1. Tecido endometrial

A obtenção do tecido endometrial foi feita pela biópsia uterina. Todos os procedimentos intrauterinos foram realizados com equipamentos esterilizados e o examinador utilizou luvas de palpação descartáveis. As éguas foram contidas em brete, foi feita antissepsia do períneo com detergente neutro, enxaguado duas vezes, e secado com papel toalha. Foi utilizada pinça de biópsia do tipo Jacaré, recuperando da base de um dos cornos uterinos, um fragmento de tecido de aproximadamente 1 x 0,5cm, utilizando procedimentos padrões para a técnica [24]. As amostras foram armazenadas em tubo cônico graduado contendo 25 mL de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution; Gibco®), acrescido de 1,2% de anfotericina B e 1% de penicilina/estreptomicina e transportados para o laboratório. O protocolo utilizado para isolamento, expansão e criopreservação das células foi uma adaptação do processo realizado por Moraes et al. [25]. O protocolo de isolamento constituiu-se por 4 lavagens do tecido em placas de Petri. A primeira lavagem foi realizada com álcool 70% e as posteriores, com a mesma solução do transporte. O fragmento foi dissecado em pequenos fragmentos (1-2mm³) com auxílio de lâminas de bisturi nº 23, acrescido de 25 mL de HBSS com 0,3% de tripsina (TrypLE™ Express, no phenol red, 1X, Gibco®) para digestão química, e centrifugado durante 15 minutos a 1800 g. Na sequência, a amostra foi agitada no vórtex por 10 segundos, passada em filtro de Nylon 70 µm e novamente centrifugada, a 340 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 5 mL de meio de cultivo contendo 40% de solução DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium,

Gibco®) baixa glicose, 40% de F-12 Nutrient Mixture, 20% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina/estreptomicina, 1,2% de anfotericina B e 0,22% de amicacina (TEUTO). A amostra foi cultivada em frascos de 25 cm² com sistema de filtração, incubadas a 37,5 °C, atmosfera úmida com 95% de ar e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas e, quando os frascos atingiram uma confluência de 90%, foi realizada a ressuspensão das células por tripsinização para criopreservação. Este processo foi similar ao protocolo utilizado por Mitchell et al. [26], utilizando solução com 90% de SFB e 10% de DMSO. As amostras foram reconstituídas utilizando protocolo descrito por Chaytor et al. [27].

2.3.2. Tecido adiposo

A colheita e o isolamento das MSC's de origem adiposa foram realizados segundo o protocolo padrão estabelecido pelo Laboratório. Em resumo, as éguas foram devidamente contidas em brete, sedadas e feita a anestesia local com cloreto de lidocaína a 2%. A anestesia local foi por via subcutânea em forma de L invertido, na região glútea caudodorsal paraxial, previamente tricotomizada. Foi feita incisão da pele e retirado fragmento de gordura de aproximadamente 2 cm². O armazenamento das amostras até o laboratório foi feito da mesma maneira do tecido endometrial. Para o isolamento, o tecido foi lavado uma vez em placa de Petri com álcool 70% e 3 vezes com solução semelhante à de transporte. Em seguida, foi feita fragmentação mecânica do tecido com ajuda de lâminas de bisturi nº 23 e a amostra foi acondicionada em tubo cônico contendo 25 mL de HBSS acrescido de 0,04% de collagenase *Clostridium histolyticum*, durante 30 minutos à 37°C, para digestão química. A seguir, foram agitados no

170 vórtex, passados em filtro de Nylon 70 µm e centrifugados 3 vezes durante 10
171 minutos, a 340 g. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspendido em
172 HBSS para remoção da colagenase. A amostra foi cultivada em 5 mL de meio
173 contendo 40% de DMEM baixa glicose, 40% de F12 Nutrient Mixture e 20% de
174 SFB, acrescido de 1,2% de anfotericina B, 1% de penicilina/estreptomicina e
175 0,22% de amicacina (TEUTO), em garrafas de 25 cm² com sistema de filtração,
176 em atmosfera úmida com 95% ar e 5% CO₂ a 37,5°C.

177

178 **2.4. Diferenciações adipogênica e osteogênica**

179 Todos os procedimentos descritos abaixo foram feitos em placas de 24
180 poços em duplicatas, sendo utilizado o protocolo descrito por Maia et al. [28]. O
181 meio de diferenciação comercial (STEMPRO differentiation kit, Invitrogen, São
182 Paulo, Brasil) foi usado durante 14 dias para linhagem adipogênica e 21 dias
183 para a osteogênica, sendo trocado a cada 3 dias. Para identificação da
184 diferenciação osteogênica, as células foram lavadas com HBSS e fixadas com
185 paraformaldeído 4% durante 20 minutos a 4º C. As placas foram lavadas com
186 água ultrapura (MilliQ®) e as células coradas com 300µL de Alizarin Red S 2,5%
187 (Sigma Aldrich), durante 2 minutos na temperatura ambiente. O excesso do
188 corante foi removido lavando-se 2 vezes com água ultrapura (MilliQ®).
189 Finalmente, os poços foram examinados em microscópio invertido para observar
190 a presença de cristais de hidroxiapatita. Para diferenciação adipogênica as
191 células foram lavadas com HBSS e fixadas com paraformaldeído 4% durante 20
192 minutos à 4º C. Lavou-se gentilmente com água ultrapura (MilliQ®) e corou-se
193 com 300 µL de solução de Oil Red 0,5% (Sigma Aldrich) durante 10 minutos na
194 temperatura ambiente. Lavou-se duas vezes com água ultrapura (MilliQ®) para

retirar o excesso de corante e, então, adicionou-se 300 µL de hematoxilina, incubando-se por 2 minutos. Foi novamente enxaguada e os poços observados no microscópio invertido para exame dos grânulos de lipídios intracelulares, corados em vermelho.

2.5. Análise dos marcadores de superfície celular

Os marcadores de superfície das células estromais mesenquimais foram analisados pela citometria de fluxo (FC500, Beckman Coulter, Hialeah, FL, EUA) de acordo com a técnica descrita por Maia et al. [26]. Foram examinadas as expressões de CD34 (mouse anti-human CD-34-FITC, BD Pharmingen, San Jose, EUA), CD90 (mouse anti-human CD90-FITC, BD Pharmingen, San Jose, EUA), CD105 (mouse anti-human CD105, Abcam San Francisco, California, USA), MHC II (mouse anti-horse MHC II monomórfico clone CVS20, AbD Serotec, UK). Para o MHC II, anticorpo secundário apropriado foi utilizado (Rabbit anti-mouse PE serotec 0105). Utilizou-se protocolo padrão sugerido pelos fabricantes de cada um dos anticorpos primários e secundários, as mesmas leituras foram feitas tanto para células de tecido adiposo quanto endometrial e 10.000 eventos foram contabilizados.

2.6. Extração de RNA e formação da biblioteca

RNA total foi extraído de amostras de 5 éguas utilizando protocolo do reagente trizol[®] de acordo com as recomendações do fabricante (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). A quantificação foi feita utilizando o fluorômetro Qubit[™] 2.0 (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) e os níveis de degradação foram avaliados em gel de agarose 1%. A biblioteca de DNA complementar

(cDNA) foi construída com amostras de 200 ng, pelo kit SureSelect Strand Specific (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). O produto desta biblioteca foi sequenciado utilizando a plataforma Illumina NextSeq (Illumina, San Diego, USA) com corridas de 150 pares de base.

2.7. Processamento do RNAseq e análise diferencial dos genes

A plataforma CLC Workbench versão 7.1 foi utilizada para remover os adaptadores e selecionar os transcritos de qualidade, além de mapear os transcritos de acordo com a biblioteca de referência NCBI Cab3. A análise diferencial da expressão gênica foi feita pela plataforma DESeq2 versão 1.24.012 e os genes com valor p ajustado $<0,05$ foram considerados significativamente regulados. Os dados do componente principal (PCA) e mapeamento foram feitos pelo Pacote pcaExplorer, em R. Para a análise de aglomeração foi utilizada distância de Euclidean e, para análise ontológica, o gProfiler.

3. RESULTADOS

3.1. Isolamento e cultivo celular

O cultivo primário das células mesenquimais de tecido adiposo (MSC-TA) foi obtido pela digestão química com collagenase, sendo observada a adesão ao plástico e morfologia clássica fibroblastóide após 5 dias de cultivo. Após isolamento e expansão primária das MSC-TA foi obtido 80% de confluência com 18,3 dias de cultivo, em média.

Por outro lado, o cultivo celular primário das amostras de tecido endometrial equino (MSC-TE) foi obtido pela digestão por tripsina, sendo

245 possível o isolamento das células aderentes ao plástico morfologia
246 fibroblastóide. Somente a partir do sexto dia de cultivo foi possível observar
247 células aderidas ao frasco, sendo o tempo necessário para que o cultivo
248 atingisse a confluência de 60% um total de 19 dias, em média, quando foi feita a
249 passagem celular.

250

251 **3.2. Potencial de diferenciação nas linhagens mesodermas**

252 O potencial de diferenciação *in vitro* nas duas linhagens, adipogênica e
253 osteogênica, foi demonstrado tanto nas MSC-TA e TE, em células em P2. As
254 amostras tanto de origem endometrial quanto adiposas foram similares em suas
255 capacidades de diferenciação. No controle negativo, em que as células não
256 foram induzidas para diferenciação, não foram observadas mudanças
257 morfológicas.

258 As células induzidas para diferenciação adipogênica apresentaram
259 acúmulo de gotículas de lipídeo no citoplasma, sendo confirmada pela coloração
260 com Oil Red, ao término de 14 dias. E o cultivo em meio indutor de diferenciação
261 osteogênica resultou em produção de depósito extracelular de cálcio,
262 confirmados pelo corante Alizarin Red (Fig. 1).

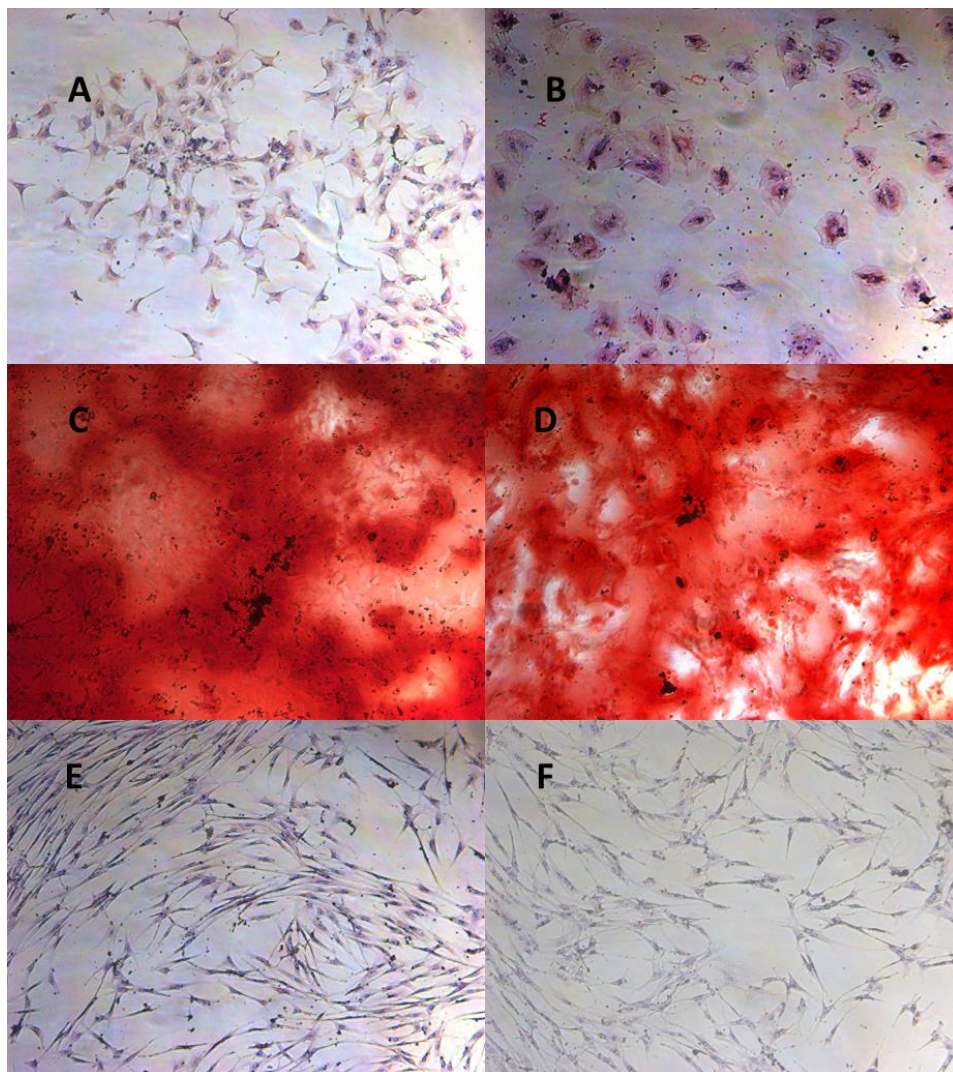


Figura 1. Diferenciação das MSC's do tecido adiposo (A,C,E) e do tecido endometrial (B,D,F) nas duas linhagens mesenquimais durante a segunda passagem. (A,B) MSC's apresentando gotículas lipídicas dentro do citoplasma, confirmando a linhagem adipogênica. (C,D) MSC's coradas com Alizarin Red evidenciando a matriz de cálcio extracelular. (E,F) Grupos controle. Aumento de 100 X (E,F) e 200 X (A-D).

3.3 Caracterização imunofenotípica

O perfil de marcadores de superfície celular das MSC-TA e MSC-TE, analisado pela citometria de fluxo, revelou elevada expressão dos marcadores CD90 e CD105 e baixa ou ausência de expressão dos marcadores CD34 e MHC II (Fig. 2). A média percentual da expressão dos marcadores e desvio padrão para cada fonte de MSC's podem ser observadas na Tabela1.

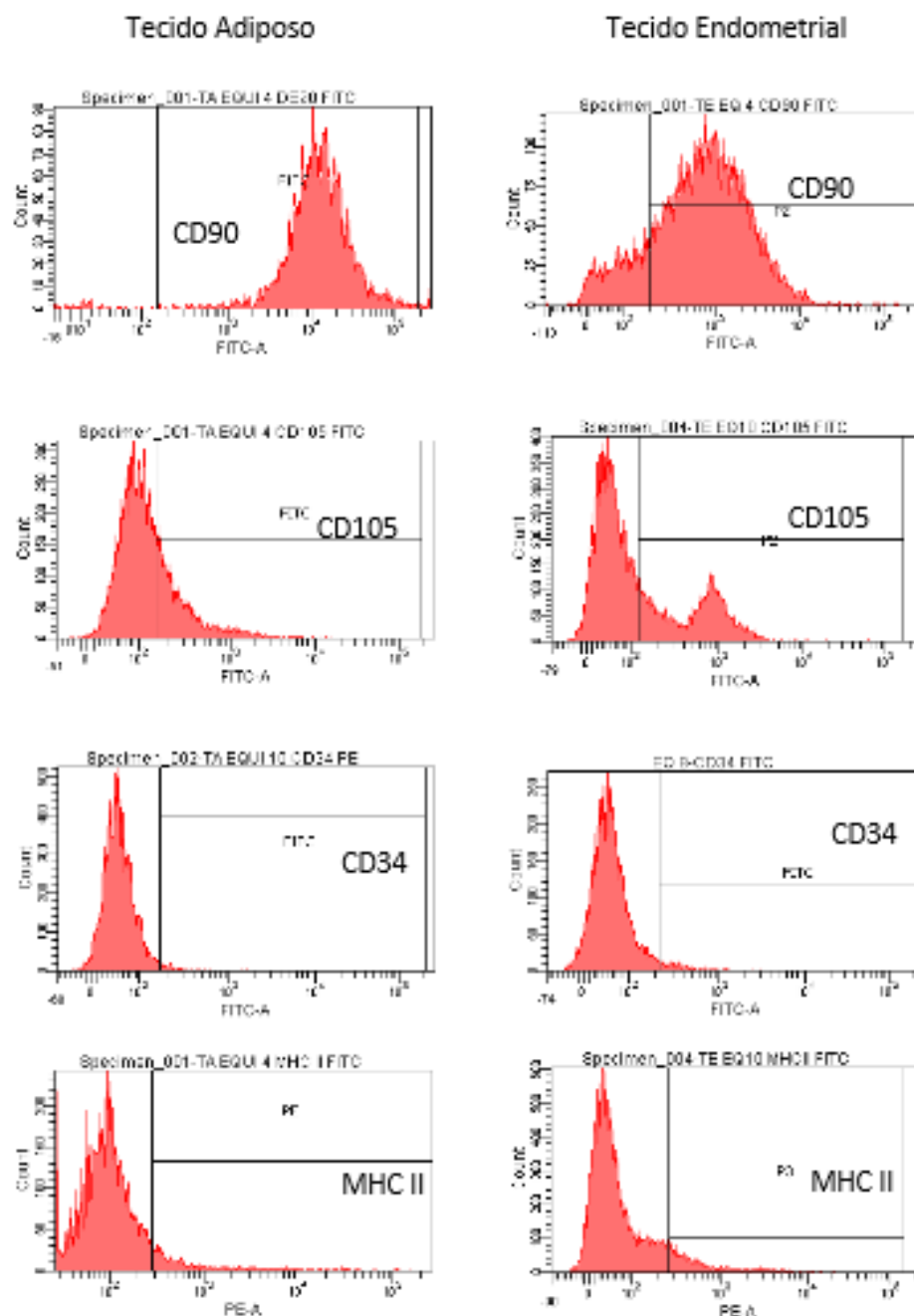


Figura 2 – Histogramas representando o perfil das amostras de MSC-TA e MSC-TE analisadas pela técnica de citometria de fluxo após segunda passagem, avaliando-se os marcadores de superfície celular CD90, CD105, CD34 e MHC II. As MSC's foram positivas para CD90 e CD105, negativas para CD34 e apresentaram baixa expressão do MHC II.

3.4 Análise transcriptômica

A análise do transcriptoma foi realizada com objetivo de avaliar similaridades e diferenças entre os tecidos, adiposo e endometrial. Durante o preparo do material, duas amostras de tecido endometrial foram perdidas. Desta

287 forma, foram comparados os dados de 5 amostras de tecido adiposo e 3
288 amostras de tecido endometrial.

289 O sequenciamento identificou um total de 20.777 transcritos, que foram
290 classificados baseados em sua abundância. O resultado da transcriptômica foi
291 analisado para identificação de acordo com a significância estatística e função
292 biológica. Quando utilizado o $P_{adj} < 0,05$, foi observado que 690 (3,3%) genes
293 apresentaram diferença significativa nas amostras analisadas.

294

295 Tabela 1. Médias percentuais de marcação das MSC's originadas nos tecidos
296 adiposo (MSC-TA) e endometrial (MSC-TE) na segunda passagem celular por
297 citometria de fluxo para os marcadores CD90, CD105, CD34 e MHC II.

Tratamento	Marcação			
	CD90	CD105	CD34	MHC II
MSC-TA	96,9±2,7	23,2±9,8	1,4±0,7	9,1±1,1
MSC-TE	84,4±8,0	33,7±5,2	2,9±0,4	12,9±9,0

298

299 3.4.1. Análise de Componente Principal (PCA)

300 A PCA é uma ferramenta estatística que distribui as amostras em espaço
301 bidimensional baseado na variação da expressão gênica. Aquelas com perfil
302 gênico semelhantes se agrupam no gráfico. Na presente análise de PCA houve
303 uma diferenciação entre as amostras (TA= MSC's de tecido adiposo, TE= MSC's
304 de tecido endometrial), segundo o primeiro componente (eixo x). (Fig. 3).

305 A análise dos transcritos de acordo com seus principais processos
306 biológicos demonstrou um total de 259 (2%) genes regulados positivamente e
307 355 (2,8%) genes regulados negativamente nas amostras de MSC-TE (Figura
308 4).

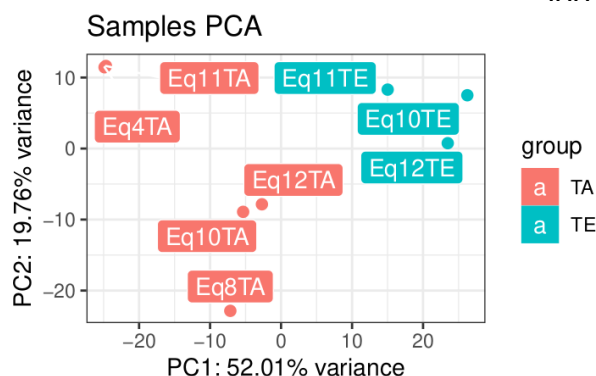
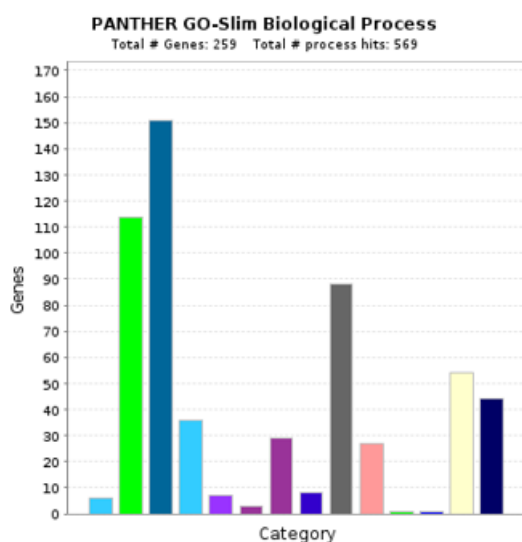
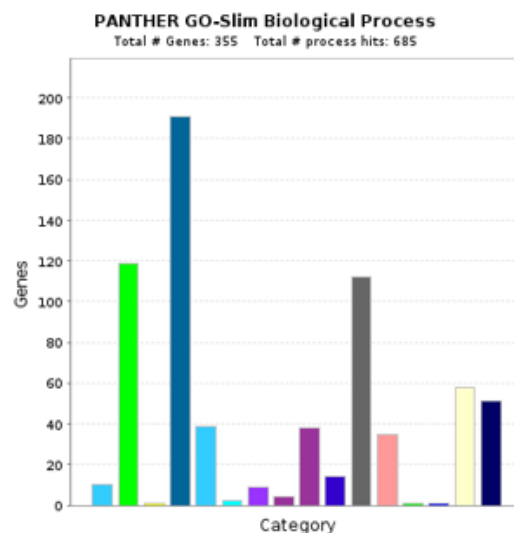


Figura 3: Análise de componente principal (PCA) indicando a presença de dois grupos distintos. Tecido adiposo (TA) em rosa e tecido endometrial (TE) em azul.

REGULADOS POSITIVAMENTE



REGULADOS NEGATIVAMENTE



biological adhesion (GO:0022610)

biological regulation (GO:0065007)

biomineralization (GO:0110148)

cellular process (GO:0009987)

developmental process (GO:0032502)

growth (GO:0040007)

immune system process (GO:0002376)

interspecies interaction between organisms (GO:0044419)

localization (GO:0051179)

locomotion (GO:0040011)

metabolic process (GO:0008152)

multicellular organismal process (GO:0032501)

reproduction (GO:0000003)

reproductive process (GO:0022414)

response to stimulus (GO:0050896)

signaling (GO:0023052)

biological adhesion (GO:0022610)

biological regulation (GO:0065007)

biomineralization (GO:0110148)

cellular process (GO:0009987)

developmental process (GO:0032502)

growth (GO:0040007)

immune system process (GO:0002376)

interspecies interaction between organisms (GO:0044419)

localization (GO:0051179)

locomotion (GO:0040011)

metabolic process (GO:0008152)

multicellular organismal process (GO:0032501)

reproduction (GO:0000003)

reproductive process (GO:0022414)

response to stimulus (GO:0050896)

signaling (GO:0023052)

Figura 4. Gráfico em barras representando os processos biológicos controlados por 427 genes regulados positivamente e 587 genes regulados negativamente nas MSC's endometriais.

Utilizando-se o Log2FoldChange, foram extraídos dos genes diferencialmente expressos, os 10 mais expressos (tabela 2) e os 10 menos expressos (tabela 3), comparando as MSC-TE com as de tecido adiposo.

Tabela 2. Os 10 genes mais expressos, comparando MSC's TE com MSC's de tecido adiposo.

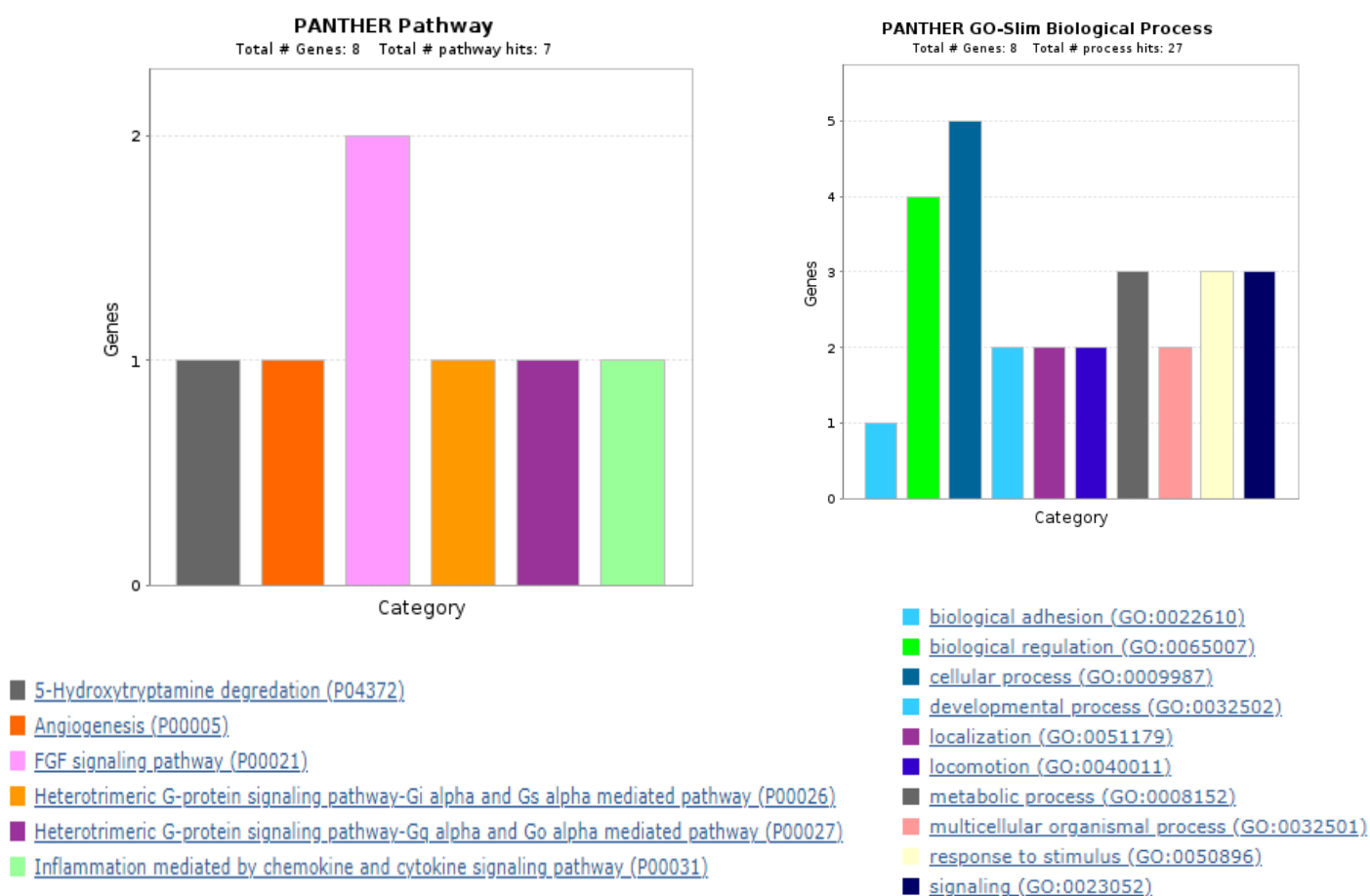
Gene	Descrição	Log2FoldChange
CLDN1	Claudina 1; proteína de adesão celular epitelial e endotelial	6.003912013
FGF5	Fator de crescimento fibroblástico; atividade mitogênica; oncogene	4.044393835
FGF1	Fator de crescimento fibroblástico; atividade mitogênica e atua na migração de células endoteliais	5.345941901
RGS4	Regulador de sinalização da proteína G; regulação negativa da proteína G	9.208792998
ALDH1A2	Aldeído desidrogenase; catalisa a síntese de ácido retinóico	12.53417083
ANKRD1	Domínio de repetição de anquirina 1; fator de transcrição induzido pela IL-1 e TNF- α ; ativação de células endoteliais	2.67279025
IGFBP2	Proteína ligadora de IGF1 e IGF2; alta expressão desta proteína está associada à proliferação celular e formação de tumores	1.998699852
CPVL	Carboxipeptidase; classe de protease que cliva um único aminoácido; metabolismo celular	3.104814792
LOC100629324	Formin-like protein 5	5,164794481
DES	Específica do tecido muscular, essencial para estrutura e função dos sarcômeros	1,987045857

345 Tabela 3: Os 10 genes menos expressos, comparando MSC's de tecido
 346 endometrial com as de tecido adiposo.

Gene	Description	Log2FoldChange
MMP1	Matrix metaloproteinase 1; quebra da matriz extracelular em processos fisiológicos; também associado a doenças como artrite e doença pulmonar obstrutiva	-5.026649441
CCL26	Ligante de quimiocinas CC; quimiocina CC atrai eosinófilos e basófilos; contribui com acúmulo em doenças atópicas	-6.0382589
KITLG	Kit ligante; atua no útero, células germinativas, desenvolvimento neural e hematopoiese; envolvido na migração celular	-5.031858828
CRABP2	Proteína ligadora de ácido retinóico; transporta ácido retinóico e colesterol do citoplasma para o núcleo	-5.738727862
ANGPTL2	Glicoproteína semelhante à angiopoetina; são membros da família VEGF; exerce função sobre as células endoteliais de forma parácrina e autócrina	-3.723819327
CEMIP	Hialuronidase 1 indutora de migração celular; media a despolimerização do ácido hialurônico; envolvido na endocitose celular; regula positivamente a transição mesenquimal epitelial e crescimento tumoral	-4.708695385
LAMA4	Laminina 4; componente da matriz extracelular; implicado em adesão celular e diferenciação	-3.176352804
ICAM1	Molécula de adesão intercelular; expressa tipicamente por células endoteliais e células do sistema imune	-3.197981681
NFIB	Fator de transcrição do GFAP; essencial para o desenvolvimento do cérebro	-6.626045422
CA12	Anidrase carbônica 12; catalisadora da hidratação do CO ₂ , atuante na respiração celular, calcificação, balanço acidobásico e reabsorção óssea	-4,086056295

Entre os genes mais significativamente expressos nas MSC-TE, as vias metabólicas envolvidas foram: via de sinalização de FGF, angiogênese, degradação de serotonina, sinalização de proteína G e imunomodulação. E os processos biológicos correspondentes estavam relacionados principalmente ao metabolismo e proliferação celular (Figura 5).

352



362

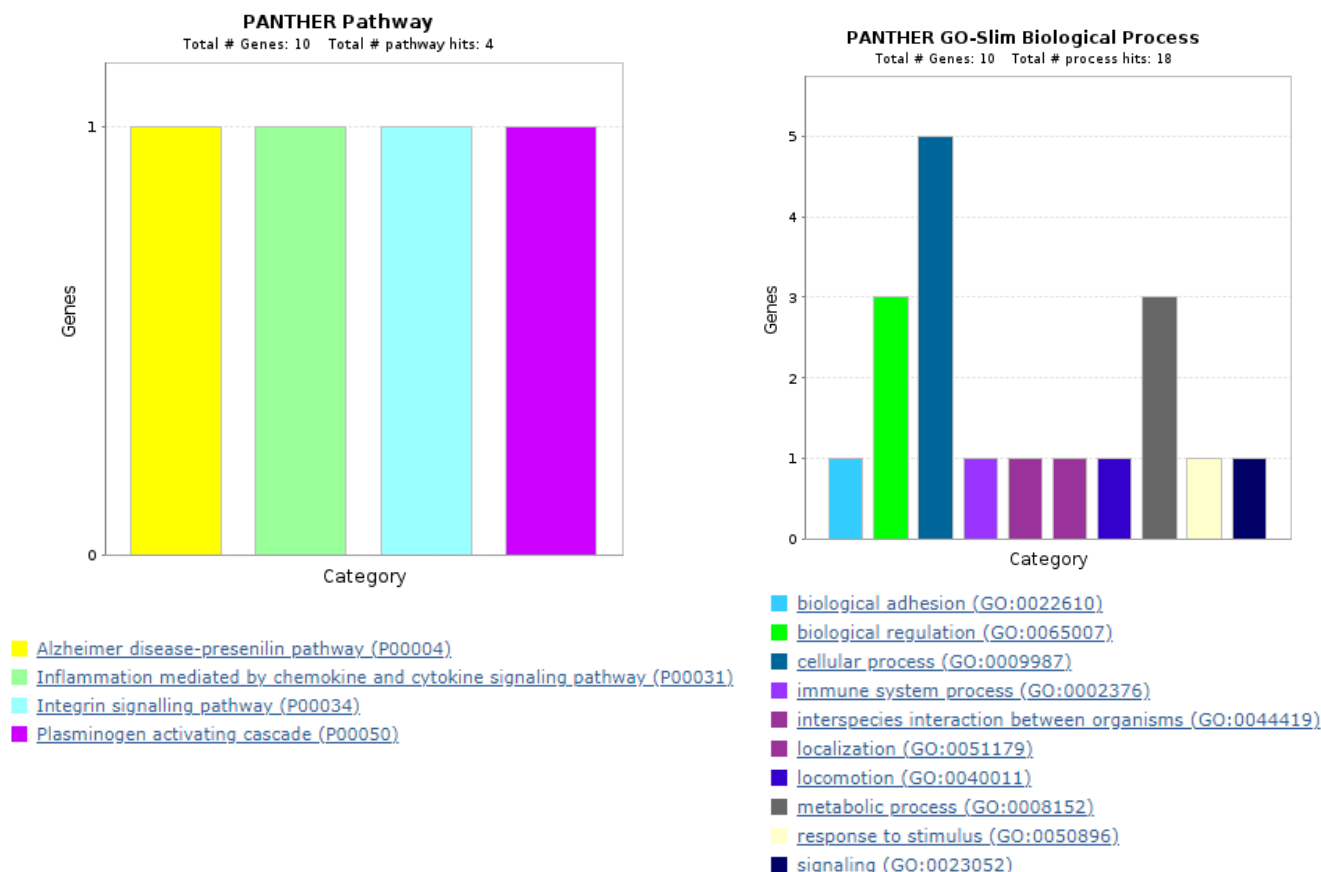
Figura 5 – Gráfico em barras indicando as vias metabólicas e os processos biológicos relacionados aos 10 genes mais regulados positivamente nas MSC-TE.

365

Os genes significativamente menos expressos em comparação às MSC-TA foram relacionados às vias de sinalização da preselina, imunomodulação, sinalização das integrinas e ativação da cascata do plasminogênio (Figura 6).

369

370



379

380

381 **Figura 6** – Gráfico em barras indicando as vias metabólicas e processos biológicos relacionados
 382 aos 10 genes mais significativamente expressos nas MSC-TA.

383

384 A ontologia gênica dos genes expressos diferencialmente nas MSC-TE
 385 indicaram os processos celulares mais importantes. Os genes envolvidos nesses
 386 processos foram CXCL8 (IL-8), RBPMS, E2F5, PFDN2, PLK3, TGM2,
 387 TP53INP2, SLC25A33, HAND1, NAA11, FGF9, RPS6KA2, SOX4, RCAN2,
 388 SLC6A17, STMN4, TBC1D1, HOXD10, SESN3, BMF, GRP, FGF12, LBH,
 389 NGR1, ARHGEF3, KLF12, TMOD1, RNF10, SLITRK2 e FGFR4.

390 Decidiu-se analisar ainda, entre os genes significativamente expressos
 391 positivamente nas MSC-TE, aqueles que se referem às propriedades
 392 terapêuticas das células estromais, entre elas, imunomodulação, migração e
 393 angiogênese. Analisando os genes mais expressos nas MSC-TE, observou-se

394 que os transcritos que apareceram em maior frequência foram os CXCL8 (IL-8),
395 TOX, PLA2G5, TIMD4, ISG20 e VEGFC.

396

397 **3. DISCUSSÃO**

398 O objetivo deste estudo foi avaliar as características imunofenotípicas,
399 capacidade de diferenciação e perfil transcriptômico de células estromais
400 mesenquimais obtidas do endométrio equino em comparação com as MSC's de
401 origem adiposa. Trabalhos anteriores demonstraram que o nicho do qual as
402 MSC's se originam definem sua assinatura transcriptômica, bem como seus
403 atributos biológicos [29]. Entretanto, nas condições do presente experimento,
404 embora algumas vias metabólicas e processos biológicos envolvidas na função
405 fim do tecido endometrial estivessem positivamente reguladas, somente 3,3%
406 dos transcritos foram expressos diferencialmente, demonstrando a similaridade
407 entre os dois tipos celulares estudados.

408 Em ambos os tecidos, células mesenquimais obtidas apresentaram
409 morfologia clássica fibroblastóide, com formação de colônias bem definidas,
410 indistinguíveis de células de outras fontes descritas na literatura, e similar a
411 outros achados no isolamento com tecido endometrial humano e equino [7,30].

412 A principal vantagem da colheita a partir de células endometriais, em
413 detrimento a gordura ou medula óssea, é que pode ser feita pela biópsia [14,31],
414 um procedimento pouco invasivo, feito rotineiramente para o diagnóstico de
415 alterações uterinas na clínica equina, não necessitando sedação ou anestesia
416 local [32]. No presente experimento, as células mesenquimais endometriais
417 foram isoladas a partir de fragmentos de biópsia, tendo o tecido
418 aproximadamente 1,0 x 0,5 cm e pesando 1 g. Os autores Rink et al. [33] e

419 Cabezas et al [15]. também utilizaram o procedimento com sucesso, em
420 diferentes fases do ciclo estral, obtendo quantidade suficiente de células,
421 corroborando com nossa hipótese de que pode ser feita rotineiramente para
422 formação de banco de células.

423 As éguas utilizadas estavam em estação de monta, fase final de diestro,
424 portanto, sob efeito de progesterona, quando existe alta proliferação do tecido
425 estromal [34]. Outros autores isolaram MSC's endometriais em éguas tanto em
426 diestro [7], quanto em anestro [15]. Em humanos, também já foram obtidas
427 amostras de mulheres em fase estrogênica [30]. Sendo assim, as diversas fases
428 do ciclo estral demonstram ter atividade de células mesenquimais, sendo
429 possível a coleta durante todo o ano.

430 Rink et al. [35] pesquisaram marcadores de superfície de células
431 estromais mesenquimais no tecido endometrial em diferentes fases do ciclo
432 estral equino. Foram identificados altos níveis destes marcadores durante o estro
433 e o final do diestro (d13), comparado ao começo do diestro (d5). Este achado
434 parece ser consistente com o possível recrutamento de MSC's para o endométrio
435 antes e durante a fase proliferativa do ciclo.

436 A maioria dos autores que isolaram MSC's de origem endometrial
437 utilizaram a collagenase na dissociação enzimática do tecido [7,14,30,33].
438 Moraes et al. [25], trabalhando com endométrio bovino, utilizou protocolo
439 associando collagenase e tripsina. No presente estudo, foi utilizada apenas a
440 tripsina, proporcionando um protocolo mais eficiente e rápido para o isolamento
441 das células.

442 As células estromais mesenquimais são definidas pela aderência ao
443 plástico, expressão de marcadores celulares específicos e potencial de

444 diferenciação em linhagens adipogênica, osteogênica e condrogênica [36]. No
445 nosso estudo, as células, tanto de origem adiposa quanto endometrial,
446 diferenciaram-se nas duas linhagens testadas, adipogênica e osteogênica.

447 Cabezas et al. [15] fizeram uma análise semi-quantitativa e concluíram um
448 maior potencial osteogênico na amostra endometrial, comparado à adipogênica.
449 Afecções com metaplasia e mineralização do endométrio são comuns em
450 humanos [8], podendo ser causadas por este maior potencial de diferenciação
451 em tecido ósseo.

452 Rink et al. [7] também compararam a diferenciação das MSC's equinas
453 endometriais e de medula óssea e observaram padrões diferentes entre as
454 linhagens observadas. MSC's de origem endometrial tiveram menor habilidade
455 em gerar cartilagem do que as de origem medular. Apesar disso, foi observado
456 que a amostra endometrial teve uma maior habilidade em adotar o fenótipo de
457 músculo liso quando tratada com TGF- β 1. Isso pode ter ocorrido até por
458 contaminação de células do miométrio no momento da coleta, necessitando mais
459 investigações. Por outro lado, Navarrete et al. [28] demonstraram que MSC's de
460 TE e TA apresentam capacidade semelhante de se diferenciar em cardiomiócitos
461 após diferenciação induzida *in vitro*.

462 Em nosso estudo, embora a diferenciação para precursores adipogênicos
463 e osteogênicos tenha sido observada tanto nas MSC's de tecido endometrial
464 como adiposo, não foi realizada uma comparação quantitativa. Mas pelas
465 imagens obtidas, não parecem existir diferenças morfológicas entre os grupos
466 estudados. Apesar disso, pelo descrito anteriormente, fica claro que há um viés
467 significativo entre os tecidos de origem das células estromais mesenquimais [37].

468 Com relação à expressão dos marcadores de superfície das células, este
469 estudo obteve resultados semelhantes a outros autores. Para caracterização
470 positiva, o CD90 e o CD105 resultaram em médias percentuais de $84,4 \pm 8,0\%$ e
471 $33,7 \pm 5,2\%$, respectivamente. Estes resultados corroboram outros autores que
472 estudaram MSC's endometriais equinas. Cabezas et al. [15] obtiveram as
473 médias de 75% e 24%, respectivamente. Já Rink et al. [7] obtiveram 98% e 97%,
474 respectivamente. A expressão intermediária do anticorpo para CD105 pode ser
475 explicada pela falta de anticorpo específico para os equinos. De Schauwer et al.
476 [38] já demonstraram variação na marcação do CD105 em equinos, o que
477 justifica nossos resultados.

478 Para caracterização negativa, foram estudadas as expressões do
479 marcador para célula hematopoiética CD34 e para apresentador de antígenos
480 MCH classe II, com resultados de $2,9 \pm 0,4\%$ e $12,9 \pm 9,0\%$, respectivamente.
481 Outros estudos encontraram o valor de 1,8% de expressão de CD34, e entre
482 0,8% e 2,1% para MHC II [7,15]. A maior expressão de MHC II do presente
483 experimento (12,9%) pode ser explicada pelas diferenças entre as
484 partidas/marcas de anticorpos utilizados, porém ainda assim pode ser
485 considerada baixa.

486 Vários artigos já demonstraram que MSC's de origens diferentes possuem
487 diversas propriedades biológicas semelhantes, apresentando inclusive
488 potenciais terapêuticos similares [38,39]. No entanto, já foi demonstrado que
489 MSC TE e MSC TA de equinos diferem com relação a marcadores de superfície
490 e padrões de migração [15]. Sendo assim, no presente estudo, objetivamos
491 aprofundar o estudo das características das MSC de origem endometrial,

492 avaliando o perfil gênico na tentativa de identificar a presença de transcritos com
493 potencial terapêutico.

494 A análise do componente principal demonstrou uma separação clara dos
495 grupos de MSC's de acordo com os genes encontrados evidenciando que
496 existem particularidades entre as células oriundas do tecido adiposo e do tecido
497 endometrial. Nas amostras do tecido endometrial, foram encontrados 427 (2,0%)
498 e 587 (2,8%) genes positiva e negativamente regulados, respectivamente. De
499 fato, quando foi conduzida uma análise mais profunda em relação a esses genes
500 diferencialmente expressos, foram encontradas diferenças entre os processos
501 biológicos e vias metabólicas apresentadas em cada tipo celular.

502 A ontologia dos genes expressos diferencialmente nas células estromais
503 de tecido endometrial indicou relação com a proliferação celular (RBPMS, E2F5,
504 PLK3, família FGF, RPS6KA2 e TBC1D1), regulação neural (SLC6A17, STMN4,
505 GRP e SLITRK2), apoptose (TGM2, TP53INP2 e BMF), metabolismo celular
506 (PFDN2, SLC25A33, NAA11, SESN3, KLF12 e RNF10) e desenvolvimento
507 embrionário (HAND1, SOX4, HOXD10, LBH, NGR1 e TMOD1). Dentre estes,
508 também se observou genes relacionados à angiogênese (RCAN2, ETS1, DLK1
509 e PRKD2) e a interleucina 8, que atua na imunomodulação.

510 O endométrio é um tecido com renovação intensa, que passa por mais de
511 400 ciclos reprodutivos na vida da mulher [39], então é justificável que os genes
512 relacionados à proliferação celular, metabolismo celular e angiogênese estejam
513 altamente expressos neste nicho. O FGF9 atua como mediador autócrino e
514 parácrino para proliferação epitelial, sendo considerado elemento fundamental
515 na implantação embrionária em mulheres, éguas, ratas e porcas [41,42,43,44].
516 O tecido estromal desempenha um papel importante na renovação tecidual do

517 endométrio e é natural que as vias de proliferação celular sejam, portanto, as
518 mais up reguladas nesse tecido.

519 Talbi e colaboradores [45], analisando a expressão gênica do endométrio
520 humano, relataram a importância dos genes relacionados à apoptose celular
521 como parte fundamental na renovação cíclica deste tecido. A ontologia gênica
522 deste estudo demonstrou aumentada atividade deste processo biológico, o que
523 também corrobora a assinatura das MSC-TE.

524 Outras características das MSC's, que também estão presentes nas
525 células do TE são a migração celular, remodelação tecidual e angiogênese. Os
526 quais são processos biológicos e eventos moleculares que participam
527 ativamente na regeneração do organismo, sendo cruciais na atividade
528 terapêutica das MSC's. Genes da família FGF (FGF1, FGFR1, FGF5, FGF9,
529 FGFR4 e FGF12), associados com angiogênese e remodelação tecidual, foram
530 encontrados diferencialmente expressos nas MSC's endometriais.

531 Os resultados do transcriptoma demonstraram também um aumento de
532 expressão das vias de sinalização da proteína G nas células obtidas do tecido
533 endometrial, corroborando os estudos de Spitzer e colaboradores [46], quando
534 analisaram o perfil gênico de MSC's endometriais de humanos, encontrando o
535 RGS5 como um dos genes mais diferencialmente expressos. Estes mesmos
536 autores encontraram genes expressos positivamente que pertencem à via WNT,
537 que controlam auto-renovação e multipotencialidade, e também relacionados à
538 angiogênese, similarmente aos nossos achados nas MSC-TE.

539 Células estromais mesenquimais nos tecidos adultos permanecem
540 quiescentes, em estado não-proliferativo, até que sejam estimuladas por sinais
541 como injúria ou remodelação, resultando em proliferação e manutenção do

estágio indiferenciado, e também em diferenciação nas linhagens celulares adultas [47]. Entretanto, no presente experimento as células estudadas foram removidas de seu nicho natural e submetidas a condições de cultivo *in vitro* semelhantes. Esse ambiente de cultivo também pode ter influenciado no perfil de transcritos produzidos pelas células estudadas e contribuído para a baixa porcentagem de genes diferencialmente expressos.

No presente estudo, em ambos os tecidos, poucos genes de imunomodulação foram encontrados altamente expressos, talvez porque as MSC's não tenham sido desafiadas. As MSC-TE demonstraram expressão aumentada de IL-8 em relação às de tecido adiposo, corroborando os achados de Cortez-Araya e colaboradores [48], que identificaram um perfil imunomodulatório melhor do que MSC's de origem adiposa nos genes específicos que analisaram.

O tecido uterino também pode se tornar uma fonte para banco de MSC's de outras espécies animais como, por exemplo, caninos e felinos, que atualmente utilizam o tecido adiposo. Já foram isoladas e caracterizadas MSC's endometriais de cadelas, utilizando a castração eletiva para esta coleta, processo cirúrgico rotineiro em que o útero é normalmente descartado. [49]

O estudo das MSC's endometriais em cadelas tem sido respaldado também pelo interesse em desvendar mecanismo de afecções reprodutivas nesta espécie. Doenças degenerativas do útero, como o complexo de hiperplasia cística/piometra e as alterações metabólicas resultantes, são frequentes e não responsivas à farmacologia convencional. Ainda precisa ser analisado o papel das MSC's nestas afecções, se estas têm função na prevenção ou contribuem para o início destas doenças. [50].

567 As éguas, assim como as cadelas, apresentam doenças reprodutivas
568 inflamatórias e degenerativa. O que justificam a utilização da espécie equina
569 para este estudo, pois a subfertilidade das éguas afeta o mercado de criação e
570 reprodução equina. [50,51,52].

571 Desvendar o funcionamento das MSC's do tecido endometrial é crucial
572 para entender as principais afecções desta ordem, como endometrite
573 (inflamação aguda do endométrio) e inflamação crônica e persistente, ou
574 endometrose. Assim como evoluir no tratamento destas enfermidades que
575 muitas vezes não respondem à terapêutica convencional. [53].

576 As MSC-TE já foram utilizadas no tratamento de endometrite induzida em
577 éguas, sendo comparadas com MSC's de origem adiposa. Foram identificadas
578 células-tronco, no estroma periglandular uterino após 30 dias da infusão, tanto
579 do grupo tratado com células de origem adiposa, quanto endometrial. Porém
580 ainda não existem resultados consistentes com relação ao enxerto de MSC's no
581 útero. [53].

582 Quando comparados os tecidos (adiposo e endometrial) de origem das
583 MSC's no tratamento da endometrite, ambos obtiveram respostas anti-
584 inflamatórias e imunomodulatórias [53]. O que corrobora com os resultados do
585 nosso experimento, em que ambas as amostras expressaram genes com função
586 imunomodulatória, sem diferença significativa.

587

588 **CONCLUSÃO**

589 Conclui-se que as células estromais mesenquimais advindas do
590 endométrio equino são capazes de ser isoladas pela biópsia uterina, podendo
591 se tornar uma fonte usual de colheita de MSC's, já que foram confirmadas suas

592 características imunofenotípicas e de multipotencialidades. A semelhança no
 593 perfil de transcritos dentre as MSC-TE e -TA indica que estas células apresentam
 594 potencial terapêutico semelhante por produzirem fatores bioativos semelhantes,
 595 no entanto, testes clínicos ainda precisam ser realizados.

596

597 **AGRADECIMENTOS**

598 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
 599 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de
 600 Financiamento 001.

601

602 **REFERÊNCIAS**

- 603 [1] De Schauwer C, Gossens K, Piepers S, Hoogewijs MK, Govaere JLJ,
 604 Smits K, Meyer E, Van Soom A, Van de Walle GR. Characterization and
 605 profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells
 606 from non-invasive sources. Stem Cell Research and Therapy
 607 <http://stemcellres.com/content/5/1/6> 2014.
- 608 [2] Angelone M, Conti V, Biacca C, Battaglia B, Pecorari L, Piana F, Gnudi G,
 609 Leonardi F, Ramoni R, Basini G, Dotti S, Renzi, S, Ferrari M, Grolli S. The
 610 contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and
 611 platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: a proof of
 612 concept. Int J Mol Sci 2017; 18:2122.
 613 <https://doi.org/10.3390/ijms18102122>.
- 614 [3] Carrade DD, Lane MW, Kent MS, Clark KC, Walker NJ, Borjesson DL.
 615 Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine
 616 Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells 1. Cell Med 2012; 4:1–11.

- 617 <https://doi.org/10.3727/215517912X647217>.
- 618 [4] Le Blanc K, Davies LC. Mesenchymal stromal cells and the innate immune
 619 response. *Immunol Lett* 2015; 168:140–6.
 620 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.004>.
- 621 [5] Gugjoo MB, Amarpal Makhdoomi DM, Sharma GT. Equine mesenchymal
 622 stem cells: properties, sources, characterization and potential therapeutic
 623 applications. *Journal of Equine Veterinary Science* 2018; 27:16-27.
 624 <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.007>.
- 625 [6] Herzog, EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells.
 626 *Blood* 2003; 102:3483-93. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1664>.
- 627 [7] Rink BE, Amilon KR, Esteves CL, French HM, Watson E, Aurich C,
 628 Donadeu X. Isolation and characterization of equine endometrial
 629 mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Research and Therapy* 2017; 8:166.
 630 <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0616-0>.
- 631 [8] Donofrio G, Franchesci V, Capocefalo A, Cavirani S, Sheldon IM. Bovine
 632 endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reproductive*
 633 *Biology and Endocrinology* 2008; 6(65):1-9. [https://doi.org/10.1186/1477-](https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-65)
 634 [7827-6-65](https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-65).
- 635 [9] Gargett CE, Chan RW, Schawab KE. Hormone and growth factor signaling
 636 in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Molecular and*
 637 *Cellular Endocrinology* 2008; 288(1-2):22-9.
 638 <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.02.026>.
- 639 [10] Gargett CE. Identification and characterization of human endometrial
 640 stem/progenitor cells. *Australian and New Zealand J of Obstet and*
 641 *Gynaecology* 2006; 46:250-3. <https://doi.org/10.1111/j.1479->

642 828X.2006.00582.x.

643 [11] Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial
644 mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the
645 renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian
646 failure. *J Transl Med* 2015; 13:155. [https://doi.org/10.1186/s12967-015-](https://doi.org/10.1186/s12967-015-0516-y)
647 0516-y.

648 [12] Wolff EF, Gao XB, Yao KV, Andrews ZB, Du H, Elsworth JD, Taylor HS.
649 Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a
650 Parkinson's disease model. *J Cell Mol Med* 2011; 15:747-55.
651 <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01068.x>.

652 [13] Emmerson SJ, Gargett CE. Endometrial mesenchymal stem cells as a cell
653 based therapy for pelvic organ prolapse. *World J Stem Cells* 2016; 8:202-
654 15. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i5.202>.

655 [14] Schüring AN, Schulte N, Kelsch R, Ropke A, Kiesel L, Gotte M.
656 Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by
657 endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and Sterility* 2010;
658 95(1):423-6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.035>.

659 [15] Cabezas J, Rojas D, Navarrete F, Ortiz R, Rivera G, Rodriguez-Alvarez L,
660 Castro FO. Equine mesenchymal stem cells derived from endometrial or
661 adipose tissue share significant biological properties, but have distinctive
662 pattern of surface markers and migration. *Theriogenology* 2017; 106:93-
663 102. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.09.035>.

664 [16] Ferris RA, Frisbie DD, McCue PM. Use of mesenchymal stem cells or
665 autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to
666 spermatozoa in mares. *Theriogenology* 2014; 82:36–42.

- 667 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>.
- 668 [17] Alvarenga MA, do Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L,
 669 Landim-Alvarenga FC. Feasibility and safety of endometrial injection of
 670 autologous bone marrow mesenchymal stem cells in mares. *J Equine Vet*
 671 *Sci* 2016; 42:12-18.
- 672 [18] Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B,
 673 Schoon H. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis.
 674 *Anim Reprod Sci* 2009; 111:261-78.
 675 <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.019>.
- 676 [19] Mambelli LI, Mattos RC, Winter GHZ, Madeiro DS, Morais BP, Malschitzky
 677 E, Miglino MA, Kerkis A, Kerkis I. Changes in expression pattern of selected
 678 endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares
 679 with endometrosis. *PLoS ONE*. 2014; 9:e97889.
 680 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097889>.
- 681 [20] Ferris RA, Frisbie DD, McCue PM. Use of mesenchymal stem cells or
 682 autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to
 683 spermatozoa in mares. *Theriogenology* 2014; 82(1):36-42.
 684 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.015>.
- 685 [21] López AGS, Montesinos JJM, Arce SRA. The endometrium as a source of
 686 mesenchymal stem cells in domestic animals and possible applications in
 687 veterinary medicine. *Veterinaria Mexico OA*. 2017; 4(3):1-18.
 688 <https://doi.org/10.21753/vmoa.4.3.441>.
- 689 [22] Henneke DR, Potter GD, Kreider JL, Yeates BF. Relationship between
 690 condition score, physical measurements and body fat percentage in mares.
 691 *Equine Veterinary Journal* 1983; 15(4):371-2.

- 692 <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1983.tb01826.x>
- 693 [23] Pierson RA & Ginther OJ. Ultrasonic evaluation of the corpus luteum of the
694 mare. *Theriogenology* 1985; 23(5):795-806.
- 695 [24] Ricketts SW. Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial
696 pathology in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1975; 23:341-5.
- 697 [25] Moraes CN, Maia L, Dias MC, Dell'Aqua CPF, Mota LSLS, Chapwanya A,
698 Landim-Alvarenga FC, Oba E. Bovine endometrial cells: a source of
699 mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biol Int* 2016; 40(12):1332-9.
700 <https://doi.org/10.1002/cbin.10688>.
- 701 [26] Mitchell A, Rivas KA, Smith III R, Watts AE. Cryopreservation of equine
702 mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does
703 not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine
704 serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5%. *Stem Cell*
705 *Res Ther* 2015; 6:230-42. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0230-y>.
- 706 [27] Chaytor JL, Tokarew JM, Leclere M, Tam RY, Capicciotti CJ, Guolla L, von
707 Moss E, Findlay S, Allan DS, Ben RN. Inhibiting ice recrystallization and
708 optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology* 2012;
709 22:123-133. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115>.
- 710 [28] Maia L, Landim-Alvarenga FC, Taffarel MO, de Moraes CN, Machado GF,
711 Melo GD, Amorim RM. Feasibility and safety of intrathecal transplantation
712 of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in horses. *BMC Vet*
713 *Res* 2015; 11:63. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0361-5>
- 714 [29] Navarrete F, Wong YS, Cabezas J, Riadi G, Manrinquez J, Rojas D,
715 Mançanares ACF, Rodriguez-Alvarez L, Saravia F, Castro FO. Distinctive
716 cellular transcriptomic signature and microRNA cargo of extracellular

- 717 vesicles of horse adipose and endometrial mesenchymal stem cells from
 718 the same donors. *Cellular Reprogramming* 2020; 22(6):1-17.
 719 <https://doi.org/10.1089/cell.2020.0026>.
- 720 [30] Gargett CE, Schwab KE, Zilwood RM, Nguyen HPT, Wu D. Isolation and
 721 culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human
 722 endometrium. *Biology of Reproduction* 2009; 80:1136-45.
 723 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075226>.
- 724 [31] Revel A. Multitasking human endometrium: a review of endometrial biopsy
 725 as a diagnostic tool, therapeutic applications, and a source of adult stem
 726 cells. *Obstet Gynecol Surv* 2009; 64:249-57.
 727 <https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e318195136f>.
- 728 [32] Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed:
 729 observation, interpretation, and application of histopathologic data.
 730 *Theriogenology* 2011; 75:1567-81.
 731 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.013>.
- 732 [33] Rink BE, Beyer T, French HM, Watson E, Aurich C, Donadeu FX. The fate
 733 of autologous endometrial mesenchymal stromal cells after application in
 734 the healthy equine uterus. *Stem Cells and Development* 2018;
 735 27(15):1046-53. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0056>.
- 736 [34] Aupperle H, Ozgen SHA, Schoon D, Hoppen HO, Sieme H, Tannapfel A.
 737 Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation
 738 intensity in the mare. *Equine Vet J* 2000; 32:228-32.
 739 <https://doi.org/10.2746/042516400776563554>.
- 740 [35] Rink BE, Kuhl J, Esteves CL, French HM, Watson E, Aurich C, Donadeu
 741 FX. Reproductive stage and sex steroid hormone levels influence the

- 742 expression of mesenchymal stromal cell (MSC) markers in the equine
 743 endometrium. Theriogenology 2018. doi:
 744 10.1016/j.theriogenology.2018.04.034.
- 745 [36] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Martini F, Krause
 746 D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.
 747 The International Society for Cellular Therapy position statement.
 748 Cytotherapy 2006;8;315-7.
- 749 [37] Sacchetti B, Funari A, Remoli C, Giannicola G, Kogler G, Liedtke S, et al.
 750 No identical "mesenchymal stem cells" at different times and sites: human
 751 committed progenitors of distinct origin and differentiation potential are
 752 incorporated as adventitial cells in microvessels. Stem Cell Reports 2016;
 753 6:897-913.
- 754 [38] De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs
 755 MK, Govaere JLJ, Braeckmans K, Soom AV, Meyer E: In Search for Cross-
 756 Reactivity to Immunophenotype Equine Mesenchymal Stromal Cells by
 757 Multicolor Flow Cytometry. Cytometry Part A 2012, 81A:312-323.
 758 doi:10.1002/cyto.22491.
- 759 [39] Cassano JM, Fortier LA, Hicks RB, Harman RM, Van de Walle GR. Equine
 760 mesenchymal stromal cells from different tissue sources display
 761 comparable immune-related gene expression profiles in response to
 762 interferon gamma (IFN)- γ . Veterinary Immunology and Immunopathology
 763 2018 <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.06.008>.
- 764 [40] Gargett C. Uterine stem cells: what is the evidence? Hum. Reprod. Update
 765 2007; 13(1):87–101. <https://doi.org/doi:10.1093/humupd/dml045>.
- 766 [41] Merkl M, Ulbrich SE, Otzdorff C, et al. Microarray analysis of equine

- 767 endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. *Biol Reprod* 2010;83(5):874-
768 886.
- 769 [42] Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, Wing LY. Fibroblast growth factor-
770 9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology* 2002; 143:2715–
771 2721.
- 772 [43] Šućurović S, Nikolić T, Brosens JJ, Mulac-Jericevic B. Spatial and
773 Temporal Analyses of FGF9 Expression During Early Pregnancy. *Cell*
774 *Physiol Biochem.* 2017;42(6):2318- 2329.
- 775 [44] Ostrup E, Bauersachs S, Blum H, Wolf E, Hyttel P. Differential endometrial
776 gene expression in pregnant and nonpregnant sows. *Biol Reprod* 2010;
777 83:277–285.
- 778 [45] S. Talbi, A. E. Hamilton, K. C. Vo, S. Tulac, M. T. Overgaard, C. Dosiou, N.
779 Le Shay, C. N. Nezhat, R. Kempson, B. A. Lessey, N. R. Nayak, L. C.
780 Giudice, Molecular Phenotyping of Human Endometrium Distinguishes
781 Menstrual Cycle Phases and Underlying Biological Processes in Normo-
782 Ovulatory Women, *Endocrinology*, Volume 147, Issue 3, 1 March 2006,
783 Pages 1097–1121, <https://doi.org/10.1210/en.2005-1076>
- 784 [46] Spitzer LB, Rojas A, Zelenko Z, Aghajanova L, Erikson DW, Barragan F,
785 Meyer M, Tamaresis JS, Hamilton AE, Irwin JC, Giudice LC. Perivascular
786 human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to
787 self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. *Biology of*
788 *Reproduction*, v.86, n.2, p.1-16, 2012.
- 789 [47] Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Leminskka
790 IR. A stem cell molecular signature. *Science*, v.298, p.601-604, 2002.
- 791 [48] Cortez-Araya Y, Amilon K, Rink BE, Black G, Lisowski Z, Donadeu FX,

- 792 Esteves C. Comparison of antibacterial and immunological properties of
 793 mesenchymal stem/stromal cells from equine bone marrow, endometrium,
 794 and adipose tissue. *Stem Cells and Development* 2018; 27(21):1518-25.
 795 <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0241>
- 796 [49] De Cesaris V, Grolli S, Bresciani C, Conti V, Basini G, Parmigiani E,
 797 Bigliardi E. Isolation, proliferation and characterization of endometrial
 798 canine stem cells. *Reproduction of Domestic Animals*, p.1-8, 2016.
- 799 [50] Szóstek-Mioduchowska, A., Słowińska, M., Pacewicz, J. et al. Matrix
 800 metalloproteinase expression and modulation by transforming growth
 801 factor- β 1 in equine endometrosis. *Sci Rep* 10, 1119 (2020).
 802 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58109-0>
- 803 [51] Minkwitz C, Schoon H-A, Zhang Q, Schöniger S. Plasticity of endometria
 804 epithelial and stromal cells—A new approach towards the pathogenesis of
 805 equine endometrosis. *Reprod Dom Anim.* 2019; 54:835–845.
 806 <https://doi.org/10.1111/rda.13431>
- 807 [52] Equine endometritis: a review of challenges and new approaches in
 808 *Reproduction* Authors: Lee H A Morris 1 , P M McCue 2 , and Christine
 809 Aurich 3
- 810 [53] Felipe N, Fernando S, Gabriela C, Fernanda R, Pablo SP, Lleretny Rodrí-
 811 Alvarez, Daniela R, Joel C, Carolina MançAna, Ovidio CF, Assessment of
 812 the anti-inflammatory and engraftment potential of horse endometrial and
 813 adipose mesenchymal stem cells in an in vivo model of post breeding
 814 induced endometritis, *Theriogenology*2020, doi:
 815 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.010>.