



Universidad de Concepción.  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Programa de Doctorado Ciencias Veterinarias

Valoración de las propiedades biológicas de las MSCs  
equinas aisladas de diferentes tejidos y su potencial uso  
terapéutico en endometritis en yeguas.

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

FELIPE IGNACIO NAVARRETE AGUIRRE  
CHILLÁN – CHILE  
2020

Profesor Guía: Fidel O. Castro Reboredo  
Dpto. de Ciencia Animal  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Fidel O. Castro Reboredo  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dra. Graça Ferreira-Dias  
Facultad de Medicina Veterinaria  
Universidad de Lisboa

---

Dr. Angel Oñate Contreras  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Fernando Saravia Ramos  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

Directora (s) de Programa

---

Dr: Lleretny Rodríguez Álvarez  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción



## TABLA DE CONTENIDOS

	<b>Página</b>
X. RESUMEN	xi
XI. ABSTRACT	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
1. Patología uterina.	4
2. Endometritis inducida post monta (PMIE).	10
2.1 Respuesta inflamatoria.	13
2.2 Mecanismo de limpieza.	17
2.3 Plasma seminal y su vinculación con la PMIE.	18
2.4 NETs y su relación con la fisiopatología de la PMIE.	20
3. Diagnóstico.	23
3.1 Clasificación histopatológica del endometrio.	27
4. Tratamiento.	31
5. Células madre mesenquimales.	35
5.1 Mecanismo de acción propuesto para las MSCs.	40
III. HIPÓTESIS	54
IV. OBJETIVOS	54
V. MATERIALES Y MÉTODO	56

1. Caracterización fenotípica y funcional <i>in vitro</i> de células madre mesenquimales putativas adiposas (AT-MSCs) y endometriales (ET-MSCs).	56
1.1 Obtención de la muestra.	56
1.2 Aislamiento, expansión y criopreservación celular.	56
1.3 Citometría de flujo.	58
1.4 Evaluación de la tri-potencia: diferenciación celular.	60
1.5 Ensayo de migración <i>in vitro</i> .	62
2. Perfil transcriptómico de MSC equinas y perfil global de la expresión de miARN.	63
2.1 Diseño experimental y códigos de muestra.	63
2.2 Análisis transcriptómico de ARN celulares.	64
2.3 Alineaciones de lecturas y control de calidad.	65
2.4 Análisis de expresión diferencial.	66
2.5 Análisis cuantitativo de RT-qPCR para la validación del ARNsec	67
2.6 Perfil transcriptómico de miARN incluidos en VE.	70
2.7 Inducción neurogénica de MSC.	72
2.8 Inducción cardiomiogénica de MSC.	74
3. Evaluación un modelo <i>in vivo</i> de inflamación endometrial, antes y después de la inoculación intrauterina de AT-MSCs y ET-MSCs marcadas y el potencial anidamiento de estas células.	76
3.1 Marcaje celular fluorescente.	76

3.2	Generación de PMIE.	77
3.3	Infusión intrauterina.	79
3.4	Lavados de bajo volumen (LVL) y biopsias endometriales.	80
3.5	Conteo de PMN e inmunohistoquímica.	82
3.6	Análisis de ELISA.	83
3.7	Análisis de fluorescencia a través de microscopía confocal.	84
3.8	Análisis estadístico.	84
VI.	RESULTADOS	85
VII.	DISCUSIÓN	123
VIII.	CONCLUSIONES	151
IX.	REFERENCIAS	153



## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Sección transversal del cuerno uterino equino. Fuente: Doig y Waelchli 1993.	23
<b>Figura 2</b>	Representación esquemática del protocolo utilizado para la inducción de PMIE e infusión intrauterina de MSC. Fuente: Elaboración propia	96
<b>Figura 3</b>	Procedimiento de biopsia endometrial. Fuente: Elaboración propia.	102
<b>Figura 4</b>	Procedimiento de obtención de grasa subcutánea.	103
<b>Figura 5</b>	Cultivos primarios 48 h después de la siembra. a: AT-MSC; b: ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.	104
<b>Figura 6</b>	Ensayo de diferenciación en células de origen endometrial y adiposo. a: linajes condrogénico; b: adipogénico; c: osteogénico. d: control. Fuente: Elaboración propia.	106
<b>Figura 7</b>	Ensayo de migración in vitro de ET-MSC y AT-MSC. Fuente: Elaboración propia.	107
<b>Figura 8</b>	Análisis transcriptómico de AT-MSC y ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.	115
<b>Figura 9</b>	Validación de ARN-seq mediante comparación de los niveles de expresión por qPCR de cuatro genes sobre expresados (izquierda en el panel A), y cuatro genes sub expresados (derecha en el panel B). Fuente: Elaboración propia.	117
<b>Figura 10</b>	Concentración y tamaño de las VE aisladas desde medios de cultivo de AT-MSC y ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.	119
<b>Figura 11</b>	Volcano plot de de miARN expresados diferencialmente en ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.	122
<b>Figura 12</b>	Inmunohistoquímica para marcadores de linaje neural beta-III tubulina (neuronas inmaduras) y CD68 (microglia) de AT-MSC y ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.	127
<b>Figura 13</b>	Comparación de los niveles de expresión por qRT-PCR de tres genes en ET-MSC y AT-MSC antes y después de la inducción cardiomiogénica. Fuente: Elaboración propia.	128
<b>Figura 14</b>	Comparación de los niveles de expresión por qRT-PCR de tres genes entre ET-MSC y AT-MSC tras inducción cardiomiogénica. Fuente: Elaboración propia.	129
<b>Figura 15</b>	Cantidad de PMNs endometriales durante las diferentes fases experimentales (I, II, y III). Barras indicadas con un	

	asterisco son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.	131
<b>Figura 16</b>	Patrón de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$ en fluido uterino durante las diferentes fases experimentales (I, II, y III). Barras indicadas con un asterisco son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.	132
<b>Figura 17</b>	Inmunohistoquímica de biopsias de endometrio. Patrón de expresión de PMN, IL-6 y TNF- $\alpha$ en tejido endometrial durante las diferentes Fases del estudio (I, II y III). HE= hematoxilina eosina. Fuente: Elaboración propia.	133
<b>Figura 18</b>	Expresión de ARNm de citoquinas pro y antiinflamatorias en fluidos uterinos de yeguas control y de yeguas tratadas con MSCs, durante las fases II y III del estudio.	134
<b>Figura 19</b>	MSCs marcadas utilizando diferentes concentraciones de CFDA tras ser sometidas a la segunda expansión (P2). Fuente: Elaboración propia.	136
<b>Figura 20</b>	Fotografías representativas del ensayo confocal para CDFA-SE en biopsias de yeguas a las 48h (a), 10 días (b) o 30 días (c), después del tratamiento con MSCs. Fuente: Elaboración propia.	138

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b> Sistema de puntuación subjetiva para edema endometrial en la yegua. Fuente: Samper y Pycock, 2007.	41
<b>Tabla 2</b> Escala de graduación endometrial propuesta por Kenney en el año 1978 y su posterior modificación. Fuente: Kenney y Doig, 1986.	46
<b>Tabla 3</b> Lista de anticuerpos que serán utilizados para la inmunotinción en la citometría de flujo. Fuente: Elaboración propia.	76
<b>Tabla 4</b> Nomenclatura resumida de muestras analizadas. Fuente: Elaboración propia.	81
<b>Tabla 5</b> Lista de cebadores utilizados para validación de ARN-seq mediante qRT-PCR. Fuente: Elaboración propia.	86
<b>Tabla 6</b> Lista de cebadores utilizados para validación de inducción neurogénica. Fuente: Elaboración propia.	91
<b>Tabla 7</b> Lista de cebadores utilizados para validación de inducción cardiomiogénica. Fuente: Elaboración propia.	92
<b>Tabla 8</b> Lista de cebadores utilizados para qRT-PCR tras inducción de PMIE. Fuente: Elaboración propia.	98
<b>Tabla 9</b> Expresión de marcadores de superficie para ET-MSc y AT-MSc equinas. Fuente: Elaboración propia.	105
<b>Tabla 10</b> Estadística descriptiva de alineamiento de librerías. Fuente: Elaboración propia.	108
<b>Tabla 11</b> Cantidad total de genes, transcritos y exones encontrados en la secuenciación de ARNm y el número de genes regulados positiva y negativamente. Fuente: Elaboración propia.	110
<b>Tabla 12</b> Lista de los 50 genes más variables, sus respectivos valor q y Fold Change (logfc). Fuente: Elaboración propia.	112
<b>Tabla 13</b> miARN expresados diferencialmente en ET-MSc. Fuente: Elaboración propia.	121
<b>Tabla 14</b> Lista de las rutas KEGG involucradas en AT-MSc o ET-MSc, en base a la secuenciación de miARN en vesículas extracelulares. Fuente: Elaboración propia.	124
<b>Tabla 15</b> Resumen de parámetros medidos y comparados entre células equinas obtenidas desde diferente origen (endometriales y adiposas). Fuente: Elaboración propia.	165

## RESUMEN

El uso de terapias en base a células madre mesenquiales (MSC), está ampliamente descrito en equino, sin embargo, la mayoría de estas terapias se basan en el tratamiento de lesiones musculo esqueléticas, y en menor medida como uso potencial en afecciones reproductivas. En este estudio se evaluó el efecto de dos fuentes diferentes MSC obtenidas a partir del mismo donante sobre sus principales características biológicas *in vitro* y sus propiedades anti inflamatorias y anidamiento *in vivo* en yeguas con endometritis inducida post monta (PMIE).

Se aislaron MSC equinas desde endometrio y tejido adiposo (ET-MSC y AT-MSC respectivamente) a partir de los mismos donantes. Las células mostraron rasgos característicos de MSC incluyendo la adherencia al plástico, marcadores de superficie, potencial de migración, así como la diferenciación mesodérmica clásica, además de lograr diferenciaciones neurogénica y cardiomiogénica. Se evaluó la influencia del origen celular en su perfil trascríptómico. Para esto se aisló y secuenció el ARN celular y se obtuvieron vesículas extracelulares (VE) a partir de un medio de cultivo celular libre de VE, y se analizó su carga de microARN (miARN) mediante secuenciación. Se analizó y comparó la expresión diferencial de ARNm y miARN-EV, así como las vías y procesos más representados en cada origen celular. Se identificaron un total de 125 genes regulados positivamente, 51 regulados negativamente y 31 miARN expresados

diferencialmente entre células de ambas fuentes. Sobre la base de la secuenciación del ARNm, las ET-MSc mostraron una mayor expresión de genes involucrados en las vías de señalización Hippo, TGF- $\beta$  y pluripotencia. Junto con esto, las vías involucradas en la reorganización de la matriz extracelular fueron las más representadas en la carga de miARN de las VE secretadas por ET-MSc. El nicho desde el que se originó la MSc definió el perfil transcriptómico de las células, incluida la secreción de VE específica de linaje para garantizar una comunicación y homeostasis adecuada.

Posteriormente se evaluó y comparó el potencial uso de MSc de ambas fuentes como herramientas antiinflamatorias para PMIE, para esto se infundieron intrauterinamente (IU) MSc marcadas en yeguas con PMIE para evaluar su acción antiinflamatoria y anidamiento. Se indujo PMIE en nueve yeguas ginecológicamente sanas mediante la infusión IU de 500 millones de espermatozoides muertos en solución salina. Se analizaron marcadores de inflamación en lavados uterinos y biopsias antes (fase I) y 3 h después de la infusión de espermatozoides (fase II). Las mediciones llevadas a cabo fueron: conteo de células polimorfonucleares (PMN), proteínas IL-6 y TNF- $\alpha$  (ELISA en los lavados) e inmunotinción en biopsias, transcritos de IL-1 $\alpha$ , 6, 8, 10, TNF- $\alpha$  y COX-2 (RT-qPCR de lavados). A las 24 h después de la deposición de espermatozoides (fase III), se infundió a las yeguas 20 ml IU de solución salina que contenía  $2 \times 10^7$  AT-MSc (n = 3, grupo 1) o ET-MSc (n = 3, grupo 2). Las células se marcaron previamente con el éster succinimidil diacetato de

carboxifluoresceína (CFDA SE). Un tercer grupo (n = 3) recibió solo 20 ml de solución salina estéril. Después de 48 h se realizó otra biopsia / lavado y se analizaron los mismos parámetros descritos anteriormente. Para evaluar el anidamiento, se tomaron biopsias adicionales en los días 10 y 30 post inoculación de MSC y se analizaron mediante microscopía confocal. Los espermatozoides muertos en solución salina aumentaron notablemente los recuentos de PMN, la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el ELISA (p <0,05) y la inmunotinción. En la fase III se encontró una reducción significativa (p <0,0001) de PMN en todas las muestras, incluidas las yeguas control. Mediante ELISA se detectó una disminución (p <0,05) de IL-6 y TNF- $\alpha$ , en los grupos que recibieron MSC, pero no en el grupo control. En el grupo tratado con AT-MSC, se encontró una disminución significativa en la expresión de (IL-1 $\alpha$ , p = 0,0003; IL-6 p 0.04; IL-8, p = 0.006, TNF- $\alpha$  p = 0.004). La expresión de IL-10 y COX-2 se mantuvo sin cambios (p = 0,08). En las yeguas que recibieron ET-MSC, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  disminuyeron significativamente (p = 0.01), IL-10 aumentó (p = 0.009), mientras que COX-2 e IL-1 $\alpha$  no cambiaron significativamente su expresión. Mientras que el análisis de anidamiento, el marcaje con CFDA se encontró con moderación en todas las muestras analizadas hasta el día 30, principalmente en el compartimento estromal del endometrio. No se encontraron diferencias en el patrón de anidamiento entre los orígenes celulares. La inoculación de MSC redujo significativamente la inflamación independientemente del origen de las células y que las células realizan un recorrido limitado detectable después de un

mes de infusión. Estos hallazgos pueden ser de ayuda para el diseño de nuevas terapias antiinflamatorias de enfermedades uterinas en yeguas.



## ABSTRACT

The use of therapies based on mesenchymal stem cells (MSC) is widely described in horses, however, most of these therapies are based on the treatment of musculoskeletal injuries, and to a lesser extent as potential use in reproductive conditions. In this study, the effect of two different MSC sources obtained from the same donor on their main biological characteristics *in vitro* and their anti-inflammatory properties and *in vivo* homing was evaluated in mares with post-breeding induced endometritis (PBIE).

Equine MSC were isolated from endometrium and adipose tissue (ET-MSC and AT-MSC respectively) from the same donors. The cells displayed characteristic features of MSC including adherence to plastic, surface markers, migration potential, as well as classical mesodermal differentiation, in addition to achieving neurogenic and cardiomyogenic differentiation. The influence of the cellular origin on its transcriptomic profile was evaluated. For this, the cellular RNA was isolated and sequenced and extracellular vesicles (EV) were obtained from a cell culture medium free of VE, and their microRNA cargo (miRNA) was analyzed by sequencing. The differential expression of mRNA and miRNA-EV was analyzed and compared, as well as the pathways and processes most represented in each cell origin. A total of 125 up and 51 downregulated genes were identified and 31 differentially expressed miRNAs between cells from both sources. Based on mRNA sequencing, endometrial MSC strongly upregulated genes involved in the

Hippo, TGF- $\beta$ , and pluripotency signaling pathways. Alongside with this, pathways involved in extracellular matrix reorganization were the most represented in the miRNA cargo of EVs secreted by ET-MSC. The niche from which MSC originated defined the transcriptomic signature of the cells including the secretion of lineage-specific loaded EV to ensure proper communication and homeostasis.

Subsequently, the potential use of MSC from both sources as anti-inflammatory tools for PBIE was evaluated and compared, for this, labeled MSCs were infused intrauterinely (IU) into mares with PBIE to evaluate their anti-inflammatory action and homing. PBIE was induced in nine gynecologically healthy mares by iu infusion of 500 million dead sperm in saline. Inflammatory markers were analyzed in uterine lavages and biopsies immediately before (phase I) and 3h after infusion of sperm (phase II). Measurements: polymorph nuclear cells count (PMN), proteins IL-6 and TNF- $\alpha$  (ELISA in the lavages) and immunostaining in biopsies, transcripts of IL-1 $\alpha$ , 6, 8, 10, TNF- $\alpha$  and COX-2 (qPCR of pelleted lavages). At 24h after sperm deposition (phase III), mares were instilled IU with 20 ml of saline containing  $2 \times 10^7$  AT-MSCs (n=3, group 1) or ET-MSCs (n=3, group 2). Cells were labeled previously with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA SE). A third group (n=3) received 20 mL of sterile saline alone. After 48 h, another biopsy / lavage was performed, and the same parameters described above were analyzed. To assess homing, additional biopsies were taken on days 10 and 30 post MSC inoculation and analyzed by confocal microscopy. Dead sperm in saline

markedly increased PMN counts, IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in ELISA ( $p < 0.05$ ), and immunostaining. In phase III a significant reduction ( $p < 0.0001$ ) of PMN was found in all samples, including control mares. ELISA detected a decrease ( $p < 0.05$ ) in IL-6 and TNF- $\alpha$ , in the groups that received MSC, but not in the control group. In the AT-MSC-treated group, a significant decrease was found in the expression of (IL-1 $\alpha$ ,  $p = 0.0003$ ; IL-6  $p = 0.04$ ; IL-8,  $p = 0.006$ , TNF- $\alpha$   $p = 0.004$ ). Expression of IL-10 and COX-2 remained unchanged ( $p = 0.08$ ). In the mares that received ET-MSC, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$  decreased significantly ( $p = 0.01$ ), IL-10 increased ( $p = 0.009$ ), while COX-2 and IL-1 $\alpha$  did not significantly change their expression. In the homing experiment CFDA label was found sparingly in all the samples analyzed until day 30, mainly at the stromal compartment of the endometrium. No differences in the homing pattern was found among cell origins. The inoculation of MSCs significantly reduced inflammation independently of the origin of the cells and that cells perform limited homing detectable after one month of infusion. These findings can be of help for the design of new anti-inflammatory therapies of uterine diseases in mares.

## I. INTRODUCCIÓN

Los equinos, desde su domesticación (entre los años 5000 AC y 2000 AC), han generado un impacto en la vida del hombre, siendo utilizados en múltiples actividades, que iban desde guerras, trabajos, medio de transporte, hasta su uso como fuente de alimento y obtención de subproductos. Hoy en día el caballo es utilizado principalmente en actividades deportivas, entretenimiento, consumo y uso en terapias clínicas. Considerando lo anteriormente descrito, el valor de estos animales estaría determinado por su uso, tipo racial, logros obtenidos, rendimiento etc. En este sentido, no es una sorpresa el impacto económico que las actividades relacionadas con el equino tienen en los países desarrollados. En Chile, de acuerdo con los datos entregados por el VII Censo Nacional Agropuecuario y Forestal (2007) la cantidad de equinos declarados asciende a 341.760 caballares aproximadamente, cantidad que contrasta con la de países vecinos, sin embargo, las actividades relacionadas con la industria equina dentro del rubro silvoagropecuario aportan, de acuerdo a datos entregados por el banco central de Chile, con un 3.4% del PIB nacional.

La eficiencia de un sistema productivo animal implica la correcta interrelación de todos sus componentes, los cuales pueden ser agrupados en: manejo, nutrición, genética y reproducción como sus ejes principales.

Samper (2000) propuso que el éxito de un sistema de reproducción equina se basa en tres factores: la fertilidad de la yegua, la del potro y el manejo

reproductivo. En el caso de la hembra equina, los problemas de fertilidad corresponden al tercer problema clínico más relevante después de los cólicos y de las afecciones respiratorias, teniendo como principal consecuencia la subfertilidad, asociados a diversas patologías uterinas.

Los tratamientos convencionales para este tipo de patologías incluyen, principalmente, el uso de agentes antibacterianos y agentes ecbólicos, con diverso grado de éxito, sin embargo, se debe considerar dentro de un correcto diagnóstico, factores tales como la naturaleza de la patología (infecciosa o no), tiempo transcurrido, daños ultraestructurales del tejido afectado, presencia de signología clínica entre otros.

Hoy en día, se han propuesto una serie de alternativas de tratamiento para estas afecciones, que incluyen moléculas inmunomoduladoras, tales como el extracto de pared celular de micobacterias (MCWE), el uso plasma rico en plaquetas (PRP) y el tratamiento basado en células madre (dentro del contexto de la medicina regenerativa). La medicina regenerativa se basa en la utilización de células madre mesenquimales (MSCs) con el objetivo de restaurar estructural y funcionalmente los tejidos u órganos afectados (Lopez y Jarazo, 2015).

El uso de terapias en base a MSC está ampliamente descrito en equino, sin embargo, la mayoría de estas terapias se basan en el tratamiento de lesiones en tendones (Schnabel et al., 2009; De Mattos Carvalho et al., 2011; Marfe et al., 2012; Godwin et al., 2012; Manning et al., 2013; Martin et al., 2014), lesiones de

cartílago articular (Arufe, 2011; Carrade et al., 2011, Spaas et al., 2012), ligamentos (Leppänen et al., 2009; Renzi et al., 2013) y en menor medida en lesiones de carácter reproductivas, asociadas principalmente al tejido endometrial (Mambelli et al., 2013; Ferris et al. , 2014; Navarrete et al., 2020). Los resultados obtenidos han sido prometedores, sin embargo, los mecanismos de acción de estas células no están del todo claros.

La capacidad de las MSC para participar en procesos regenerativos, se atribuiría a la producción de moléculas y mediadores capaces de activar procesos de reparación intrínsecos, asociados con el daño tisular (Perrini, et al., 2016). Las vesículas extracelulares (VE) podrían estar involucradas en este proceso como un componente integral en la comunicación célula-célula. Las VE contienen varias moléculas activas como lípidos, proteínas, ARNm y miARN (Biancone, et al., 2012; Bruno, et al., 2012).

Tras la extracción del tejido, a partir de dos fuentes diferentes y posterior aislamiento de MSC equinas, sería de suma importancia definir sus características biológicas, como migración, propiedades regenerativas, antiinflamatorias e inmunitarias entre otras, y tratar de comprender como la fuente de obtención determinaría los resultados obtenidos. Adicionalmente, el análisis de las características moleculares de las MSCs es fundamental para conocer la forma de aplicación clínica más eficiente tras una caracterización más profunda. De lo anterior podríamos desprender que las diferencias observadas,

dependiendo de la fuente de obtención de las MSCs, serían producto de los cambios en el perfil transcriptómico de las células, perfil que determinaría, entre otras cosas, la secreción de poblaciones de VE con carga de miARN específica.

## **I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.**

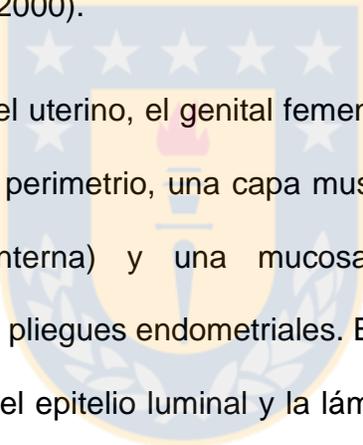
### **1. Patología uterina.**

Numerosos estudios han señalado, que tanto factores intrínsecos como extrínsecos confluyen en conjunto para regular el funcionamiento reproductivo de una yegua. Sin embargo, y debido a esto, un gran número de yeguas presenta problemas de subfertilidad, no quedando gestante entre temporadas y repitiendo servicios dentro de la estación reproductiva con la consiguiente pérdida económica y genética (Doig et al., 1981).

Las causas de subfertilidad en yeguas son variadas, pudiendo ser o no infecciosas, constituyendo por esta razón un fenómeno multifactorial, sin embargo, se considera que las patologías que afectan al útero serían la principal causa de reducción de la fertilidad, siendo esta el tercer problema clínico más importante después del cólico y las enfermedades respiratorias (Traub-Dargatz et al. 1991).

En yeguas la subfertilidad puede ser definida por medio de ciertos parámetros, dentro de los cuales se pueden mencionar: haber sido inseminada o servida en

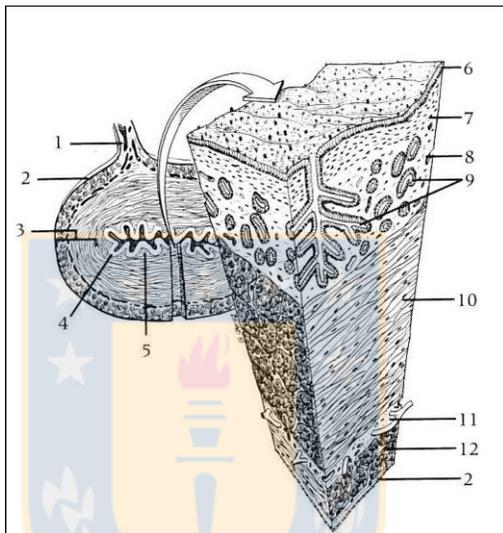
más de 3 ocasiones con un semen que contiene al menos  $300 \times 10^6$  de espermatozoides, normales y móviles durante la estación reproductiva sin presentar gestación, presentar anomalías del tracto genital a la observación o palpación, no presentar un celo normal durante la temporada o bien no gestar durante varios períodos por causas desconocidas (Kenney, 1978). Tomando en cuenta lo anterior, la probabilidad de gestación es reducida y fluctúa entre un 1 a 55% por ciclo estral, siendo muy difícil cambiar estos factores por el solo manejo reproductivo (Samper, 2000).



Histológicamente a nivel uterino, el genital femenino a presenta tres capas: una capa serosa externa o perimetrio, una capa muscular o miometrio (longitudinal externa y circular interna) y una mucosa o endometrio, organizado macroscópicamente en pliegues endometriales. El endometrio está constituido a su vez por dos capas, el epitelio luminal y la lámina propia, el primero formado por células cuboidales altas, asentadas en una membrana basal, el segundo posee dos estratos: compacto y esponjoso (Kenney, 1978).

El estrato compacto está compuesto de células ovaladas estromáles, de gran núcleo y escaso citoplasma, el estrato esponjoso en cambio posee pocas células dispersas, lo que le atribuye este aspecto. Aquí se ubican un gran número de glándulas endometriales, de epitelio secretor cuboidal, que poseen 2 a 3 ramas primarias y aproximadamente 10 ramas secundarias, además, junto a las

glándulas en este segmento es posible ubicar vasos sanguíneos y linfáticos (Kenney, 1978). (Figura 1).



**Figura 1.** Sección transversal del cuerno uterino equino. 1, mesometrio; 2, perimetrio; 3, miometrio; 4, endometrio; 5, estroma endometrial; 6, epitelio luminal; 7, estrato compacto de la lámina propia; 8, estrato esponjoso de la lámina propia; 9, glándulas endometriales; 10, capa circular interna del miometrio; 11, capa media (vascular) del miometrio; 12, capa longitudinal externa del miometrio Fuente: Doig y Waelchli 1993.

Según Doig y Waelchli (1993), el endometrio equino experimenta cambios histológicos durante el año dependiendo de la estación, y dentro de la estación reproductiva durante las distintas etapas del ciclo estral. Así, durante el anestro fisiológico, el endometrio sufre algún grado de atrofia debido a la inactividad

ovárica (Kenney, 1978) y a la falta de influencia hormonal. Mientras que, durante la estación reproductiva en el estro, el epitelio luminal se torna alto y columnar, llegando a presentarse pseudoestratificado, es frecuente la vacuolización y la acumulación moderada de polimorfonucleares (PMNs). El edema de la lámina propia es fácilmente apreciable, restándole densidad a las glándulas, las que se agrupan apareciendo poco tortuosas (Doig y Waelchli, 1993). En el diestro, según Kenney (1978), las células del lumen epitelial son altas o cuboidales reunidas en una sola capa, infrecuentemente dos, la densidad aparente de las glándulas aumenta, por la disminución del edema y por la gran actividad que estas presentan, alcanzando en este momento su mayor ramificación y altura de su epitelio.

Durante la estación reproductiva equina, existen múltiples factores que pueden afectar, en menor o mayor medida la eficiencia reproductiva. Sin embargo, la causa primaria que afecta la eficiencia reproductiva en yeguas está vinculada a procesos inflamatorios uterinos (Pasolini et al., 2016).

Las condiciones inflamatorias del útero pueden ser clasificadas como: aguda, crónica, activa, subclínica, post parto, bacteriana, fúngica, viral, inducida por la monta, persistente, entre otras. Cada una de estas clasificaciones es válida, para describir infecciones o afecciones inflamatorias en el útero de la yegua (Hurtgen 2006). En este sentido, la endometritis se define como una inflamación del endometrio que puede ser aguda o crónica, infecciosa o no infecciosa, que es,

de acuerdo con los datos reportados, el tercer problema más común que enfrentan los veterinarios equinos (Traub-Dargatz et al., 1991) y la causa principal de infertilidad y subfertilidad en caballos (Allen, 1993). De acuerdo con el esquema propuesto por Troedsson (1999), la endometritis en yeguas está dividida en: a) endometritis transmitida sexualmente, b) endometritis crónica de carácter infeccioso, c) endometritis inducida post monta y d) endometritis crónica degenerativa o endometrosis, concepto introducido por Kenney en 1978.

La endometritis transmitida sexualmente, conocida como metritis contagiosa equina (MCE) es causada por *Taylorella equigenitalis*, patógeno altamente contagioso, que causa una endometritis aguda y descarga vaginal abundante en hembras infectadas a lo largo del ciclo estral (Watson, 2000), provocando infertilidad temporal y ocasionalmente aborto a partir de los 60 días de gestación (Watson y Stokes, 1990). La transmisión de este padecimiento es esencialmente venérea, aunque la transmisión mecánica por medio de fomites (especúlos vaginales, guantes de palpación rectal, artículos para la inseminación y el manejo higiénico inadecuado de los órganos genitales de yeguas y sementales) también es posible. En el semental no existen signos clínicos, pero la *T. equigenitalis* puede encontrarse en el área del pene, en el esmegma, prepucio y uretra (Watson 2000).

La endometritis crónica de carácter infeccioso comúnmente es el resultado de una endometritis inducida post monta (PMIE), sin embargo, aquellas yeguas que

no tienen antecedentes de PMIE pueden presentar una infección uterina de estas características. Los principales patógenos involucrados en esta patología son: *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, o levaduras. De estos organismos *S. zooepidemicus* es el más comúnmente aislado, siendo parte de la microflora normal de la piel del caballo y es un contaminante habitual del útero después del apareamiento. Por otro lado, *E. coli* se aísla frecuentemente en yeguas que poseen defectos anatómicos en la región perianal y vulvar, que predisponen a pneumovagina y contaminación fecal (Le Blanc, 1997). El establecimiento o no de una infección, así como su persistencia, radica en el sistema de defensa uterino que posea la yegua (Watson, 2000).

La endometrosis, es una condición crónica definida como una fibrosis endometrial estromal y/o periglandular, activa o inactiva (dependiendo del porcentaje de focos fibróticos determinados por biopsia), incluyendo alteración glandular con focos fibróticos (Hoffmann et al. 2009) que puede afectar glándulas individuales o grupos de ellas (Kenney 1978). La endometrosis está dada por cambios estructurales en el endometrio, que incluyen la ocurrencia de una proliferación focal progresiva de las glándulas uterinas, las cuales se encuentran agrupadas en nidos rodeadas por numerosas capas de tejido fibrótico, mientras que, en el interior de estos nidos, se forman quistes glandulares, disminuyendo a su vez, el número normal de glándulas. La fibrosis estromal es el proceso más relevante de la enfermedad, el cual resulta en alteración de la circulación linfática generando una extensión linfática (Katkiewicz et al. 2007).

Para efectos de esta revisión y posteriores consideraciones de este trabajo, el foco será en la endometritis inducida post monta, describiendo eventos fisiopatológicos asociados a la patología, diagnóstico y tratamientos, haciendo hincapié en las nuevas tecnologías de medicina regenerativa, específicamente las vinculadas al uso de células madre.

## **2. Endometritis inducida postmonta (PMIE).**

Tanto después de la monta natural como de la inseminación artificial (IA), todos los componentes del eyaculado: espermatozoides, plasma seminal, pero también bacterias y otros elementos presentes en el eyaculado se depositan en el útero. La yegua sana, experimenta una reacción inflamatoria normal de carácter temporal a nivel uterino, en respuesta a todos estos componentes, sin embargo, esta reacción remite en condiciones normales dentro de las primeras 24 a 48 horas. Lo anterior, permite que el ambiente uterino retorne a la normalidad, y que el embrión que ingresa al útero alrededor del día 5 y 6 post ovulación pueda implantarse sin problemas. A este grupo de yeguas se les conoce como yeguas “resistentes” a la PMIE (Le Blanc et al., 2009). Sin embargo, aquellas yeguas que no logran resolver esta inflamación dentro de los 48 a 72 hrs son consideradas como yeguas “susceptibles” (Le Blanc et al., 2009), a padecer una endometritis post monta de carácter persistente (Brinsko et al., 2011, Hughes y Loy, 1969), en donde la acumulación de líquido intrauterino persiste durante cinco días después

de la ovulación, comprometería su éxito reproductivo de estas yeguas, con el riesgo además, de padecer infecciones bacterianas concomitantes.

Cuando los espermatozoides o bacterias ingresan al útero, gatillan señales quimiotácticas, resultando en el reclutamiento de PMNs hacia el lumen uterino (Kotilainen et al. 1994). Una vez que estos se activan, se unen a los espermatozoides o bacterias, a través de la unión mediada por receptores y mediante la expulsión de su propio ADN, formando Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) (Alghamdi y Foster, 2005), resultando en la fagocitosis de espermatozoides o bacterias adheridas. Durante la activación de PMNs, la prostaglandina F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) es liberada desde las membranas celulares, a través del metabolismo del ácido araquidónico mediante la vía de las ciclooxigenasas. Esta molécula no solo actúa como mediador de la inflamación, sino que también promueve la contracción de la musculatura lisa, incluyendo el miometrio (Troedsson et al., 1995). Se cree que estas contracciones, remueven físicamente el fluido acumulado y productos inflamatorios perjudiciales desde el útero (Troedsson 1999). Este mecanismo asegura que las condiciones normales, a nivel uterino, se reestablezcan lo antes posible, sin embargo, existen yeguas en las cuales este mecanismo al parecer estaría alterado a varios niveles, resultando en una acumulación de fluido intraluminal y productos inflamatorios, los que podrían estar involucrados en el desarrollo de fibrosis endometrial posterior (Rebordao et al., 2014).

En 1969, se realizaron los primeros ensayos para evaluar la susceptibilidad a una endometritis persistente de carácter infecciosa en yeguas. Los investigadores observaron, que yeguas jóvenes y fértiles, poseían una recuperación más rápida tras una endometritis inducida experimentalmente, (con una cepa bacteriana) en comparación a aquellas yeguas de mayor edad y con un historial de infertilidad (Hughes y Loy. 1969). A partir de entonces la susceptibilidad o resistencia a endometritis persistente ha sido identificada de varias formas.

Para propósitos experimentales la clasificación de susceptibilidad o resistencia a endometritis persistente (ya sea esta post monta o de origen bacteriano) se ha basado en el score de biopsias endometriales solamente, o asociado al historial reproductivo de la hembra (Watson y Thomson 1996, Cheung et al., 1985). En este mismo sentido, existen varios criterios que han sido implicados en la susceptibilidad a endometritis persistente, tales como la conformación del área perianal (Hemberg et al., 2005) características anatómicas del útero, en donde un útero “pendulante” que cae más allá del borde de la pelvis sería menos eficiente en eliminar una infusión líquida, comparada con yeguas que poseen un útero que se posa en el borde pelviano (Ricketts y Alonso 1991, Carnevale y Ginther 1992). Adicionalmente, yeguas con una retención excesiva de fluidos durante el diestro (Brinsko et al., 2003) o positivas al cultivo celular previo al encaste, (Riddle et al., 2007) fueron más propensas a tener problemas en controlar la inflamación uterina después de la monta.

## **1.1 Respuesta inflamatoria.**

Los aspectos celulares y humorales de la respuesta inmune adaptativa han sido estudiados en el tracto reproductivo de las yeguas. Las inmunoglobulinas (IGs) a nivel uterino estarían involucradas en el desarrollo de la endometritis persistente de origen bacteriano, las que también han sido identificadas en el útero de yeguas susceptibles a endometritis, sin embargo, los resultados no han sido concluyentes (Troedsson et al., 1993b), por lo tanto, aún no existen datos que demuestren que la susceptibilidad esté directamente relacionada con IGs alteradas en el útero.

La presencia de diferentes células inflamatorias durante la endometritis ha sido caracterizada. La inducción de una endometritis, a través de IA en yeguas sanas, provocó un incremento de las células T CD4+ pero no CD8+, durante las 6 a 48 horas tras la inducción (Tunon et al., 2000). En otro estudio, han identificado tanto células CD4+ como CD8+, a partir de biopsias uterinas de yeguas con endometritis de origen bacteriano (Huth et al., 2014).

El reconocimiento de antígenos, y el reclutamiento de células inflamatorias hacia el sitio de la inflamación, son iniciados por citoquinas producidas por una variedad de tipos celulares, incluyendo linfocitos y macrófagos, pero también se ha reportado que intervienen en su producción células epiteliales, fibroblastos y células estromales (Parham, 2005). Dentro de estas citoquinas, la familia de las interleucinas (IL) son críticas en el desarrollo y control del proceso inflamatorio.

Las citoquinas pro inflamatorias, IL-1 $\alpha$  y IL-1 $\beta$  son liberadas desde el comienzo de la inflamación, promoviendo a su vez, el aumento en la transcripción de otras citoquinas, evento que provoca la activación y reclutamiento de células inflamatorias. Otra citoquina pro inflamatoria importante, es el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual está relacionado con la respuesta inflamatoria tanto innata como adaptativa, además posee propiedades antibacterianas, y facilita la migración de células inflamatorias a través del endotelio vascular. Por otro lado, la liberación de IFN- $\gamma$  promueve el aumento de óxido nítrico inducible (iNOS), el cual jugaría un rol importante en la fisiopatología de la endometritis persistente (Troedsson y Woodward, 2016).

Para controlar la respuesta inflamatoria, es crítica la existencia de un balance apropiado, entre los efectos pro y anti inflamatorios. Así, en respuesta a un estímulo inflamatorio, citoquinas anti inflamatorias son liberadas, tales como IL-10 y el antagonista del receptor (RA) de IL-1 (Dinarello, 1991, Barnes, 1998), esta última modula la acción de IL-1, uniéndose al receptor de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Fumuso et al., 2003 indicó que, tanto en hembras resistentes como susceptibles a endometritis persistente, existe un aumento en la expresión de ARNm de las citoquinas pro inflamatorias IL-1, IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), 24 horas después de inducir una endometritis utilizando IA con espermatozoides muertos. Este mismo grupo en el año 2007, publicó un artículo en donde indicaban que en yeguas susceptibles existió un aumento en la expresión del

ARNm de otra citoquina pro inflamatoria (IL-8), mientras que la IL-10 disminuyó su expresión comparado con hembras resistentes, a las 24 h de haber inducido una endometritis.

Recientemente, dos estudios evaluaron el patrón de expresión de citoquinas pro y anti inflamatorias en el ambiente uterino, medido en diferentes momentos tras la inoculación de *Escherichia coli* o espermatozoides, tanto en grupos de yeguas resistentes como susceptibles a endometritis persistente. Christoffersen et al., 2012 mostraron que en yeguas resistentes, hubo un aumento en la expresión de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  3 horas después de la inoculación con *E coli*, mientras que, en yeguas susceptibles, hubo una significativa menor expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6, a su vez este grupo de hembras, mostraron una mayor expresión de IL-1RA. Otro dato, en este mismo estudio, se observó que en el grupo de yeguas susceptibles la respuesta inflamatoria se prolongó a lo largo de todo el estudio (72hrs), con incremento en los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-1RA y la relación IL-1 $\beta$ /IL-1RA, mientras que en el grupo de yeguas resistentes los niveles retornaron a sus valores basales a las 12 horas. Lo anterior, se ve reforzado con el estudio realizado por Woodward et al., 2013a, en este estudio se demostró, que en yeguas susceptibles existió una menor expresión de las citoquinas IL-10, IL-1RA e IL-6, (las cuales actúan modulando la inflamación durante las fases iniciales de la misma) cuando se le comparó con yeguas resistentes, a las 6 horas de ser expuestas a IA con espermatozoides muertos.

Estas investigaciones sugieren que a nivel endometrial, la expresión de transcriptos para citoquinas pro inflamatorias en yeguas resistentes se auto regularía, normalizándose la expresión de estas dentro de un período de tiempo corto, mientras que en aquellas que son susceptibles, existiría una prolongada expresión de estas citoquinas, soportando la hipótesis que la expresión desbalanceada de genes de citoquinas inflamatorias a nivel endometrial, podría jugar un rol en la patogénesis de la endometritis persistente.

Aquellas citoquinas, que se encuentran vinculadas en la patogénesis de fibrosis, en otras especies diferentes a yeguas y a tejidos diferentes al endometrial, tales como pulmones, hígado o riñones, podrían ser consideradas como posibles modelos, que ayuden a explicar los mecanismos involucrados en el establecimiento de patologías endometriales crónicas, tales como la endometrosis.

Dentro de este contexto, se pueden adscribir citoquinas tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), que están asociadas a funciones pro fibróticas como por ejemplo la estimulación y migración de fibroblastos, síntesis de matriz proteica, apoptosis de células epiteliales, diferenciación de miofibroblastos, siendo además potentes activadores de la síntesis de colágeno (Atamas, 2002; Olman, 2009).

Trabajos realizados por (Rebordao et al., 2013), en endometrio equino, indican que durante la fase luteal, existe una mayor expresión de los marcadores de fibrosis TGF- $\beta$  e Inhibidor tisular de metaloproteinasa 1 (TIMP-1), cuando los explantes de endometrio fueron expuestos *in vitro* a CTGF. Adicionalmente, observaron un incremento en la transcripción del gen del receptor para TGF- $\beta$ 1 y de colágeno tipo I y III, lo que sugiere una relación con el depósito patológico de colágeno característico de fibrosis. De acuerdo a lo indicado en este estudio, existen variaciones en la expresión de estos marcadores pro fibrosis cuando cambian las condiciones hormonales.

## **1.2 Mecanismo de limpieza.**

Independiente del origen de la endometritis, ya sea esta post monta o de origen bacteriano, en ambas al parecer existe una falla en los mecanismos físicos de limpieza del útero.

Un estudio realizado por Troedsson et al., 1993a, se evaluó la actividad miometrial, mediante el uso de electrodos implantados a nivel miometrial en yeguas resistentes y susceptibles a infección uterina crónica. En el caso de las yeguas susceptibles, se observó diferencias en la frecuencia, duración e intensidad de la actividad miometrial, comparado con las yeguas resistentes. Estas diferencias fueron más marcadas entre las 10 y 20 horas después de la inoculación intrauterina de bacterias. Este déficit de la actividad miometrial podría

ser una de las principales causas en la patogénesis del retraso de limpieza uterina.

Estudios que apoyen este fenómeno relacionan al óxido nítrico (NO), el cual sería producido en exceso, a partir de la NO sintetasa inducible (iNOs) (Li et al., 2010) durante la inflamación como una posible causa de la falla en la limpieza del útero. En sistemas biológicos la enzima NO actúa como relajante del músculo liso, en ensayos *in vitro* se ha demostrado, que el tejido endometrial es incapaz de responder a estímulos eléctricos en presencia de NO (Liu et al., 1997).

Estudios realizados en yeguas susceptibles a PMIE observaron no solo un incremento en la acumulación intrauterina de NO, (Alghamdi et al., 2005, Woodward et al., 2013b) sino que también un aumento en la expresión de ARNm para iNOS (Alghamdi et al., 2005, Christoffersen et al., 2012) posterior a la inseminación.

### **1.3 Plasma seminal y su vinculación con la PMIE.**

Con respecto a los mecanismos que intervienen en el proceso inflamatorio fisiológico post monta, la función del plasma seminal en el eyaculado sería actuar como un inhibidor o modulador inflamatorio a nivel uterino, contribuyendo a la presentación de una endometritis transitoria. Lo anterior queda demostrado cuando el plasma seminal es incluido en la dosis de semen, el cual genera un

proceso inflamatorio menor que cuando el plasma es removido y reemplazado por un extensor comercial de semen (Troedsson et al., 2002).

Durante el desarrollo de PMIE, el plasma seminal al parecer, estaría asociado con el transporte selectivo de espermatozoides *in utero*, discriminando aquellos muertos de los vivos (Katila, 1995), hecho que queda demostrado en parte, cuando se observó que la incorporación de plasma seminal reducía la unión entre espermatozoides vivos y células inflamatorias *in vitro* (Alghamdi et al., 2004). Sin embargo, la fertilidad no se vio alterada cuando las yeguas son inseminadas incluso sin plasma seminal (Katila, 1995), aunque la fertilidad fue significativamente menor cuando las yeguas fueron inseminadas en presencia de una endometritis inducida post monta sin la inclusión de plasma seminal (Alghamdi et al., 2004). Esto se atribuye al efecto detrimental del medio ambiente inflamatorio sobre las características motiles del espermatozoide, los que además se unen a PMNs formando grandes clústers de PMNs y espermatozoides. Finalmente, los datos sugieren que el plasma seminal protege selectivamente a los espermatozoides viables de la unión a PMNs y de la fagocitosis (Troedsson et al., 2006).

La presencia de la proteína CRISP-3 en el plasma seminal, al parecer sería la responsable de la reducción en la unión de espermatozoides viables y PMNs. Esta protección selectiva, incrementa la supervivencia de los espermatozoides viables en un ambiente uterino hostil, asegurando que un número adecuado de

espermazoides alcancen el oviducto para la fertilización, mientras se excluyen espermatozoides no viables. (Troedsson et al., 2014). En este sentido la lactoferrina, glicoproteína presente tanto en el plasma seminal como en el endometrio, demostró promover, *in vitro*, la unión de espermatozoides no viables a PMNs, lo que sugiere uno de los roles de la lactoferrina es mejorar la interacción célula a célula entre PMN y espermatozoides, facilitando la eliminación de espermios muertos desde el útero (Troedsson et al., 2014).

#### **1.4 NETs y su relación con la fisiopatología de la PMIE.**

A pesar de los extensos estudios, en torno a la fisiopatología de la endometritis aún permanecen desconocidos aquellos mecanismos involucrados en la evolución crónica de la enfermedad. En respuesta a algún estímulo, tales como semen o bacterias, neutrófilos pasan desde el torrente sanguíneo, cruzando el endotelio vascular alcanzando el útero (Zerbe et al., 2004; Katila, 2012). Estas células constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune innato, actuando a través de diversos mecanismos (Brinkmann, 2011; Souza et al., 2011).

Actualmente, existe un nuevo paradigma en la inmunidad innata, que va más allá de la liberación de enzimas líticas y fagocitosis, los PMNs poseen la habilidad para expulsar su propio ADN en respuesta a un estímulo infeccioso, formando lo que se denomina NETs; (Brinkmann et al., 2004; Neeli et al., 2009). NETs

consisten en un gran complejo de moléculas tales como proteínas nucleares y citoplasmáticas asociadas a ADN. Todas y cada una de estas proteínas poseen fuertes propiedades antimicrobianas y/o inmunomoduladoras, en respuesta a procesos infecciosos y pro inflamatorios respectivamente (Fuchs et al., 2007; Lögters et al., 2009; Brinkmann y Zychlinsky, 2012). En el sitio de infección, NETs toman contacto con el patógeno eliminándolo, a través de un proceso activo denominado como NETosis (Weinrauch et al., 2002; Fuchs et al., 2007; Pilszczek et al., 2010; Brinkmann, 2011; Windt et al., 2012), confinando la infección y evitando su diseminación (Beiter et al., 2006). Durante este proceso, ocurre ruptura de la envoltura nuclear y de la membrana citoplasmática de los PMNs, liberando los componentes de NETs (histonas, elastasa, catepsina G, mieloperoxidasa, etc).

Las funciones que se le atribuyen a NETs han abierto el debate en cuanto al rol deseable que cumplen como primera línea de defensa controlando la infección, sin embargo, también pudiese tener efectos adversos en tejidos susceptibles, debido a la liberación de moléculas que podrían dañar aún más el tejido inflamado colindante, contribuyendo al desarrollo de fibrosis (Lögters et al., 2009; Marcos et al., 2010).

Rebordao y colaboradores (2014), mostraron que algunas cepas bacterianas de *S. zooepidemicus*, *Escherichia coli* o *Staphylococcus capitis*, conocidos por causar endometritis en yeguas, fueron capaces de inducir la liberación *in vitro* de

NETs por parte de PMN. Adicionalmente, ha sido reportado la formación *in vitro* de NETs por parte de PMN equinos en presencia de células espermáticas de potro (Alghamdi y Foster 2005; Alghamdi et al., 2009). Sin embargo, no existe evidencia en equinos que ayude a entender el mecanismo por el cual los NETs unidos a bacterias y/o espermios son removidos desde el útero.

Para entender de mejor forma el rol de NETs en la modulación de la respuesta inflamatoria y en la patogénesis de la fibrosis, Rebordao et al., (2013) estudiaron el efecto de la exposición de explantes de endometrio equino a los componentes proteicos de NETs tales como catepsin G, elastasa y mieloperoxidasa. Como resultados, indicaron que aquellos explantes de endometrio de yeguas en fase folicular sometidos a una larga exposición (48h) a mieloperoxidasa y elastasa elevaron la síntesis de TIMP-1, conocido por modular la expresión de genes involucrados en el desarrollo de fibrosis (Gressner et al., 2007; Zhu et al., 2012). Adicionalmente en este estudio se indicó que durante la fase luteal aquellos explantes de endometrio expuestos a catepsina G aumentaron no solo la expresión de TIMP-1 sino que también de TGF- $\beta$ , el cual es considerado como un potente promotor de fibrosis en hígado, pulmones, piel y riñones (Olman, 2009).

A pesar de todos estos antecedentes, aún no es posible establecer con claridad alguna relación de la influencia del ciclo estral, formación de NETs por parte de PMNs y el establecimiento de fibrosis endometrial en yeguas. Sin embargo, es

posible establecer que en el endometrio equino existen acciones contrapuestas de los NETs en donde por un lado existe una acción contra las bacterias en el sitio de la infección, mientras que por otro lado también podría inducir productos dañinos que conducen a endometrosis.

### **3. Diagnóstico.**

El diagnóstico de endometritis en la yegua representa uno de los desafíos cruciales en la práctica clínica en esta especie, donde se ha logrado establecer que la progresión hacia un estado crónico de la enfermedad radica en la incapacidad de indentificar el agente causal, dado que una gran proporción, las yeguas afectadas no siempre muestran signos clínicos evidentes (Cadario, 2014).

Tradicionalmente el diagnóstico de endometritis se basa en el historial de la yegua, en los hallazgos clínicos y en exámenes histológicos, citológicos y microbiológicos (LeBlanc y Causey, 2009). En relación con lo anterior, el diagnóstico mediante ultrasonografía, podría ser útil en aquellas yeguas que presentan un retraso en el mecanismo de limpieza uterina, en donde la presencia de líquido intraluminal persiste en el útero por más de 12 horas post monta o IA. Las yeguas que están predispuestas a padecer esta condición pueden demostrar un patrón anormal de edema durante la etapa del diestro (Troedsson et al., 1995). El edema excesivo (grado 5/5) (Tabla 1) y/o un fluido intraluminal hipoeoico visible en la examinación ultrasonográfica previo a la ovulación, sugiere una alta

probabilidad de que la yegua experimente PMIE (Samper, 2000). Además, también se ha considerado como buen predictor de susceptibilidad a PMIE, la presencia de más de dos centímetros de fluido uterino observados ecográficamente durante el estro (Brinsko et al., 2003).

Sin embargo, se describen casos de endometritis subclínica los cuales no muestran los signos típicos de endometritis tales como acumulación de líquidos en el útero (LeBlanc y Causey, 2009) haciendo más complejo el diagnóstico.

**Tabla 1.** Sistema de puntuación subjetiva para edema endometrial en la yegua.  
Fuente: Samper y Pycoc, 2007.

<b>Puntaje</b>	<b>Descripción</b>
0	Sin edema, ecotextura homogénea.
1	Bajo nivel de edema uterino detectable.
2	Moderada cantidad de edema, principalmente en cuerpo uterino.
3	Edema obvio a través de todo el útero.
4	Máxima cantidad normal de edema en útero, a veces poca cantidad de fluido libre en lumen, mayor edema en cuerpo uterino.
5	Edema uterino anormal, irregular y desorganizado.

La biopsia endometrial es reconocida internacionalmente como un método de diagnóstico fiable, sin riesgos para la salud del animal, y de utilidad en el

pronóstico de la condición endometrial en la yegua, no obstante, el tiempo que transcurre entre la toma de la muestra y la entrega de los resultados hace que esta técnica sea inapropiada en la instauración de un tratamiento inmediato (Buczkowska et al., 2014; Snider et al., 2011).

Las biopsias endometriales se recolectan usando un instrumento esterilizado, indicado para este tipo de procedimiento, que pasa a través del cuello del útero hasta alcanzar el lumen uterino. Luego se inserta un brazo en el recto para guiar la pinza de biopsia a la ubicación deseada, que generalmente es en la base del cuerpo del útero (Buczkowska et al., 2014). Una vez cerrada la pinza, se retira y la muestra se coloca inmediatamente en medios seleccionados, dependiendo de su uso posterior.

En la práctica, cuando se realiza este procedimiento, solo se obtiene una muestra de tejido endometrial, sin embargo, existen estudios que revelan que no siempre el diagnóstico es certero cuando se toma una sola muestra para el análisis. Uno de esos estudios fue realizado en un recinto de faena, en donde no fue posible establecer un diagnóstico con suficiente exactitud, en base a los cambios degenerativos en el endometrio de yeguas (Fiala et al., 2010). Otro estudio *post mortem*, reveló que la evaluación de inflamación por técnicas citológicas e histológicas no entregaron el mismo resultado dependiendo del sitio de la obtención de la muestra. (Overbeck et al., 2013).

La técnica de biopsia consiste en la extracción de una pequeña porción del endometrio (en ocasiones puede contener parte de la capa muscular circular interna) y su posterior análisis histopatológico. Esta técnica ha sido utilizada desde la década de los 70 y según Kenney (1978) está indicada en los siguientes casos:

- Yeguas secas de temporadas anteriores.
- Yeguas repetidoras.
- Yeguas con alteraciones uterinas (detectables con ultrasonido o por palpación trasnrectal).
- Examen ginecológico.
- Yeguas que no muestran estro durante la estación reproductiva.
- Piometra o mucometra (posterior al tratamiento).
- Yeguas con muerte embrionaria reciente.
- Yeguas que requieren cirugía genital (no emergencia).
- Yeguas receptoras de un programa de transferencia de embriones.
- Yeguas en programas de investigación cuando el potrillo es relevante.

La biopsia endometrial permite diagnosticar principalmente dos tipos de procesos patológicos: inflamatorios y degeneración tisular (Kenney, 1975). Una limitación de la técnica es que no permite conocer específicamente el agente etiológico, por lo tanto, la biopsia debe evaluarse en el contexto de una evaluación reproductiva completa y precisa, exámenes minuciosos rectales y vaginoscópicos, cultivo y

citología endometrial, ultrasonografía e incluso evaluación endocrinológica que puedan agregar información que ayuden en la interpretación de la biopsia (Kenney, 1978).

### **3.1 Clasificación histopatológica del endometrio.**

Históricamente se han planteado numerosas clasificaciones para los múltiples hallazgos histopatológicos endometriales, siendo una de ellas la descrita por Kenney (1978), que incluye tres categorías: I, II y III, las cuales se basan principalmente, en una estratificación de los hallazgos inflamatorios, su relación con los tipos celulares, su cantidad, ubicación y distribución dentro del endometrio. Posteriormente Doig et al., (1981) proponen una caracterización de cuatro categorías; A, B, C y D, las que se basan en gran medida en la fibrosis periglandular y su relación con la edad y número de partos. Finalmente, Kenney y Doig (1986), proponen una caracterización de cuatro categorías: I, IIA, IIB y III, las que reúnen ambos aspectos: la fibrosis periglandular, la inflamación, además de todos los antecedentes de la historia y el examen ginecológico, que ayuden a definir la categorización del endometrio problema. Ésta constituye la clasificación actual de los cambios histopatológicos del endometrio equino (tabla 2).

Una alternativa para el diagnóstico de endometritis es la medición de las proteínas de la fase aguda (APP) las que son muy sensibles, pero no específicas

como marcadores sistémicos de inflamación. El suero amiloide A (SAA) es una proteína que aumenta rápidamente después de un daño tisular, infección o inflamación, mientras que en equinos sanos, las concentraciones son muy bajas o indetectables (Crisman et al., 2008, Jacobsen et al., 2007).

Estudios realizados por Tuppits et al., (2014) no encontraron diferencias en la concentración de SAA antes y después de la realizada la IA. Sin embargo, Christoffersen et al., (2010) observó un incremento en la concentración de SAA después de la infusión intrauterina de altas dosis de *E Coli* durante la fase de diestro del ciclo estral, sin embargo, estos resultados son dependientes de la dosis del inóculo y de la fase del ciclo estral en la que se encuentre la hembra. Otra proteína es la haptoglobina (Hp), que se encuentra en concentraciones basales en equinos sanos (0,2-1 g/l), aumentando su concentración hasta 10 veces durante la inflamación (Jacobsen et al., 2007). Krakowski et al., (2011) en su estudio sugiere que un aumento en las concentraciones de SAA y Hp previos a la ovulación e IA podría ser un indicador de una endometritis subclínica latente, la cual no sería diagnosticada por métodos como la ultrasonografía. Sin embargo, Sikora et al., (2016) no observaron una asociación entre las concentraciones de APP y la infertilidad en yeguas, tras evaluar muestras sanguíneas provenientes de yeguas fértiles e infértiles tomadas 12 y 24 horas después de la ovulación.

**Tabla 2.** Escala de graduación endometrial propuesta por Kenney en el año 1978 y su posterior modificación. Fuente: Kenney y Doig, 1986.

<b>Kenney, 1978</b>	<b>Kenney y Doig, 1986</b>
<b>Grado I</b>	<b>Grado I</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ninguna alteración o alteraciones leves.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ninguna alteración o alteraciones leves.</li> <li>• No hay atrofia ni hipoplasia.</li> </ul>
<b>Grado II</b>	<b>Grado IIA</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltración difusa leve a moderada en estrato compacto o focos aislados en estrato compacto y esponjoso.</li> <li>• Lagunas linfáticas diseminadas o alteraciones palpables en las paredes del útero.</li> <li>• Atrofia endometrial.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infiltración inflamatoria difusa leve a moderada en estrato compacto o focos en estrato compacto y esponjoso.</li> <li>• Numerosas glándulas con fibrosis (1 a 3 capas de fibrosis) o &gt;2 nidos/ 5,5 mm.</li> <li>• Lagunas linfáticas que causen alteraciones palpables en las paredes uterinas.</li> <li>• Atrofia parcial durante la temporada de monta.</li> </ul>

---

### **Grado IIB**

- Yeguas grado IIA que han estado más de 2 años vacías.
- Combinación de dos o más hallazgos de la categoría IIA.
- Endometritis moderada difusa o focal.
- Fibrosis periglandular (4 a 10 capas de fibrosis)
- 2 – 4 nidos/ 5,5 mm por campo.

---

### **Grado III**

- Endometritis moderada a grave con presencia de plasmocitos.
- Fibrosis grave (> 5 nidos/ 5,5 mm).
- Lagunas linfáticas que causen alteraciones palpables en las paredes del útero.

### **Grado III**

- Combinación de dos o más hallazgos de la categoría IIB.
- Endometritis moderada a severa con presencia de plasmocitos.
- Fibrosis diseminada (> 5 nidos/ 5,5 mm)

- Fibrosis periglandular (> 10 capas de fibrosis).
  - Graves lagunas linfáticas.
  - Atrofia total durante la temporada de monta.
- 

#### **4. Tratamiento.**

Varios son las estrategias de tratamiento tendientes a reducir los riesgos y severidad de PMIE, las cuales varían en dosis, frecuencia, vía de administración y duración del tratamiento (Watson, 2000; LeBlanc, 2010). Existen tratamientos preventivos que favorecen la limpieza uterina tras un proceso inflamatorio, como lo son el uso de agentes ébolicos, ya sea oxitocina (10-25 IU EV o IM) o cloprostenol (250 µg IM), 4 a 8 horas después de la reproducción, o mediante lavados uterinos (Pycock 2009; Knutti et al., 2000). Así mismo se ha recomendado irrigaciones mucolíticas antes de la infusión de antimicrobianos (por vía sistémica o localmente), para eliminar la biopelícula bacteriana y mejorar la absorción de las drogas por la mucosa uterina (LeBlanc et al., 2009).

El uso de glucocorticoides disminuye la respuesta inflamatoria de citoquinas, quimioquinas y otras proteínas asociadas con la inflamación tales como IL-1, iNOS, COX- 2 y moléculas de adhesión. Del mismo modo pueden regular

positivamente la expresión de citoquinas anti inflamatorias tales como IL-10 e IL-1RA. (Hamalainen et al., 2008; Barnes, 1998).

El uso de dexametasona *in vitro* bloquea la producción de IL-1 a través de mecanismos traduccionales y post traduccionales (Knudsen, 1987) y ha sido utilizada en el tratamiento de endometritis post monta en yeguas, sin embargo, el uso de dexametasona podría deprimir las contracciones del miometrio al suprimir la COX-2 y el bloqueo posterior de PGF-2 $\alpha$ , por lo tanto, el tratamiento debe ser acompañado con el uso de drogas ecbólicas.

El uso de extracto de pared celular de micobacterias (MCWE) es usado como un inmuno modulador, estimulando la liberación de señales inflamatorias haciendo más efectiva la respuesta y el posterior resultado. Actualmente se ha usado en tratamientos contra el cáncer, enfermedades respiratorias (Filion y Phillips, 2001, Yuksel et al., 2011) y como adyuvantes en vacunas (Berinstein et al., 1991). Su uso en yeguas ha disminuido la incidencia de endometritis después de ser desafiadas con una cepa bacteriana (Rogan et al., 2007), disminuyendo, además, los niveles de citoquinas pro inflamatorias en yeguas susceptibles, haciéndolos comparables con los de yeguas resistentes a las 6 y 24 horas post servicio (Fumuso et al., 2003 Woodward et al., 2015). Por otro lado, el uso de MCWE incrementa la expresión de ARNm de IL-10, citoquina anti inflamatoria en yeguas susceptibles 24 horas post servicio (Fumuso et al., 2007). Sin embargo, el

mecanismo de acción de estas drogas inmuno moduladoras siguen siendo poco claros.

La medicina regenerativa se presenta actualmente como una alternativa en tratamientos que buscan la regeneración tisular. Esta nueva aproximación se basa en el uso de sustancias biológicas, que usan la capacidad natural del cuerpo para sanar, además de promover la liberación de factores de crecimiento locales (Pineda, 2013). Esta técnica se enfoca en el uso de estrategias terapéuticas que ayuden a reemplazar aquellos tejidos dañados, mejorando así su función nativa (Gurtner et al., 2007).

Los tratamientos que se utilizan en la actualidad en la especie equina son escasos, siendo en su mayoría el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) y en menor grado el uso de MSCs, las que principalmente se han enfocado en la reparación de lesiones del sistema músculo esquelético (Pineda, 2013).

Los concentrados plaquetarios, comunmente representados como PRP, son parte de las nuevas estrategias terapéuticas autólogas, la cual combina plasma y componentes bioativos derivados de plaquetas (citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y enzimas) (Anitua et al., 2019), capaces de crear un ambiente natural que promueva la modulación de procesos inflamatorios, angiogénesis y respuesta inmune, así como promover la sanación y reparación de tejidos dañados (Boswell et al, 2012; Deppermann y Kubes, 2018). Dentro de estos componentes bioactivos podemos mencionar: factor de crecimiento

derivado de plaquetas (PDGF), TGF- $\beta$ , factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento insulínico (IGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Mariani et al., 2020).

Algunos resultados preliminares en equinos, sugieren que el tratamiento intrauterino con PRP mejora el resultado en yeguas subfértiles, actuando como inmunomodulador de la respuesta inflamatoria, medido a través de citología (conteo de PMN), acumulación de fluido y concentración uterina de NO (Reghini et al., 2014; Metcalf, 2014).

Otra alternativa que ha ido tomando fuerza en los últimos años es el uso MSCs, en el tratamiento de endometritis y degeneración uterina. La inflamación post servicio fue modificada después del tratamiento con MSCs, las cuales además migraron exitosamente dentro del endometrio en yeguas con cambios degenerativos a nivel endometrial (Ferris et al., 2014, Mambelli et al., 2013). Lo mismo fue observado por Navarrete et al. (2020) en donde fue posible observar el efecto modulador de las MSCs tras ser administradas localmente, en un modelo *in vivo* de inducción de la inflamación. Lo anterior muestra que la terapia con MSCs es una alternativa promisoría en patologías endometriales en yeguas debido a su alta capacidad de auto regeneración, baja inmunogenicidad, efectos paracrinos, antiinflamatorios, inmunomodulatorios, antiapoptóticos y neuroprotectivos (Maia et al., 2015). Sin embargo, es necesaria mayor investigación con respecto al uso de MSCs como potencial tratamiento de

infertilidad en yeguas, en donde se incluyan la eficacia y el mecanismo de acción exacto de estos tratamientos.

## **5. Células madre mesenquimales.**

Las MSCs son células multipotentes, que fueron reportadas por primera vez en la década de los 60, a partir de cultivos celulares derivados de médula ósea en humanos (Friedenstein, 1966). En este estudio se reportó el cultivo exitoso de células con aspecto fibroblástico con capacidad de formar colonias. Pero no fue hasta los años 90 en que se asoció y popularizó a estas células con el término: Célula Madre Mesenquimales (Caplan, 1991; Horwitz et al., 2005), haciendo referencia al origen mesodermal de este tipo celular del cual derivan todos los componentes del sistema musculo esquelético (músculos, ligamentos, tendones y cartílago), haciendo referencia además a la capacidad de las células mesenquimales a migrar durante el desarrollo embrionario temprano hacia la capa ectodérmica y endodérmica del embrión (Caplan, 1991).

Hoy en día algunos autores consideran que este término sería inapropiado al considerar un origen diferente, a partir de células perivasculares o pericitos (Crisan et al., 2008), en contraposición al origen medular considerado durante los últimos 35 años. Por lo tanto, las MSCs eventualmente podrían ser liberadas desde el espacio perivascular, en donde se encuentran formando parte de la

membrana basal que rodea los vasos sanguíneos, en respuesta a una injuria capilar o como respuesta a una reacción inflamatoria (Caplan, 2008).

En el año 2006, la Sociedad Internacional para la Terapia Celular, publicó un criterio general en donde definieron las características usadas para la identificación de MSCs (Dominici et al., 2006), estas son: 1) adherencia al plástico en condiciones de cultivo, 2) potencial de diferenciación hacia linajes mesodermales: osteogénico, condrogénico y adipogénico y 3) expresión de moléculas del clusters de diferenciación (CD) tales como CD29, CD44 y CD90 y falta de expresión de CD34, CD79 y complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC-II) (De Schauwer et al., 2011). Sin embargo, las características que definen a las MSCs son aun inconsistentes entre los investigadores y varios métodos han sido desarrollados para aislar y expandir MSC, ocasionalmente con resultados diferentes entre ellos (Dominici et al., 2006).

La capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos es una característica que demuestra la funcionalidad de las MSCs (Horwitz et al., 2005). Las MSCs bajo estímulos específicos *in vitro*, tienen la capacidad de diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos (Dieudonne et al., 2013; Amable et al., 2014). Sin embargo, las vías de señalización que rigen la diferenciación de las MSC no se encuentran del todo claras, pero sí se han logrado dilucidar algunos reguladores moleculares y sus mecanismos de acción (Kolf et al., 2007). En las tres líneas de diferenciación mesodérmica, hay factores de transcripción maestros que deben ser activados para dirigir la diferenciación de MSC hacia alguno de estos linajes.

Las MSC también se han podido diferenciar hacia linajes no mesodérmicos, como neuronas, células del páncreas endocrino, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos (Schäffler y Büchler, 2007).

Las MSCs han sido obtenidas desde humanos y una amplia variedad de especies animales incluyendo roedores, caninos, porcinos, bovinos y equinos, siendo aisladas a partir de muchos tejidos adultos. En equinos, las MSCs han sido aisladas y caracterizadas principalmente a partir de tejido adiposo (AT-MS) (Vidal et al., 2007; Ranera et al., 2012; Esteves et al., 2017), médula ósea (BM-MS) (Frisbie y Smith, 2010; Eslaminejad et al., 2009) cordón umbilical (UCT-MS), sangre de cordón umbilical (CB-MS), células derivadas de fluido amniótico (AMC) (Iacono et al., 2012; Lange-Consiglio et al., 2011; Coli et al., 2011) y tejido endometrial (ET-MS) (Cabezas et al., 2017, Navarrete et al., 2020), entre otros.

El endometrio humano es un tejido altamente dinámico, que sufre aproximadamente 400 ciclos menstruales durante el ciclo de vida femenino. El nivel de regeneración de este tejido solo es comparable con otros que poseen una alta tasa de recambio celular, tales como la epidermis, epitelio intestinal y médula ósea. Los primeros estudios que han contribuido al conocimiento reciente de las células madre derivadas de endometrio han sido publicados recientemente (Mutlu et al., 2015).

En el año 2004 un grupo de investigación logró identificar y caracterizar por primera vez células madre en el tejido endometrial (Chan et al., 2004; Taylor, 2004). Este estudio demostró que el 0.22% del epitelio endometrial y el 1.25% de las células estromales endometriales exhibían clonogenicidad, sugiriendo la presencia de células madre progenitoras en el endometrio humano (Chan et al., 2004).

Estudios recientes, en MSCs derivadas de endometrio o fluido menstrual en humanos, demostraron que estas poseían una mejor capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia linajes mesodermales, siendo utilizadas con éxito en ensayos clínicos, para tratamientos de infarto al miocardio sin efectos negativos en los pacientes (Bockeria et al., 2013). También se ha detectado en ratones la presencia de poblaciones de células madre en tejido epitelial y estromal tanto en endometrio (Schwab et al., 2005; Gargett, 2007), como en el oviducto (cercano a la región ampular) (Wang et al., 2012). Esta evidencia sugiere el rol potencial que este tipo de células podrían tener, atención que hasta ahora estaba centrada en el tejido adiposo como principal fuente de MSCs (Faezeh et al., 2015).

A partir de los datos expuestos anteriormente existe gran evidencia de la presencia de MSCs en el endometrio de mujeres, ratonas, cerdas y vacas y yeguas (Gargett 2007; Chan et al., 2004; Miernik y Karasinski, 2012; Cabezas et al., 2014, 2017. Navarrete et al., 2020), lo que sugiere un gran desafío considerando el potencial uso en terapias alogénicas utilizando células madre,

basados en su baja inmunogenicidad y potencial inmunosupresor asociado además a los procesos regenerativos (Ryan et al., 2005, Mutlu et al., 2015).

La medicina regenerativa requiere de una fuente exógena de células. Sin embargo, la mayoría de los tejidos tienen una sub población de células precursoras que son usadas para la repoblación de células perdidas, ya sea por su proceso natural o como consecuencia de la reparación de una lesión. Muchos son los ejemplos de células precursoras que exhiben multipotencia, como lo son las células de cerebro (Jiang et al., 2002), cartílago (da Silva Meirelles et al., 2006; Barbero et al., 2003), hueso trabecular (Nöth et al., 2002), placenta (Yen et al., 2005), hígado, pulmones, bazo, timo (da Silva Meirelles et al., 2006), páncreas (da Silva Meirelles et al., 2006, Hu et al., 2003) entre otros.

Actualmente, el foco de interés en el campo veterinario está centrado en el uso de MSC para daños ortopédicos y en términos de investigación para el desarrollo de tecnologías de uso clínico, dentro de las cuales destacan las realizadas en equinos. Las MSC han sido utilizadas en estudios de enfermedad cardiaca en perros, sin embargo, estos han sido principalmente como un modelo para trastornos cardiacos en humanos (Memon et al., 2005).

Dentro del campo ortopédico equino, las MSCs han sido usadas experimentalmente en un limitado número de casos clínicos, para el tratamiento quirúrgico de quistes de hueso subcondral, reparación de fracturas óseas (Kraus y Kirker-Head, 2006) y reparación de cartílagos (Brehm et al., 2006; Wilke et al.,

2007), sin embargo, el uso más frecuente ha sido en el tratamiento de lesiones inducidas por sobre esfuerzo, tales como lesiones en el tendón flexor digital superficial (Smith et al., 2003; Nixon et al., 2008; De Mattos Carvalho et al., 2013; Godwin et al., 2012) laminitis (Morrison et al., 2014), osteoartritis (Nicpoñ et al., 2013) y en menor medida en tratamientos de lesiones reproductivas (Mambelli et al., 2013; Falomo et al., 2015).

En lo referente a las lesiones reproductivas en yeguas, los estudios se han centrado en el tratamiento de endometrosis. Mambelli et al., (2013) infundió células derivadas de médula ósea, marcadas con fluoróforos transcervicalmente en el útero de yeguas con endometrosis, las cuales fueron detectadas hasta una semana post administración, sin embargo, no fue posible la detección posterior debido al parecer al carácter degenerativo de la lesión. No existen hoy en día estudios suficientes y adecuadamente controlados que permitan tener una comprensión más profunda de la posibilidad de regenerar endometrio en yeguas con MSCs, situación que también es válida para la medicina regenerativa en lesiones de tendones, ligamentos y articulaciones en equinos (Berry-Miller, 2012).

### **5.1 Mecanismo de acción propuesto para las MSCs.**

Los mecanismos de reparación y defensa ante una injuria han evolucionado hacia respuestas de carácter rápido y eficiente. Sin embargo, estos mecanismos muchas veces se ven alterados, provocando eventos indeseables tales como

enfermedades autoinmunes o la generación de cicatrices queloides, mediante reacciones inflamatorias vinculadas a mecanismos de regeneración (Li y Fu, 2012). Ante esta situación dual, en donde participa el control inmunológico y la regeneración del sitio dañado, se ha propuesto a las MSCs, controlando ambos eventos de manera coordinada (Iyer y Rojas, 2008; Holmes, 2010). Esta situación, si bien es cierto se da todo el tiempo en embriones y neonatos, en individuos adultos al parecer no existe suficiente capacidad de actuar en el momento correcto, teniendo que muchas veces sufrir las consecuencias anteriormente descritas.

Las MSC ejercen su acción mediante mecanismos diferentes, aún no claramente definidos, que incluyen la secreción de una gran cantidad de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, otros mediadores no proteicos comoIDO, INOS, PGE2 y también citoquinas (IL-1RA, IL-10) (Perrini, et al., 2016; Branly, et al., 2018), promoviendo la regeneración de la lesión, a través de 4 mecanismos tróficos fundamentales 1: deteniendo la formación de tejido cicatrizal, 2: inhibiendo la apoptosis celular producto de la isquemia provocada por el daño vascular, 3: estimulando la formación y estabilización de nuevos vasos sanguíneos, y por último 4: secretando factores tróficos, que causan la replicación de tejido intrínseco (Caplan y Dennis, 2006, Lin et al., 2014, Caplan y Correa, 2011, Sorrell et al., 2009).

Evidencias recientes indican que las VE secretadas por las MSCs, desencadenarían respuestas específicas en las células blanco a través de 3 mecanismos principales, 1: Activando vías de señalización de la célula diana (sin fusión de membrana), mediante moléculas de adhesión de elevada especificidad y los receptores presentes en la superficie de la célula diana (Clayton et al., 2004), 2: Incorporando su contenido mediante endocitosis en las células diana y procesamiento de su contenido en el compartimento endosomal (Fevrier y Raposo, 2004), y 3: Transfiriendo tanto proteínas y moléculas de señalización, como ARNm y miARN mediante la fusión de la membrana (Mittelbrunn et al., 2011).

Los miARN son pequeños ARN de alrededor de 22 nucleótidos que no codifican para proteína. Estas pequeñas moléculas de ARN están codificadas en el genoma celular y son transcritas a ARN en el núcleo, dando lugar a los llamados pre-microARN, los cuales son procesados y exportados al citoplasma donde, ya como miARN maduros, realizan su función. Los miARN regulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante unión con la región 3' UTR del ARNm de sus genes diana. Es decir, los miARN pueden disminuir la expresión de determinadas proteínas, aquellas con las que existe cierta complementariedad en unas regiones específicas de su secuencia. Para ello, los miARN maduros se integran en una compleja maquinaria llamada RISC (RNA induced silencing complex) - Dicer, guiándola hacia las secuencias de ARNm diana, e induciendo su degradación o inhibiendo la traducción a proteína (Díaz et al., 2016).

El hecho de que se encontraran miARN en sangre, unido a su alta estabilidad en este fluido y que fueran relativamente sencillos de cuantificar mediante técnicas de biología molecular tan extendidas como la qRT-PCR, ha supuesto un hito en la búsqueda de biomarcadores de diferentes tipos de enfermedad. Actualmente los miARN son unos de los nuevos biomarcadores con mayor potencial para su implementación clínica en un futuro próximo (Devaux et al., 2013; Sayed et al., 2014).

Una de las características de los miARN que los hacen tan interesantes es la posibilidad de modificar de forma muy específica su expresión, lo que los hace una prometedora herramienta terapéutica. Numerosos modelos preclínicos han mostrado que la sobreexpresión o la inhibición de miARN pueden alterar las respuestas patológicas en las enfermedades cardiovasculares (Condorelli et al., 2014).

Lo anteriormente señalado considera que el mecanismo de acción propuesto para las MSCs posee muchas implicancias, capaces de influenciar tanto las respuestas innatas como adaptativas, ejecutando acciones antiinflamatorias y regenerativas (Bernardo y Fibbe, 2013).

Existe evidencia, basada en modelos murinos de injuria, que demuestran que MSCs alogénicas, con posterioridad a la administración sistemática, son capaces de anidarse e injertarse en el sitio del daño (Ortiz et al., 2003). En este sentido, las MSCs son capaces de suprimir la proliferación de células B (Corcione et al.,

2006) y células natural killer (NK) (Sotiropoulou et al., 2006), mejorando la respuesta inmune aguda a la injuria. Al atenuar la función de estos tipos celulares, las MSCs, probablemente, reducirían la respuesta profibrótica que ocurriría en caso de una exposición prolongada de la inflamación durante el proceso regenerativo (Redd et al., 2004).

El ambiente inflamatorio activa las MSCs para iniciar su función inmunomoduladora, incluyendo un incremento en la actividad de COX-2 y una sobreexpresión de PGE2 (Németh et al., 2009), con efectos regulatorios sobre la fibrosis en el sitio dañado. La expresión de PGE2 promueve, además, un efecto fibro-regulatorio indirecto, interactuando con células del sistema inmune que residen en el sitio del daño. En respuesta a PGE2, células T y macrófagos (Németh et al., 2009) son reprogramados, derivando en una mayor expresión de IL-10, una importante citoquina antiinflamatoria, con múltiples funciones que limitan o atenúan el mecanismo inflamatorio de células inmune (Moore et al., 2001) como por ejemplo, inhibiendo la migración de PMNs al sitio de la injuria, previniendo el daño tisular oxidativo posterior a la liberación de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Sato et al., 1999). IL-10 también tiene un efecto directo sobre la fibrosis, regulando positivamente la expresión de TGF- $\beta$ 1 en macrófagos y células T, además promueve la reprogramación de los fibroblastos presentes en el sitio de la injuria, favoreciendo la remodelación de la matriz extracelular, regulando positivamente la expresión de matriz de

metaloproteinasas (MMPs) y regulando negativamente la síntesis de colágeno (Reitamo et al., 1994).

Esta citoquina también previene el exceso de depósito de colágeno, atenuando la expresión de citoquinas pro inflamatorias tales como IL-6 e IL-8 (Liechty et al., 2000). Como resultado de estos mecanismos, la expresión de IL-10 contribuye a la resolución del estado inflamatorio, acelerando el estado de proliferación tisular (Peranteau et al., 2008).

El proceso inflamatorio sirve como respuesta protectora de carácter sistémico o localizado, producto de una infección, injuria o destrucción tisular, además sirve para eliminar patógenos y preservar la integridad del huésped. Horas posteriores al comienzo de la inflamación, moléculas expresadas por patógenos o asociadas a la injuria tisular son reconocidas por receptores tipo Toll (TLR) presentes sobre células efectoras innatas. La unión a TLR gatilla la fagocitosis y la liberación de mediadores inflamatorios, los cuales iniciarían una respuesta inmune innata, proporcionando la primera línea de defensa de carácter inespecífica, principalmente a través de la activación de células fagocíticas, incluyendo macrófagos y neutrófilos (Gordon y Mantovani, 2011). La unión a TLR no solo activa a células fagocíticas, sino que también a las MSCs creando un ambiente inflamatorio (Mantovani et al., 2013).

Bajo condiciones de cultivo hipóxicas, la estimulación de las MSCs con citoquinas pro inflamatorias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-1 $\beta$  regula positivamente la expresión de un

subgrupo de TLRs, los cuales incrementan la sensibilidad de las MSCs al medio inflamatorio (Raicevic et al., 2010). Sin embargo, la estimulación prolongada causa una regulación negativa de TLR-2 y TLR-4 (Mo et al., 2008), al parecer como un mecanismo de auto regulación que previene la sobrerreacción del sistema inmune.

Para desarrollar una correcta respuesta inmune ante alguna injuria los distintos TLR son activados por moléculas específicas, sean estas endógenas o asociadas a patógenos, dentro de las que se incluyen LPS provenientes de bacterias Gram negativas (TLR-4) o ARN de doble cadena (dsARN) proveniente de algunos virus (TLR-3) (Bernardo y Fibbe, 2013).

Waterman et al., (2010) han sugerido que MSCs pueden polarizarse hacia dos fenotipos activos distintos tras la estimulación de TLR específicos, resultando en efectos moduladores y secretómicos diferentes del sistema inmune. La estimulación de TLR-4, exhibe un fenotipo pro inflamatorio (MSC-1), mientras que la estimulación de TLR-3, exhibiría un fenotipo antiinflamatorio (MSC-2). Aunque las vías de señalización moleculares, que promueven una secretómica pro o anti inflamatoria tras la unión TLR permanecen poco claras, el concepto de polarización hacia estos dos fenotipos, proporciona un atractivo modelo para explicar la interrogante y aparentemente contradictorio rol de MSCs en los procesos inflamatorios.

Dentro del sistema inmune, está bien establecido que los macrófagos juegan un rol importante iniciando y controlando la inflamación (Mantovani et al., 2013), y las MSCs, pueden influenciar la función de los macrófagos dependiendo del contexto inflamatorio. Los monocitos llegan al ambiente inflamatorio y pueden desarrollarse hacia macrófagos M1 activados, o convertirse a una variedad alternativa de macrófagos M2, dependiendo de las señales micro ambientales (Bernardo y Fibbe, 2013).

Mientras que M1 estimula la inflamación local liberando citoquinas pro-inflamatorias, los macrófagos M2 secretan una combinación de citoquinas (incluyendo altos niveles de IL-10 y TGF- $\beta$ 1 y bajos niveles de IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ ) ejerciendo un efecto antiinflamatorio, permitiendo la regeneración tisular posterior a la inflamación (Mantovani et al., 2013).

En resumen, la polarización tanto de MSCs como de macrófagos, proporciona mecanismos suplementarios en la mantención del balance entre los efectos pro o antiinflamatorios. Estos cambios, se basan en la producción de mediadores solubles, incluyendo los factores inmunosupresores como iNOS (en ratones) e indolamina 2,3 dioxygenasa IDO (para humanos), los cuales son inducidos por citoquinas pro inflamatorias. La concentración de estos factores podría ser crucial en gatillar el cambio entre MSCs pro y antiinflamatorias y por lo tanto también entre macrófagos M1 y M2 (Ren et al., 2008).

Tal como en la inmunidad innata, mucho de lo que se conoce hasta ahora, acerca de la interacción de las MSCs y el sistema inmune adaptativo, es a través de estudios *in vitro*, en donde las MSCs son capaces de suprimir la proliferación de linfocitos T a través de la secreción de factores solubles, tales como TGF- $\beta$ , factor de crecimiento hepatocítico (HGF), PGE2,IDO, NO, y hemoxigenasa (HO) (Stagg y Galipeau, 2013). La liberación de estos factores supresores aumenta tras la estimulación de MSCs con TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

Varios estudios han documentado la habilidad que poseen las MSCs para polarizar células T hacia un fenotipo regulatorio (T-regs) (Burr et al., 2013), mecanismo por el cual las MSCs disminuirían la inflamación. Los linfocitos T-reg son una subpoblación de linfocitos T CD4+, que suprimen activamente las respuestas inmunes patológicas y fisiológicas y, por lo tanto, contribuyen a la mantención de la tolerancia inmunológica y a la homeostasis inmune (Yamaguchi et al., 2011) Todos estos estudios indican, que las MSCs son capaces balancear entre el efecto inflamatorio de las células T y el efecto antiinflamatorio de T-regs. Este proceso también se vincula fuertemente con la polarización de monocitos hacia macrófagos M2 antiinflamatorios (Bernardo y Fibbe, 2013).

La angiogénesis es uno de los procesos críticos dentro de la reparación tisular. Las células mesenquimales contribuyen a la angiogénesis a través de la liberación de varios factores tróficos, tales como la adenosina (Adair, 2005). El rol pro-angiogénico de la adenosina es mediado en parte, por la activación de las

MSCs y de células endoteliales. Ambos tipos celulares expresan receptores para adenosina A2B, los cuales son importantes en la respuesta angiogénica. Esta acción resulta en el incremento de producción de moléculas pro angiogénicas tales como VEGF. (Adair, 2005).

La generación de vasos sanguíneos ocurre por mecanismos diferentes, incluyendo la vasculogénesis (formación *de novo* de vasos sanguíneos a partir de precursores endoteliales o angioblastos), angiogénesis (por brotes de vasos existentes o angiogénesis por intususcepción) y arteriogénesis (crecimiento de vasos colaterales al sitio de la injuria (van Royen et al., 2009; Potente et al., 2011).

Se ha demostrado, que tanto MSCs como células mieloides, son capaces de aumentar la formación *de novo* de una red vascular estable, a través de células formadoras de colonias en modelos *in vitro* e *in vivo* de vasculogénesis (Watt et al., 2013).

Se piensa que la arterogénesis es iniciada por la activación de células endoteliales en la pared vascular tras un evento estresante, con el subsiguiente reclutamiento y adhesión celular, remodelamiento de la pared vascular tras la liberación de proteasas y proliferación celular. Se ha reportado que las MSCs estimularían este proceso tras la liberación de factores angiogénicos y proteasas (Watt et al., 2013). Finalmente, la angiogénesis mediante brote, que ocurre en respuesta a una isquemia e hipoxia, está caracterizada por la degradación de la

matriz extracelular y la separación de células murales (pericitos o células tipo MSC) de los microvasos y capilares (<100 µm de diámetro). Esto permite que las células endoteliales invadan, a través de filopodios y lamelipodios en respuesta a una señal, mientras que las células madre que se encuentran adyacentes proliferan, se extienden los vasos y forman la matriz extracelular, uniones y lúmenes (Carmeliet y Jain, 2011, Potente et al., 2011).

Si bien es cierto que las MSCs son las mismas en cada tejido, cada una de ellas refleja la evolución a la cual fue sometida en dependencia del tejido al que pertenece y a la función de este, es por este motivo que los resultados en términos de inmunomodulación y capacidad regenerativa de las MSCs son diferentes, en dependencia de la localización de la lesión y del tejido al cual corresponda. De este modo, las MSCs en dependencia de donde están localizadas producirían agentes bioactivos, que actúan en función del tejido específico en el que se encuentran, modulando el sistema inmune (Bernardo y Fibbe, 2013) y estimulando la regeneración del tejido dañado. Esta situación se vuelve más interesante cuando estas MSCs son trasplantadas en sitios diferentes al de origen, en donde estas lograrían adaptarse, manteniendo de alguna forma las características del tejido de origen y adoptando la señalización del nuevo tejido, detectando su entorno y funcionando correctamente.

Cuando la edad, genética u otro factor priva al sitio dañado de una dosis terapéutica endógena de MSCs, la entrega de MSCs exógenas mediante la

administración alogénica o autóloga, proporcionaría una barrera y actividad trófica adecuada para aumentar la regeneración tisular mediada por el huésped. Tal regeneración sería local y por lo tanto tejido específica (Caplan y Sorrell, 2015).

Todo lo planteado hasta ahora, tiene por objetivo tratar de comprender más en profundidad la relación que poseen las MSCs con este nuevo concepto planteado, en donde se les asigna un rol de células señalizadoras con funciones terapéuticas. A la luz de los hechos, los distintos mecanismos de acción demostrados para las MSCs en esta área demuestran no solo la versatilidad que poseen, sino que también el largo campo que existe por estudiar y comprender, en áreas tales como: modulación de la respuesta inmune, homeostasis del proceso inflamatorio, reparación tisular, entre muchas otras. De este modo, como resultado de este trabajo, no solo se avanzará en establecer nuevos conceptos en la definición semántica de estas células, sino que también se generarán espacios de conocimiento en post de desarrollo de herramientas de uso terapéutico, basadas en las células o sus productos.

Varias son las cuestiones biológicas que necesitan ser resueltas antes de que las terapias con MSCs alcancen aplicaciones clínicas en caballos, especialmente las que tienen que ver con patologías endometriales, éstas incluyen: 1) Identificación de fuentes fiables y renovables de células madre mesenquimales, 2) Aislamiento adecuado de subpoblaciones bioactivas, 3) Expansión *ex vivo* de células sin

pérdida de la multipotencia, 4) Caracterización funcional y molecular de las células aisladas y 5) Evaluar el potencial de migración de las células, así como su anidamiento *in vivo*.

Se propone abordar los problemas descritos anteriormente, con ensayos que incluyen la manipulación *in vitro* e *in vivo* de las células. Para los procedimientos *in vitro*, en primer lugar, se compararán las principales propiedades biológicas de las células mesenquimales estromales obtenidas, a partir de dos orígenes tisulares: grasa subcutánea y tejido endometrial, de los mismos donantes, utilizando tres hembras equinas jóvenes, y clínicamente sanas. El objetivo es minimizar el efecto del donante sobre las características de las células y evitar el sesgo causado por heterogeneidad normal.

En segundo lugar, se estudiará la expresión masiva de genes y proteínas, mediante ensayos de ómicas y herramientas bioinformáticas, que buscará determinar el perfil transcriptómico de estas células, así como del análisis de miARN presentes en las VE secretadas al espacio extracelular. Este enfoque debería producir como resultado, la primera caracterización estricta de las propiedades fenotípicas / secretoras de dos fuentes diferentes de MSC obtenidas partir de un mismo donante.

Luego de completar los ensayos *in vitro* de la investigación, tras la generación experimental de un modelo *in vivo* de PMIE en yeguas vírgenes, se pretenderá establecer la línea base de expresión genes y de proteínas marcadoras de la

inflamación uterina antes y después de PMIE, y finalmente será evaluado el efecto de inocular MSCs activas de dos orígenes en la modulación de la inflamación y la capacidad de anidamiento de estas.

Aún faltan estudios que comparen MSCs del mismo donante derivadas de tejido adiposo, endometrio u otras fuentes usando procedimientos idénticos. La razón para usar las células endometriales surge de la hipótesis de que los factores que secretan las MSC probablemente activarán nichos de células madre locales y estas células llevarán a cabo el proceso de reparación y regeneración, probablemente en conjunción con las células exógenas alojadas.

Lo anterior permitirá desarrollar mejores procesos biotecnológicos para la obtención, expansión y uso de MSCs equinas en el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades inflamatorias y degenerativas, que afectan a la productividad y calidad de vida tanto de los caballos como de los propietarios.

### III. HIPÓTESIS

La fuente de origen (tejido adiposo o endometrial) de las células madre mesenquimales influirá en las características biológicas y moleculares *in vitro* y su capacidad para atenuar *in vivo* la inflamación, en un modelo animal equino asociada con PMIE.

### IV. OBJETIVOS

#### Objetivo general.

Comparar el efecto de dos fuentes diferentes de células madre mesenquimales obtenidas a partir del mismo donante sobre sus principales características biológicas *in vitro* y sus propiedades anti inflamatorias *in vivo* en yeguas con PMIE.

#### Objetivos específicos.

1. Caracterizar fenotípica y funcionalmente *in vitro* células madre mesenquimales putativas adiposas (AT-MSCs) y endometriales (ET-MSCs), definiendo el patrón de expresión de marcadores de superficie, capacidad de diferenciación hacia linajes mesodermales y el potencial de migración.

2. Analizar y comparar las diferencias a nivel transcriptómico celular y en la carga de miARNs encerrados en vesículas extracelulares (VE) secretadas de muestras de MSC derivadas de los mismos donantes.
3. Evaluar un modelo *in vivo* de inflamación endometrial, mediante la cuantificación de marcadores inflamatorios en el endometrio de yeguas sanas, antes y después de la inoculación intrauterina de AT-MSCs y ET-MSCs y evaluar el potencial anidamiento de estas células *in vivo* en un modelo equino de endometritis inducida.



## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Objetivo específico 1.**

Caracterización fenotípica y funcional *in vitro* de células madre mesenquimales putativas adiposas (AT-MSCs) y endometriales (ET-MSCs).

#### **1.1 Obtención de la muestra.**

Para este estudio se utilizaron tres yeguas sanas adultas del mismo genotipo (Criollo) y edad (3 años) las que fueron muestreadas de dos formas: 1) mediante una biopsia endometrial y 2) mediante un procedimiento quirúrgico sencillo en la base de la cola, sobre la región glútea, para obtener grasa subcutánea de acuerdo con el procedimiento descrito por Castro et al., (2014). Todos los procedimientos fueron realizados durante la estación reproductiva, registrando las características ginecológicas de todas las donantes, descartando alguna condición patológica preexistente como signos de inflamación o la presencia de quistes uterinos u ováricos.

#### **1.2 Aislamiento, expansión y criopreservación celular.**

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de Sigma- Aldrich®, (St Louis, MO, USA) y/o Gibco®, (Grand Island, NY, USA), a no ser que se explicito lo contrario.

Para las biopsias endometriales: La muestra de tejido fue tomada desde la parte dorso medial del cuerno uterino, utilizando una pinza de biopsia de 3/8 pulgadas de diámetro (EquiBov, Campbellville, Ontario, Canadá) siguiendo el procedimiento descrito por Kenney R; (1978). La muestra de tejido fue suficiente para la obtención de un cultivo primario, sin comprometer la salud y bienestar del animal. Para tejido adiposo: Se obtuvo muestras de 15 gramos de grasa subcutánea, mediante cirugía, como fuente de putativas MSCs.

Común para ambas fuentes de células, el procedimiento de rutina de aislamiento de células madre mesenquimales fue el siguiente: tras su obtención, el tejido fue lavado con solución salina balanceada (EBSS®) más antibiótico y antimicótico posteriormente fue cortado en pequeños trozos de aproximadamente 1mm<sup>3</sup>, facilitando de esta manera la digestión enzimática posterior. Los fragmentos fueron depositados en tubos de 15 mL con medio Coleganasa tipo I (DMEM F-12 con 1mg/mL de colagenasa), e incubados a 37°C con agitación constante por 2 horas. Pasadas las 2 horas cada muestra fue homogenizada mediante pipeteo intenso, luego centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente (Heraeus Megafuge 16, Thermo Scientific, Alemania). El sobrenadante resultante fue depositado en placas de cultivos de 100 mm, en un medio DMEM/F12 (1:1) 1X con 30% suero fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato, 2 mM de L-glutamina, aminoácidos esenciales y no esenciales (100x/100ml, dilución final 1x) y antibióticos-antimicóticos (100x, dilución final 1x). Se incubaron a 39°C con atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> y humedad relativa de 95%, obteniéndose así el cultivo

primario de ambas fuentes. Una vez alcanzada entre un 80 a 90% de confluencia (fin del pase 0 -P0-) las células fueron separadas del plástico usando tripsina 1x y resembradas a 1000 células/cm<sup>2</sup> hasta alcanzar nuevamente confluencia (fin de pase 1 -P1-), por último, fueron mantenidas en criopreservación hasta su uso. Este último paso fue llevado a cabo retirando el medio de cultivo de las placas, por medio de una pipeta pasteur, para luego lavar con PBS (X3). Se agregó 1mL de tripsina 1x por cada placa de cultivo de 100 mm de diámetro (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) y se incubó por 4 minutos a 39°C. Posteriormente la acción enzimática fue detenida adicionando 5mL de medio de cultivo con 10% de SFB, en cada placa, y se agitó vigorosamente por pipeteo hasta homogenizar. Las células en suspensión fueron centrifugadas durante 10 minutos a 1000 rpm. Al finalizar la centrifugación, se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 0,5 mL de medio de criopreservación (10% DMSO) con una concentración de 2 millones de células, por ampula de congelación. Las ampulas se mantuvieron durante 3 días a -80°C, para luego almacenarlas a -196°C en nitrógeno líquido. Todos los experimentos fenotípicos y funcionales fueron realizados en P3.

### **1.3 Citometría de flujo.**

Las células obtenidas y expandidas fueron sometidas a citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores de superficie asociados con la troncalidad “stemness”. Los marcadores positivos evaluados fueron: CD90, CD44 y MHC tipo

I. Mientras que los marcadores negativos fueron: CD45 y MHC tipo II, siguiendo el protocolo adaptado de Menon et al., 2014. En la tabla 3 se muestra el listado de los anticuerpos usados y su especificidad.

**Tabla 3.** Lista de anticuerpos utilizados para la inmunotinción en la citometría de flujo. Fuente: Elaboración propia.

Anticuerpo	Especificidad	Tipo	Empresa
Mouse anti horse CD44: RPE	CD44	Monoclonal antibody	Bio-Rad
PE mouse anti human CD90	CD90	Monoclonal antibody	BD/Pharming
Mouse anti horse MHC class I monomorphic: RPE	MHC class I monomorphic	Monoclonal antibody	Bio-Rad
Mouse anti horse MCH class II monomorphic: RPE	MHC class II monomorphic	Monoclonal antobody	Bio-Rad
CD45 antibody, PE conjugate (EM-5)	CD45	Monoclonal antibody	Thermofisher

RPE= R-phycoerythrin; PE= phycoerythrin.

#### **1.4 Evaluación de la tri-potencia: diferenciación celular.**

AT-MSCs y ET-MSCs en P3 fueron sembradas en placas multi pocillos permitiéndoles alcanzar la confluencia, para luego cambiarlas a medio de diferenciación comercial para cada linaje según las instrucciones del fabricante (kit de diferenciación STEMPRO<sup>®</sup>; Gibco). Las células fueron diferenciadas hacia linajes osteogénico, condrogénico utilizando el medio base Osteocyte/chondrocyte differentiation (STEMPRO<sup>®</sup> Gibco) y para la diferenciación adipogénica se utilizó el medio base Adipocyte differentiation (STEMPRO<sup>®</sup> Gibco). Estos medios base fueron suplementados con aditivos comerciales que son específicos para cada tipo de diferenciación: para osteogénesis (STEMPRO<sup>®</sup> Osteogenesis Supplement), condrogénesis (STEMPRO<sup>®</sup> Chondrogenesis Supplement) y adipogénesis (STEMPRO<sup>®</sup> Adipogenesis Supplement). Como control se utilizó células cultivadas en medio DMEM (low glucosa) mas 10% SFB durante el mismo periodo de tiempo que los grupos experimentales. Además, se empleó un control de células mesenquimales comercial derivadas de tejido adiposo humano con potencial de diferenciación, (STEMPRO<sup>®</sup> Human Adipose Derived Stem Cells, Invitrogen<sup>™</sup>).

A los 21 días, tras el período de diferenciación, las células fueron teñidas con una tinción apropiada para cada linaje:

Diferenciación osteogénica: Tinción con rojo de Alizarina: Se lavaron las células (2X) con PBS al 1% y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% por 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 mL de rojo de alizarina al 2%, pH 4,1-4,3, a cada placa, incubándose por 20 minutos con agitación. Luego se lavó con 1 mL de PBS al 1% por 5 minutos con agitación sutil, repitiendo 4 veces este procedimiento. Se retiró el exceso y se evaluó al microscopio invertido en busca de cristales de hidroxapatita.

Diferenciación condrogénica: Tinción con azul de Alcían: Las células fueron lavadas (2X) veces con PBS al 1% y luego fijadas con etanol al 100% por 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 mL de Azul de Alcían al 0,02%, pH 1, a cada placa, incubándolas por 3 horas con agitación. Luego se lavó con 1 mL de etanol al 100% por 5 minutos con agitación, repitiendo 3 veces el procedimiento. Se retiró el exceso y se aclaró con glicerol al 80% para luego evaluarlas al microscopio invertido en busca de glicosaminoglicanos (GAG) ácidos.

Diferenciación adipogénica: Tinción con Oil Red: las células fueron lavadas (2X) con PBS al 1% y luego fijadas 10% formaldehído por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego las células fueron teñidas con la solución Oil Red por 20 minutos en agitación sutil. Se lavaron las células (3X) con 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada o PBS para eliminar el exceso de colorante. Finalmente se aclaró con glicerol al 80% para luego evaluarlas al microscopio invertido en busca de depósitos de ácidos

grasos intracitoplasmáticos. Todos los experimentos de tinciones fueron realizados en triplicado, a partir de 3 réplicas biológicas.

### **1.5 Ensayos de migración *in vitro*.**

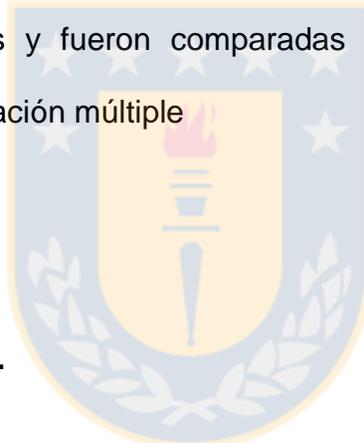
Para esto, líneas celulares de ambos orígenes fueron comparadas. Este ensayo consistió en poner dentro de una placa con doble cámara un inserto plástico cuyo fondo contiene una membrana de policarbonato con un poro de 8- $\mu$ M (Transwell inserts 3422, Corning, Cambridge, MA; USA). La parte superior de la cámara se cubrió con gelatina al 0.1% (Sigma Aldrich) y se sembró  $2 \times 10^4$  células/200 $\mu$ L en ella.

Células de ambas fuentes, se incubaron por 2 horas a 39°C en atmósfera de 100% humedad y 5% CO<sub>2</sub>. Se incluyó posteriormente, en la parte inferior de la cámara 500 $\mu$ L de medio DMEM F12 enriquecido con la quimioquina “factor derivado de células estromales 1 $\alpha$ ” (SDF1 $\alpha$ ), a una concentración de 100ng/mL. Un segundo atractante fue evaluado, utilizando medio DMEM F12 enriquecido con PGE<sub>2</sub> a una concentración de 100ng/mL. Se consideró el uso de medio DMEM F12 solamente como control. A todos los grupos de células, se les permitió migrar por 24 hrs en dichas condiciones de cultivo.

Una vez transcurrido el tiempo de migración, las células que no migraron quedaron depositadas sobre la superficie de la membrana, las que fueron

eliminadas manualmente con un hisopo de algodón, mientras que las células que lograron migrar quedaron atrapadas en la membrana sin poder atravesarla. Estas células fueron fijadas con metanol al 70%, teñidas con 0.5% de Violeta Cristal en metanol al 20% por una hora, lavadas en agua y contadas al microscopio. Todos los experimentos fueron conducidos en tres líneas celulares de AT-MSCs y ET-MSC y en triplicado.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de células que migraron en las diferentes condiciones y fueron comparadas entre si utilizando un modelo estadístico de comparación múltiple



## **Objetivo específico 2.**

**Perfil transcriptómico de MSC equinas y perfil global de la expresión de miARN.**

### **2.1 Diseño experimental y códigos de muestra.**

Para este propósito, se cultivaron tres réplicas biológicas de cada tipo de MSC (endometriales y adiposas) y tres réplicas técnicas para cada experimento, totalizando 18 muestras (tabla 4) hasta alcanzar una confluencia del 80-90% y se

extrajo el ARN total. En un experimento paralelo, se recogieron los sobrenadantes de los cultivos y se purificaron VEs y se aisló su miARN. Tanto el ARN total de las células como el miARN de VE se sometieron a secuenciación de próxima generación (NGS) como servicio subcontratado a Norgen Biotek (Thorold, ON, Canadá).

**Tabla 4.** Nomenclatura resumida de muestras analizadas. Fuente: Elaboración propia.

Condición 1	Significado	Condición 2	Significado
(AT-MS) C1		(ET-MS) C2	
C1A1	Muestra biológica 1 (condición 1 del animal 1)	C2A1	Muestra biológica 1 (condición 2 del animal 1)
C1A2, C1A3	Muestra biológica (condición 1 del animal 2 y animal 3 respectivamente)	C2A2, C2A3	Muestra biológica (condición 2 del animal 2 y animal 3 respectivamente)
C1A1.1; C1A1.2 y C1A1.3	Réplicas técnicas 1 al 3 respectivamente de la muestra biológica 1	C2A1.1; C2A1.2 y C2A1.3	Réplicas técnicas 1 al 3 respectivamente de la muestra biológica 2

## **2.2 Análisis transcriptómico de ARN celulares.**

Extracción de ARN y construcción de la biblioteca: se aisló ARN utilizando el kit de aislamiento de ARN total EZNA (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EE. UU.) A partir de  $8 \times 10^6$  de células por muestra, la cuantificación y el control de calidad se midió utilizando el kit Agilent RNA Pico Chip. Todas las muestras de ARN se enviaron en hielo seco con servicio de mensajería urgente a Norgen Biotek para su secuenciación utilizando tecnología NGS. El ARNm se aisló utilizando el módulo de aislamiento magnético de ARNm NEBNext® Poly (A), posteriormente se fragmentó el ARNm y se sintetizó, reparó y ligó el ADNc utilizando el kit de preparación de biblioteca de ARN direccional NEBNext® Ultra™ II para Illumina. La preparación de la biblioteca y la secuenciación de ARNm y miARN fueron realizados por Norgen Biotek. Finalmente, las bibliotecas se secuenciaron usando la plataforma NextSeq500 usando el NextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75 ciclos), obteniendo lecturas individuales con 75 pares de bases de longitud. Todas las bibliotecas fueron secuenciadas en paralelo.

## **2.3 Alineaciones de lecturas y control de calidad.**

La calidad de las bibliotecas resultantes se analizó utilizando el programa FastQC (Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK), combinado con la plataforma VecScreen (NCBI, Bethesda MD, USA) para buscar contaminantes vectoriales y adaptadores remanentes, finalmente se usó el software RNA-QC-Chain

(Bioinformatics Group, Single-Cell Center, Qingdao, Chn) para identificar posibles lecturas con contaminación de ARNr procariótico. Las lecturas se recortaron y filtraron utilizando el software Trimmomatic (KBase, USA). Se aceptaron lecturas con un valor superior a 30 pthreads y 75 pb de longitud. Las lecturas se mapearon contra el genoma de referencia, Equu Cab 3.0 usando HISAT<sub>2</sub> (CCB, Johns Hopkins University, Baltimore MD, USA). La identificación y cuantificación de la transcripción se realizó usando el paquete StringTie (CCB, Johns Hopkins University, Baltimore MD, USA) usando la anotación Equu Cab 3.0.GTF y se expresó en lecturas por millón de kilobases (RPKM).

#### **2.4 Análisis de expresión diferencial.**

El análisis de expresión diferencial se realizó en la plataforma R utilizando el software Ballgown (Bioconductor, Roswell Park, Búfalo NY, USA). El valor  $q$  ( $q < 0.05$ ) se usó para la discriminación de genes diferencialmente expresados (DEG) y el valor umbral de Log<sub>2</sub> Fold Change  $< -1.5$  se estableció para los genes mayormente regulados negativamente en ET-MSc y Log<sub>2</sub> Fold Change  $> 1.5$  son para los genes mayormente regulados positivamente en ET-MSc en comparación a AT-MSc. Los resultados se trazaron usando Volcano plot, Heatmap y PCA en el paquete ggplot2 R (Tidyverse). El análisis de la vía de enriquecimiento se analizó usando el paquete ClusterProfiler R (Bioconductor,

Roswell Park, Búfalo NY, USA) de acuerdo con la base de datos KEGG, usando los genes diferencialmente expresados de ambos grupos ( $q < 0.05$ ).

## **2.5 Análisis cuantitativo de RT-qPCR para la validación del RNA-seq.**

Para validar los datos de ARN-seq, se analizó el perfil de expresión de genes seleccionados usando qRT-PCR. Para esto, se seleccionaron ocho genes expresados diferencialmente entre tipos de células. Se seleccionaron cuatro genes regulados positivamente (CX3CL1, HHIP, VAT1L y TRPA1) y cuatro genes regulados negativamente (HSPA6, SCARA5, EEF1A2 y KIF1A). Se tomaron 500 ng del mismo ARN purificado utilizado para ARN-Seq, se trató con 1U de ADNasa I libre de ARNasa, durante 30 minutos a 37°C para la digestión del ADN genómico (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en 10 uL de reacción. La enzima fue inactivada por calor en presencia de 1 µl de EDTA 25 mM a 65°C durante 10 minutos. El ARNm se convirtió en ADN complementario (ADNc) según las instrucciones del fabricante de una transcriptasa inversa comercial M-MLV (Invitrogen). Se utilizó el volumen total del tratamiento con DNasa I (11 µl) para una reacción final de 20 µl, que contiene 1 µl de cebadores aleatorios (3 µg/µl), 1 µl de 10 mM cada dNTP, 4 µl de first-strand buffer 5X, 2 uL de ditiotretitol 0.1 M, 1 ul de inhibidor de ribonucleasa recombinante RNaseOUT (40 unidades/ul) y 1 ul de 200-U/ul M-MLV RT. Los parámetros de ciclo fueron 25°C durante 10 minutos, 37°C durante 50 minutos y 70°C durante 15 minutos. Los ADNc producidos se diluyeron 1:4 en

80 µl de volumen final, se mantuvieron congelados a -20°C hasta su uso en experimentos de PCR. El análisis de expresión génica se realizó utilizando el método DDCt. Para qRT-PCR, se cargaron 2 µl de muestra como duplicados (réplicas técnicas) y el kit Hi-ROX SensiMix™ SYBR® (Bioline, Berlín, Alemania) en una reacción de volumen de 10 µl en un sistema de qPCR Mx3000P (Agilent, Santa Clara, CA, USA.). Los cebadores utilizados para cada gen se listan en la tabla 5. Para todos los análisis de qRT-PCR, se normalizó la reacción usando la media geométrica de tres genes constitutivos comunes (GUSB, ACTB y B2M).

El análisis estadístico de los valores de fold-change de qRT-PCR se realizó mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon. En todos los casos, se consideraron diferencias significativas si los valores de P eran inferiores a 0,05. Para el tamaño y concentración de VE, se utilizó la prueba t para muestras pareadas.

**Tabla 5.** Lista de cebadores utilizados para validación de RNA-seq mediante qRT-PCR. Fuente: Elaboración propia.

Número de acceso	Gen	Secuencia (5´- 3´)	Producto (pb)
XM_005608282.3	CX3CL1	F-GTCTGGTCCGCTATCAACGAAA R-ATGTTCCATGGCTTCCTGAACC	125

XM_001501985.6	HHIP	F-TTCCCCTGCTCTGCAAAGACTA	124
		R-AACCCGCCATCTTTCCTTGCAT	
XM_023637363.1	VAT1L	F-CTGAAACCACTGGGAACCTACA	124
		R-ACAGCTTGATGGGGTTCCT	
XM_001493464.3	TRPA1	F-TGACCTGCATGGAATGACTCCT	123
		R-TGCAAAGCAGTCCAGCCATTGT	
XM_001488139.6	HSPA6	F-GGTGGAGTGATGACCACGTT	100
		R-TCAGGACCCCAGATTGGTTG	
XM_014737808.2	SCARA5	F-TCAAGGACTGGGAGCATTCCAT	104
		R-AGGCTCGCCTTCCTTCCCTTTA	
XM_023626927.1	EEF1A2	F-AAGAACATGATCACCGGCACCT	100
		R-TCTGCCCGTTCTTGGAGATGC	
XM_023642765.1	KIF1A	F-GTGGAAAGTGGTATCAGTTCACG	119
		R-GGACAAACTGGAAGTGGACCTT	
NM_001081838.1	ACTB	F-GCTCCCAGCACGATGAAGAT	93
		R-GGTGGACAATGAGGCCAGAA	
XM_005598720.2	GUSB	F-TGATGTGGTCTGTGGCCAAT	100
		R-CGGGAAGGGTCCAAGTCTTT	
NM_001082502.3	B2M	F-CTACTCTCCCTGACTGGCCT	100
		R-AGTTCAGGAAATTTGGCTTTCCA	

## **2.6 Perfil transcriptómico de miARNs incluidos en VE.**

Para la secuenciación de miARN, tanto AT-MSC como ET-MSC se sembraron a  $1.5 \times 10^6$  en placas P60 como se describió anteriormente hasta alcanzar una confluencia del 50%, luego las monocapas se lavaron con PBS (3X) y se cambiaron a medio de cultivo suplementado con 10% SFB depletado de vesículas extracelulares. Después de 3 días, se recogió el medio de cultivo y se aislaron las vesículas extracelulares usando un protocolo de centrifugación diferencial. Los medios de cultivo se centrifugaron 10 minutos a 1000g para eliminar los restos celulares, los sobrenadantes resultantes se centrifugaron durante 10 minutos a 2000g, 30 minutos a 10.000g y finalmente se centrifugaron durante la noche a 100.000g. Los pellets resultantes fueron resuspendidos en PBS y mantenidos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis.

Caracterización de las VE: las VE aisladas de cada medio de cultivo fueron analizadas mediante la técnica de seguimiento de nanopartículas (NTA) en el equipo Nanosight NS300 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, WR, UK) equipado con cámara CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor), se midió la distribución del tamaño y la concentración de nanopartículas en suspensión líquida. El análisis gráfico (histograma) mostró la distribución del tamaño de las partículas de las nanopartículas y se informó como partículas por mililitro. Cada muestra se midió por triplicado.

Aislamiento de microARN, construcción de la biblioteca y secuenciación: se extrajo el ARN total de los VE usando el kit de purificación de ARN (Norgen Biotek) de acuerdo con el protocolo del fabricante, el volumen de elución final fue de 8 ul, se usaron 2ul para la cuantificación del ARN usando RiboGreen assay (Thermofisher, Waltham, MA, USA). Las muestras de ARN de concentración suficiente se sometieron a RT-qPCR para confirmar los miARN antes de someterlos a una secuenciación profunda de ARN. Se usaron ARNr Mir-21 y 5S como control de calidad de ARN, se usó 1ul en 5ul de reacción TruScript RT utilizando cebadores de ARNr Mir-21 y 5S. Todas las muestras de ARN se enviaron en hielo seco con servicio de mensajería urgente a Norgen Biotek para su secuenciación utilizando tecnología NGS. El control de calidad y la preparación de la biblioteca se prepararon usando el kit Norgen Biotek Small RNA Library prep y la secuenciación usando el kit NextSeq 500/550 High Output V2 en Illumina NextSeq 500.

Análisis bioinformático: el control de calidad, el ajuste de los adaptadores, la alineación del genoma y la cuantificación de miARN se realizaron utilizando la plataforma sRNAbench (Barturen, et al., 2014). Los datos basados en la alineación y la identificación de miARN fueron del genoma de caballo EquCab 3.0 y Mirbase versión 21 utilizando los archivos FastQ. El análisis de expresión diferencial se realizó usando el paquete EdgeR en la plataforma R usando un corte de filtración de CPM equivalente a un mínimo de 5 recuentos, y para evaluar la expresión diferencial, los recuentos sin procesar para cada miARN se

normalizaron primero usando el método de valores medios ponderados. La expresión diferencial se realizó ajustando el modelo lineal generalizado binomial negativo, con un valor de  $p < 0,05$ . Los resultados se visualizaron por Volcano plot usando el paquete ggplot2. Finalmente, el conjunto de miARN diferencialmente identificados se utilizó para el análisis de enriquecimiento de la ruta utilizando una herramienta en línea, mirPath 3.0 (Valchos, et al., 2015), y la predicción de las rutas KEGG se basó en algoritmos de Tarbase. El valor de significación estadística asociado con la ruta biológica se calculó mediante el software mirPath.

## **2.7 Inducción neurogénica de MSC**

La diferenciación neuronal se realizó como se describe Woodbury y colaboradores (2000), con modificaciones menores. Las células se cultivaron en DMEM F12 suplementada con 10% FCS hasta que alcanzaron una confluencia del 50%. Antes de la inducción, las células se cultivaron en DMEM F12 20%SFB y 10 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) durante 12 h. Después de esto, las células se lavaron con PBS (X2) y se transfirieron al medio de inducción neurogénica (NIM), que consiste en DMEM suplementado con: BHA 100  $\mu$ M, forskolina 10  $\mu$ M, DMSO al 2%, heparina 5 u/ml, K252a 5 nM, KCL 25mM, Ácido valproico 2 mM, suplemento 1x N2, bFGF 10 ng/ml, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) 10 ng/ml. El cultivo se mantuvo

durante 72 horas adicionales. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. A las 72 h post inducción, las células se fijaron y se tiñeron inmunológicamente con anti-tubulina III (Nº de catálogo MA5-16308-BTIN Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), anti CD68 (Nº de catálogo MA5-13324, Invitrogen). La reacción se reveló con un anticuerpo secundario (IgG de cabra anti-ratón) conjugado con HRP (Santa Cruz, Cat No sc-2318, dilución 1: 1000). Se usó un segundo conjunto de células de los mismos experimentos para RT-qPCR. Para esto, las células se lavaron en PBS frío, se lisaron *in situ* usando 1 ml / P60 de Trireagent (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) Y el ARN extraído con el kit de ARN total Omega Biotek. El ARN se transcribió inversamente como se describió anteriormente para la normalización de las bibliotecas y se realizó la PCR para MAP2, tubulina III y ACTB (Tabla 6).

**Tabla 6.** Lista de cebadores utilizados para validación de inducción neurogénica. Fuente: Elaboración propia.

Número de acceso	Gen	Secuencia (5´- 3´)	Producto (pb).
XM_008536984.1	MAP2	F-AAAGATCAACCTGCAGCCCT R-GCGTTTCTTCTTCTTCCGCC	118
XM_023637577.1	TUBIII	F-CTACCCGCAGCCGCC	103

		R-ATGACCTCCCAGAACTTGGC	
NM_001081838.1	ACTB	F-GCTCCCAGCACGATGAAGAT	93
		R-GGTGGACAATGAGGCCAGAA	
XM_005598720.2	GUSB	F-TGATGTGGTCTGTGGCCAAT	100
		R-CGGGAAGGGTCCAAGTCTTT	
NM_001082502.3	B2M	F-CTACTCTCCCTGACTGGCCT	100
		R-AGTTCAGGAAATTTGGCTTTCCA	

---

## 2.8 Inducción cardiomiogénica de MSC.

Células de ambas fuentes fueron sometidas a diferenciación cardiomiogénica, de acuerdo con el protocolo adaptado de Shi et al., 2016. Las células se cultivaron en DMEM F12 suplementada con 10% FCS hasta que alcanzaron una confluencia del 50%. Después de esto, las células se lavaron con PBS (X2) y sometidas al medio de inducción miogénica. El protocolo de inducción utilizado fue el siguiente: la monocapa de células se trató con 5  $\mu$ mol 5-AZA y 5ng/ml TGF- $\beta$  por 24 horas y luego se lavó con PBS (X2) y se mantuvo en medio de cultivo suplementado con 5 ng/ml TGF- $\beta$  durante 14 días. El medio fue reemplazado cada 2 días. El experimento fue realizado con tres muestras biológicas para cada tipo de células (AT-MS y ET-MS) en triplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de inducción las células fueron sometidas a RT-qPCR. Para esto, las células se lavaron en PBS frío, se lisaron *in situ* usando 1

ml / P60 de Triagent (Sigma Aldrich) Y el ARN extraído con el kit de ARN total Omega Biotek. El ARN se transcribió inversamente como se describió anteriormente para la normalización de las bibliotecas y se realizó la PCR para MEF2C, TNNT2, MYH6 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Lista de cebadores utilizados para validación de inducción cardiomiogénica. Fuente: Elaboración propia.

Número de acceso	Gen	Secuencia (5´- 3´)	Producto (pb)
XM_003362845.4	MEF2C	F-CACTGGTGCCAAAGAAGAGTTG R- CTGCATTCGTTCCCTGCACT	107
XM_023632429.1	TNNT2	F- GGCTATATCCAGAGGGCCGA R- TCATTCAGGTGGTCGATGGC	119
XM_023622391.1	MYH6	F-GTGACATCGGTGCCAAGCAAA R AGTGTCTGGCACTCGGATTTATTA	104
NM_001082502.3	B2M	F-CTACTCTCCCTGACTGGCCT RAGTTCAGGAAATTTGGCTTTCCA	100
NM_001081838.1	ACTB	F-GCTCCCAGCACGATGAAGAT R-GGTGGACAATGAGGCCAGAA	93

### **Objetivo específico 3.**

Evaluación un modelo *in vivo* de inflamación endometrial, antes y después de la inoculación intrauterina de AT-MSCs y ET-MSCs marcadas y el potencial anidamiento de estas células *in vivo*.

#### **3.1 Marcaje celular fluorescente.**

Las células de ambas fuentes (P3) se descongelaron y cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80 al 90% y se marcaron con nanocristales fluorescentes verdes utilizando Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Lifetechnologies, Santiago, Chile) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron durante tres minutos a 37°C usando 5, 10, 15 o 25  $\mu\text{M}$  del reactivo, que luego se lavó con PBS. La concentración óptima se determinó incubando las células con las concentraciones indicadas y los pases posteriores *in vitro*, hasta el pase 5. Después de cada pase se midió el marcaje por citometría de flujo y se evaluó la viabilidad mediante examen visual y método de exclusión con azul de tripano. La concentración que causó la menor muerte celular mientras se mantenía el marcaje verde se seleccionó para los experimentos *in vivo*. Para eso, las células se descongelaron, se peletizaron por centrifugación y se lavaron al menos dos veces con PBS. Después de esto, las células se resuspendieron en 10  $\mu\text{M}$  de Vybrant CFDA en 1ml de DMEM durante tres minutos, se lavaron nuevamente

dos veces, fueron peletizadas, y resuspendidas en solución salina y se mantuvieron refrigeradas hasta su infusión en yeguas.

### **3.2 Generación de PMIE.**

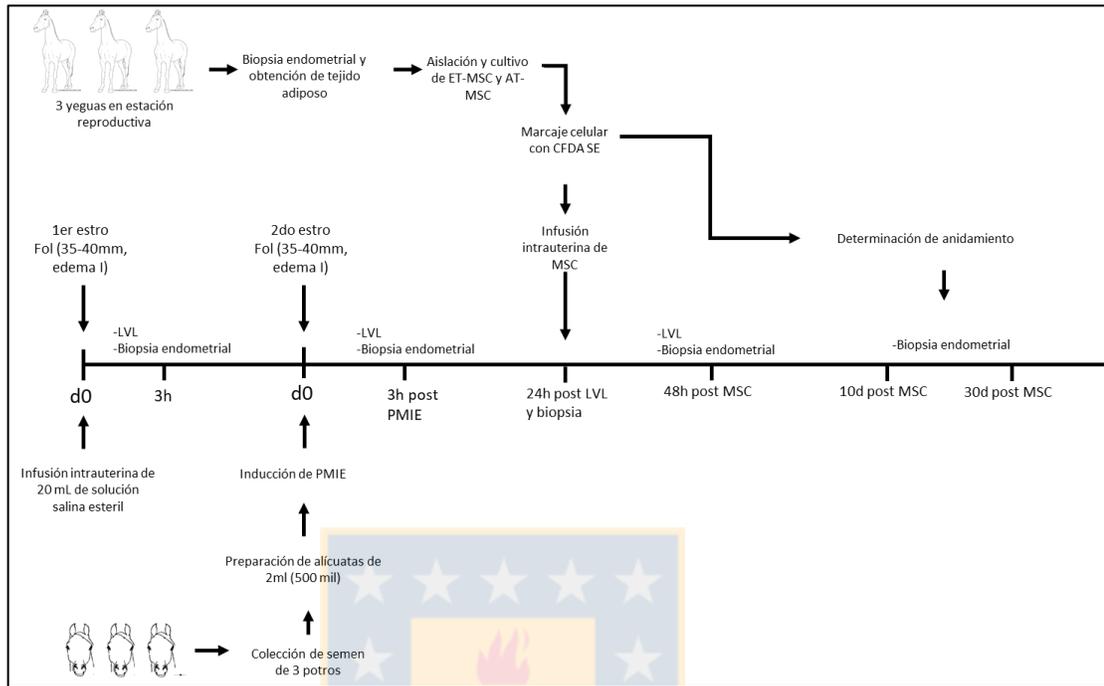
Para este procedimiento se utilizaron 6 yeguas sanas durante la estación reproductiva, de acuerdo con los protocolos descritos por Fumuso et al., 2003. Antes del experimento todas las yeguas fueron sometidas a un examen ginecológico que incluyó ultrasonografía para conocer el estado de salud reproductivo de las hembras (ausencia de líquido en el útero, bacteriología y citología negativa y grado I o IIa en la escala de Kenney para las biopsias uterinas), descartando aquellas que no cumplan con los criterios requeridos para el ensayo.

Los animales fueron tratados en tres fases descritas a continuación y representadas en la Figura 2.

Fase I: Una vez que se detectó el primer estro, todas las yeguas (n=9) recibieron una infusión intrauterina de 20 ml de solución salina estéril al 0,9%. Tres horas después, se realizó un lavado uterino de bajo volumen (LVL) recolectando el contenido. Posteriormente, se realizó una biopsia endometrial. El fluido y el tejido obtenido se procesaron para los análisis apropiados descritos más adelante.

Fase II: En el segundo estro, todas las yeguas (n=9) recibieron una infusión intrauterina de 500 millones de espermatozoides muertos. Para esto, se mezclaron 18 ml de solución salina estéril al 0,9% con 2 ml de PBS que contenía los espermatozoides, que habían sido eliminados previamente por repetidos ciclos de congelación y descongelación, según lo informado por Fumuso et al., 2003. Después de tres horas, la respuesta inflamatoria fue monitoreada por LVL y posterior biopsia endometrial.

Fase III: Las yeguas se asignaron en 3 grupos de 3 animales cada uno; un grupo de control de placebo y dos grupos tratados para células madre adiposas y endometriales, respectivamente. Veinticuatro horas después del LVL de la fase II, cada animal en los grupos tratados recibió una infusión intrauterina de 20 millones de AT-MSc alogénicos marcados con CFDA 10  $\mu$ M o la misma concentración de ET-MSc marcado en un volumen de 20 ml de solución salina estéril al 0,9%. La dosis de MSc para tratamientos se seleccionó en base a nuestro trabajo previo y según lo informado por Mambelli et al., (2014). El grupo de control recibió una infusión intrauterina de 20 ml de solución salina estéril al 0,9%. 78 horas después, se realizó un lavado uterino y una biopsia endometrial de todas las yeguas. En los días 10 y 30 después de la última biopsia, se repitieron las biopsias endometriales para evaluar la persistencia de la localización de las células en el tejido uterino.



**Figura 2.** Representación esquemática del protocolo utilizado para la inducción de PMIE e infusión intrauterina de MSC. Fuente: Elaboración propia.

### 3.3 Infusión intrauterina.

El procedimiento de administración intrauterina, tanto de la solución de espermatozoides muertos como de MSC, emuló la técnica de inseminación artificial, esencialmente como se describe en Mambelli et al., 2014. La pipeta de inseminación se pasó a través del cuello uterino hacia el útero. Con una jeringa de 20 ml conectada a la pipeta, el volumen total se infundió lentamente en el cuerpo uterino para distribuirse de manera homogénea. Después de eso, se

administraron aproximadamente 10 ml de aire de la jeringa unida para asegurar la inyección total del volumen contenido en la pipeta.

### **3.4. Lavados de bajo volumen (LVL) y biopsias endometriales.**

Para lavados y biopsias en las tres fases, se utilizaron los siguientes protocolos.

Lavados: el LVL se realizó usando un catéter estéril de colecta de embriones (CH 32, 90cm, Cat. No. 19009/0032, Minitub Chile Ltda, Santiago de Chile, Chile) conectado a una botella de 250 ml de solución salina estéril al 0,9%. El catéter se insertó transvaginalmente a través del cuello uterino. Una vez que se alcanzó el útero, se depositó todo el volumen y, mediante palpación transrectal, se masajeó el útero para que el contenido se distribuyera homogéneamente. La recolección se realizó en el mismo contenedor manteniendo un circuito cerrado. Los lavados se centrifugaron a baja velocidad (800g, por 10 minutos) para sedimentar las células y los desechos. El sobrenadante se aspiró y se usó en los ELISA y el sedimento se usó para la extracción de ARN y la determinación de la expresión génica. Los genes analizados fueron: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , COX-2 e IL-10. La expresión génica se evaluó mediante qRT-PCR utilizando el método ddCT como se describió anteriormente, con el conjunto de cebadores descritos en la tabla 8 y utilizando el grupo de yeguas control como calibrador de la PCR.

**Tabla 8.** Lista de cebadores utilizados para qRT-PCR tras inducción de PMIE.

Fuente: Elaboración propia.

Número de acceso	Gen	Secuencia (5'-3')	Producto (bp)
NM_001082500.2	IL-1a	F-GACTGTTTGTGAGTGCCCAA R-AAGAAGAGGAGGTTGGTCTCA	108
NM_001082496.2	IL-6	F-CCAAAGTCCTGGTCCAGATCC R-GTGAATGCAGCTTAGCCAGC	117
NM_001083951.2	IL-8	F-TTGGCCGTCTTCCTGCTTTC R-AAGGTTTGGAGTGCGTCTTGA	104
NM_001081775.2	COX-2	F-CCCTTCCTGCGAAATGCAGTTA R-GGATTCCCAGCTCTTATAGCCA	108
NM_001081819.2	TNF- $\alpha$	F-GCTGGAGAAGGGTGATCAAC R-TCACAGGGCAATGATCCCAA	100
NM_001082490.1	IL-10	F-TGCAAGGGTTTCTTCCGGA R-GCAAGGCATTTCTGAAACCG	110
NM_001081838.1	ACTB	F- GAAAATGGTGTGCACGGGAG R- GCTCCCAGCACGATGAAGAT	93
XM_001499329.3	TATA	F-GAAAATGGTGTGCACGGGAG R- TGGCTGGAAAACCCAACTTCT	95

Biopsias: las biopsias se tomaron como se describió anteriormente. En resumen, se extrajo una muestra de tejido de aproximadamente 2 cm x 0,5 cm del cuerpo uterino de las yeguas, usando unas pinzas de biopsia de 3/8 de pulgada de diámetro (EquiBov, Campbellville, Ontario, Canadá) cubiertas por una camisa sanitaria para evitar la posible contaminación, después del procedimiento descrito por Kenney en 1978. Cada muestra de biopsia de las fases I, II y la primera biopsia de la fase III (48h) se dividió en dos partes iguales: una para el recuento histológico (HE) y el conteo de PMN y la otra para inmunohistoquímica con anticuerpos apropiados (IL-6 y TNF- $\alpha$ ). En las biopsias del día 10 y 30 de los experimentos de búsqueda (fase III), solo se realizó un análisis confocal de las células marcadas con CDFA.

### **3.5 Conteo de PMN e inmunohistoquímica.**

Para histología e inmunohistoquímica, las biopsias uterinas fueron fijadas en paraformaldehído 4% p/v en PBS 1x (Merck) por 48 horas. Seguido, las muestras fueron procesadas en un procesador automático Citadel 1000 (Shandon) por 13 horas, bajo protocolos estandarizados del Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, y embebidos en parafina en un centro de inclusión modular (Microm AP280).

Las muestras de tejido embebidas en parafina fijadas en formaldehído (FFPE) fueron cortadas en un micrótopo Multicut 2045 (Leica) a 4  $\mu$ m y se tiñeron con

hematoxilina y eosina. Las secciones se analizaron bajo microscopía óptica (400X) para determinar la presencia de células inflamatorias en el tejido endometrial. El recuento manual de PMN se obtuvo promediando el número de células cuantificadas en 10 campos por muestra, por dos observadores ciegos independientes.

Las células positivas para IL-6 y TNF- $\alpha$  se detectaron en biopsias endometriales mediante la reacción de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) según Sternberger et al., (1997). Para lo anterior, se utilizó un anticuerpo policlonal primario para IL-6 (# ARC0062, Thermo Fisher) y un anticuerpo monoclonal primario para TNF- $\alpha$  (# 14-7321-81, Thermo Fisher). Las reacciones se revelaron con HRP-System LSAB® (Dako North America, Inc. Carpinteria, CA, EE. UU.).

### **3.6 Análisis de ELISA.**

A partir de los LVL el análisis de ELISA se realizó con el sistema Duoset específico para equinos (IL-6 y TNF- $\alpha$ ; DuoSet, R&D Systems Inc. Minneapolis, USA.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La lectura se realizó a 450-640 nm en un lector de microplacas, (Epoch; BioTek® Instruments Inc; Winnoski, Vermont, EE. UU.)

### **3.7 Análisis de fluorescencia a través de microscopía confocal.**

Las muestras de tejido endometrial obtenidas los días 10 y 30 post inoculación de MSCs marcadas, fueron procesadas como se indicó previamente y los cortes de 4  $\mu\text{m}$  embebidas en parafina fijadas en formaldehído (FFPE) fueron desparafinadas, hidratadas e incubadas en 1% PBS-Tween20 (Cell Marque) por 20 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron montadas con ProLong® Gold antifade reagent con DAPI (Invitrogen) y visualizadas en microscopio confocal LSM700 (Zeiss, Alemania), en el Centro de Microscopía Avanzada de la Universidad de Concepción, como un servicio pago. El FITC fue excitado por el láser de iones de argón a 488 nm, y la luz emitida se filtró a 505 nm.

### **3.8 Análisis estadístico.**

La cantidad de proteína y la expresión del gen inflamatorio, analizadas por ELISA y qPCR respectivamente, se evaluaron mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey después de demostrar la normalidad de la distribución de datos mediante la prueba de normalidad D'Agostino-Pearson en el análisis de varianza.

## VI. RESULTADOS.

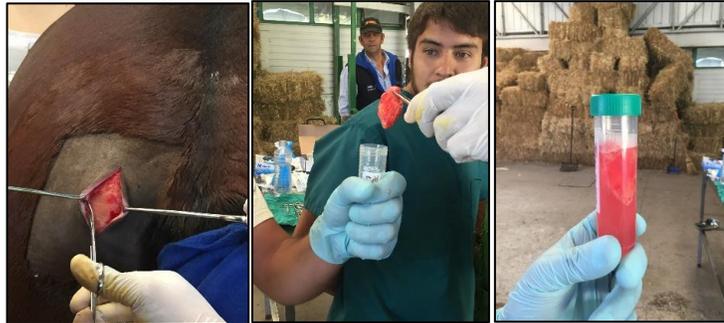
### 1. Aislamiento, expansión y caracterización fenotípica de MSCs equinas.

#### 1.1 Obtención de la muestra.

Mediante una biopsia endometrial y a través un procedimiento quirúrgico sencillo en la base de la cola sobre la región glútea, se logró obtener, a partir de un mismo animal, tejido de ambas fuentes. Figuras 3 y 4.



**Figura 3.** Procedimiento de biopsia endometrial. Fuente: Elaboración propia.

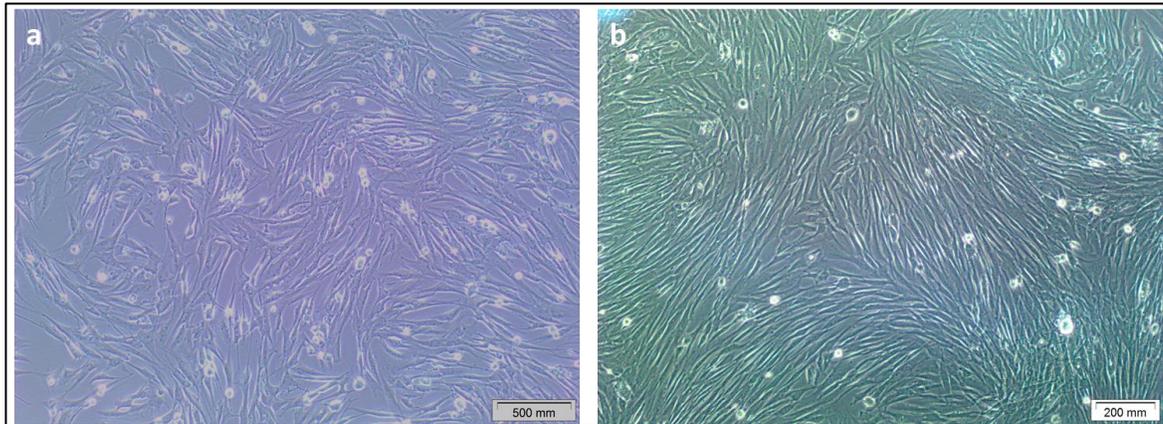


**Figura 4.** Procedimiento de obtención de grasa subcutánea. Fuente: Elaboración propia.

## **1.2 Aislamiento, expansión y criopreservación celular.**

Se obtuvieron cultivos celulares primarios de todas las muestras, tanto de tejido adiposo como de tejido endometrial, logrando establecer un 100% de cultivos primarios. No se observó diferencias en dependencia del tejido testeado a lo largo del procedimiento de aislamiento, expansión y criopreservación de los cultivos.

*In vitro*, la adhesión al plástico ocurrió rápidamente (aproximadamente 20 a 24 h después de la siembra). Las células aisladas mostraron un aspecto fibroblastoide, con un núcleo central y abundante citoplasma, que fue evidente 48 h después de la siembra. Figura 5.



**Figura 5.** Cultivos primarios 48 h después de la siembra. a= AT-MSC; b= ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.

### **1.3 Caracterización fenotípica *in vitro* de células madre mesenquimales putativas adiposas (AT-MSCs) y endometriales (ET-MSCs).**

Se determinó, mediante citometría de flujo, el patrón básico de expresión de proteínas de superficie, en los cultivos celulares aislados de diferente fuente. Los cultivos testeados fueron positivos para CD44, CD90, y MHC tipo I y negativos para MHC tipo II y CD45 (según lo indicado en la tabla 3 de M&M). La positividad a cada marcador fue distinta entre los estirpes celulares (ET-MSC vs AT-MSC) (Tabla 9)

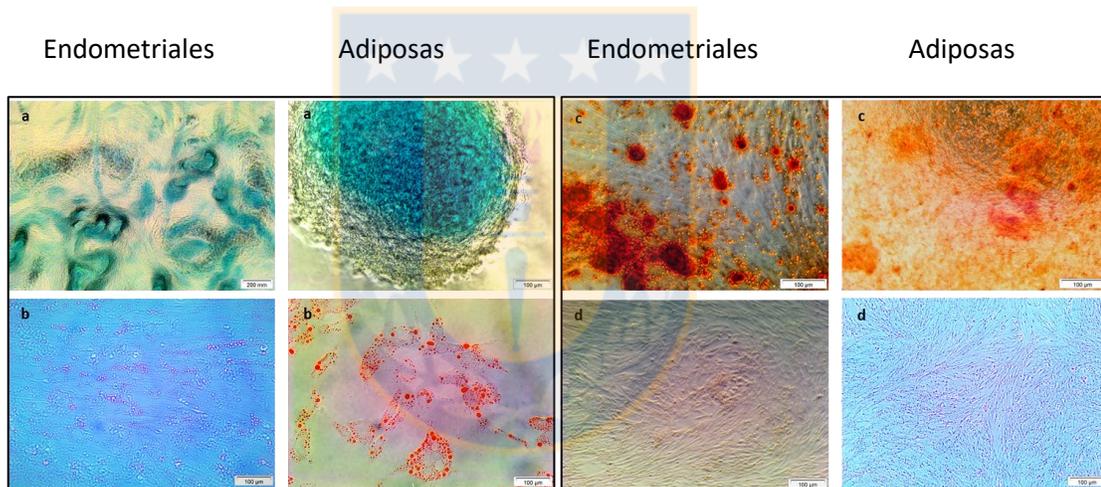
**Tabla 9.** Expresión de marcadores de superficie para ET-MSC y AT-MSC equinas. Fuente: Elaboración propia.

<b>Marcadores</b>	<b>ET-MSC (%)</b>	<b>AT-MSC (%)</b>
UC (autoflo)	0,45 ± 0,39	0,21 ± 0,25
CD44	46,53 ± 6,15	7,55 ± 5,12
CD90	81,86 ± 9,21	40,03 ± 8,32
MHC I	13,82 ± 3,1	4,85 ± 4,71
CD45	1,77 ± 2,0	0,17 ± 4,5
MHC II	0,26 ± 0,8	0,9 ± 0,6

#### **1.4 Evaluación de la tri-potencia: diferenciación celular.**

Los cultivos celulares fueron sometidos al ensayo de diferenciación hacia linajes mesodérmicos. Las células bajo los estímulos de diferenciación tendieron a cambiar la morfología fibroblástica a partir del día 14 de inducción (para diferenciación osteogénica y adipogénica), mientras en el día 7, aquellas células sometidas a diferenciación condrogénica, comenzaron a desprenderse de la placa formando una micro masa. En el grupo control, las células no inducidas no se observaron cambios morfológicos. Las células diferenciadas a tejido condrogénico expresaron micro masas, que llenaron por completo la placa al día 14, en donde los mucopolisacáridos de matriz extracelular fueron

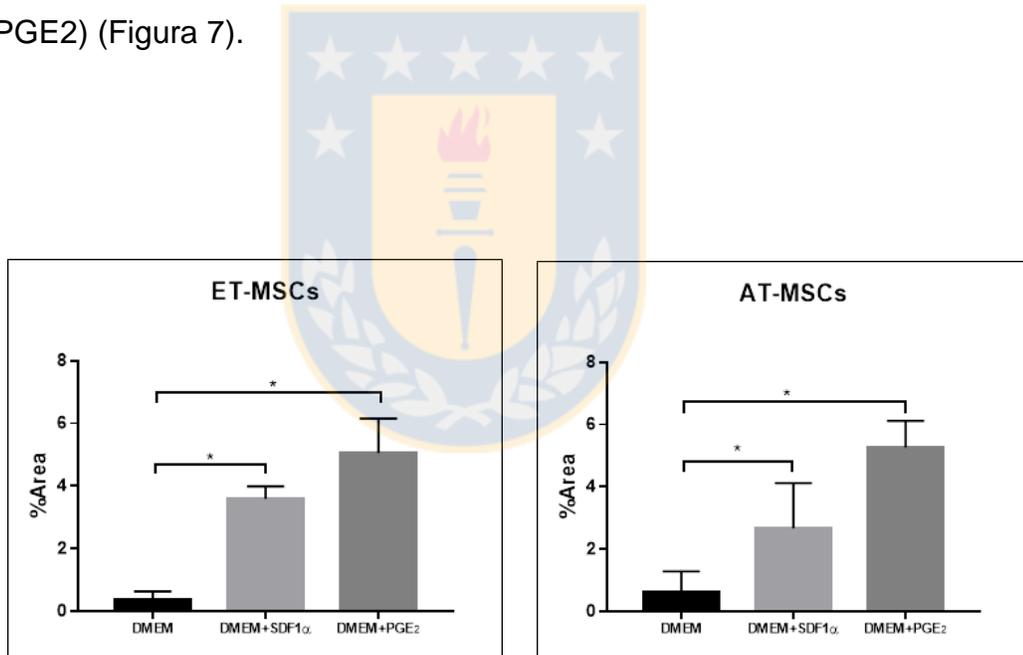
detectados por la tinción azul de alcian específica para tejido cartilaginoso (a); las células sometidas a diferenciación adipogénica se detectaron vacuolas lipídicas las cuales fueron altamente positivas a la tinción con oil red respectiva para ese tipo celular (b); mientras que las células diferenciadas a tejido osteogénico presentaron áreas de mineralización indicada por tinción con rojo alizarina (c); (Figura 6).



**Figura 6.** Ensayo de diferenciación en células de origen endometrial y adiposo. **a:** linajes condrogénico; **b:** adipogénico; **c:** osteogénico. **d:** control. Fuente: Elaboración propia.

### 1.5 Ensayos de migración *in vitro*.

Cuando se compara la capacidad de migración que poseen células de ambas fuentes no se observó diferencias entre tipos celulares (AT-MSC y ET-MSC), sin embargo, células de ambas fuentes migraron en mayor proporción cuando fueron expuestas a SDF1 $\alpha$  y a PGE2 al comparar la capacidad de migrar cuando se utiliza medio DMEM solamente ( $P < 0.001$ ). No se observó diferencias significativas cuando se compara el efecto del quimio atrayente utilizado (SDF1 $\alpha$  vs PGE2) (Figura 7).



**Figura 7.** Ensayo de migración *in vitro* de ET-MSC y AT-MSC. Fuente: Elaboración propia.

## 2.0 Perfil transcriptómico de MSCs equinas.

Se analizaron las diferencias transcriptómicas del ARNm celular entre las células madre mesenquimales endometriales y adiposas mediante secuenciación de nueva generación (NGS). Se obtuvieron bibliotecas limpias con >90% de lecturas después del filtrado. Las estadísticas descriptivas y los resultados de las alineaciones de bibliotecas completas se proporcionan en la tabla 10. Se logró una tasa de alineación total promedio superior al 97%, lo que refleja la fiabilidad de los datos. Se puede observar que las muestra C1A1.1, C1A1.2 y C1A1.3 presentan valores de alineamiento total 46.74%, 18.63% y 30.95% respectivamente, esta información indica una pobre relación frente al genoma de referencia. Las muestras señaladas presentaron una excelente integridad de ARN>8, sin embargo, lo observado podría atribuirse a una contaminación con algún transcriptoma externo. Por lo tanto, fueron descartados en los análisis bioinformáticos posteriores.

**Tabla 10.** Estadística descriptiva de alineamiento de librerías. Fuente: Elaboración propia.

Id	N°Lecturas	Alineamiento 0 veces	Alineamiento 1 vez	Alineamiento mas de 1 vez	Tasa de alineación total
C1A1.1	36227512	19296356(53.26%)	14055319(38.8%)	2875837(7.94%)	46.74%
C1A1.2	30458733	24783252(81.37%)	4263293(14%)	1412188(4.64%)	18.63%

C1A1.3	41310670	28526725(69.05%)	10353257(25.06%)	2430688(5.88%)	30.95%
C1A2.1	25711681	984711 (3.83%)	21937705(85.32%)	2789265(10.85%)	96.17%
C1A2.2	7326227	173373 (2.37%)	6372619 (86.98%)	780235 (10.65%)	97.63%
C1A2.3	18304586	408586 (2.23%)	15905487(86.89%)	1990513(10.87%)	97.77%
C1A3.1	61816804	1416575 (2.29%)	53609672(86.72%)	6790557(10.98%)	97.71%
C1A3.2	28200166	620140 (2.20%)	24448307(86.70%)	3131719(11.11%)	97.80%
C1A3.3	43178779	1107844 (2.57%)	37229131(86.22%)	841804(11.21%)	97.43%
C2A1.1	28726634	762121 (2.65%)	25160884(87.59%)	2803629 (9.76%)	97.35%
C2A1.2	23224697	519733 (2.24%)	20483365(88.20%)	2221599 (9.57%)	97.76%
C2A1.3	26974056	627327 (2.33%)	23742794(88.02%)	2603935 (9.65%)	97.67%
C2A2.1	49011532	1049753 (2.14%)	42639464(87.00%)	5322315(10.86%)	97.86%
C2A2.2	38545800	842490 (2.19%)	33605053(87.18%)	4098257(10.63%)	97.81%
C2A2.3	47379062	1056650 (2.23%)	41249328(87.06%)	5073084(10.71%)	97.77%
C2A3.1	24468131	1736692 (7.10%)	20395878(83.36%)	2335561(9.55%)	92.90%
C2A3.2	30047342	1022860 (3.40%)	26110467(86.90%)	2914015(9.70%)	96.60%
C2A3.3	22660621	497562 (2.20%)	19898380(87.81%)	2264679(9.99%)	97.80%

C1= AT-MSK, C2= ET-MSK; A1 a A3= muestras biológicas; 1.1 a 1.3; 2.1 a 2.3

y 3.1 a 3.3= réplicas técnicas

## 2.1 Análisis de identificación, cuantificación y expresión diferencial (DE).

Se identificó un total de 32.809 genes, 80.855 transcritos y 943.252 exones.

La cuantificación se expresó en RPKM (Reads per kilobase per millon base pair, por su sigla en inglés); (tabla 11). Con estos resultados se realizó un análisis

de componentes principales (PCA) (figura 8a), un volcano plot (figura 8b) y un mapa de calor (figura 8c).

Se aplicaron dos tipos de restricciones a los datos recopilados, primero se estableció una tasa de falso positivos (FDR) de 0.05 (valor  $q < 0.05$ ) y luego se aplicó un logaritmo de fold change de  $\pm 1$ . Con este último ajuste se obtuvo una gran cantidad de genes desregulados (5680), que no pueden ser manejados fácilmente, por lo tanto, se realizó un análisis más estricto manteniendo el mismo valor  $q$ , pero con un logaritmo de fold change de  $\pm 1.5$ .

**Tabla 11** Cantidad total de genes, transcritos y exones encontrados en la secuenciación de ARNm y el número de genes regulados positiva y negativamente. Fuente: Elaboración propia.

Categoría	Ocurrencia
Exones	943.252
Genes	32.809
Transcritos	80.855
Genes diferencialmente expresados ( $q$ value $< 0.05$ )	5.680
Up regulated en ET-MS	2.291

Down regulated en ET-MSC	3.389
Top upregulated genes (Foldchange >1.5)	125
Top downregulated genes (Foldchange <-1.5)	51

---

En el PCA hubo un claro agrupamiento de las muestras de acuerdo con su origen biológico (C1 = MSC derivado adiposo, C2 = MSC endometrial) (Figura 8a). Las tres réplicas técnicas de una muestra biológica en el ET-MSC (C2A1, 2 y 3) mostraron un patrón mixto, que se asemeja probablemente a más células adiposas que endometriales. El mismo patrón apareció en el mapa de calor, donde los 50 genes principales se agruparon según su origen biológico, mientras que las mismas muestras que en el PCA tenían una asociación intermedia, similar a las células adiposas.

El análisis de expresión diferencial se realizó en Ballgown y se representan gráficamente en el volcano plot (figura 8b). Entre los genes agrupados en cada categoría, en el caso de ET-MSC los siguientes genes estaban marcadamente disminuidos: COMP, LOC111771983, LOC111771987, LOC100050136, LOC100055750, GREM 2, mientras que otros genes regulados positivamente también se agruparon, estos incluyen: HMGA1, SERPINB10, NEDD9, LIPG, CHST15, LOC1000700567, PAPSS2, ITGB3, DLX1 y TRIL. Los datos

completos de los 50 genes principales con el fold change Log2 respectivo y el valor q se muestran en la tabla 12.

**Tabla 12.** Lista de los 50 genes más variables, sus respectivos valor q y Fold Change (logfc). Fuente: Elaboración propia.

Id Gen	Umbral	Valor Q	logfc
LOC100050136	Downregulado	3,50E-07	-3,06
COMP	Downregulado	1,14E-05	-2,90
BCHE	Downregulado	1,66E-05	-1,78
LRRC17	Downregulado	1,03E-04	-2,65
GREM2	Downregulado	1,91E-04	-2,85
ENPP6	Downregulado	3,21E-04	-2,44
LOC111772370	Downregulado	4,21E-04	-2,88
GAS1	Downregulado	5,08E-04	-1,88
STOM	Downregulado	5,21E-04	-1,93
LOC100056936	Downregulado	6,12E-04	-2,82
SGCG	Downregulado	6,85E-04	-2,50
SERPINF1	Downregulado	1,55E-03	-3,03

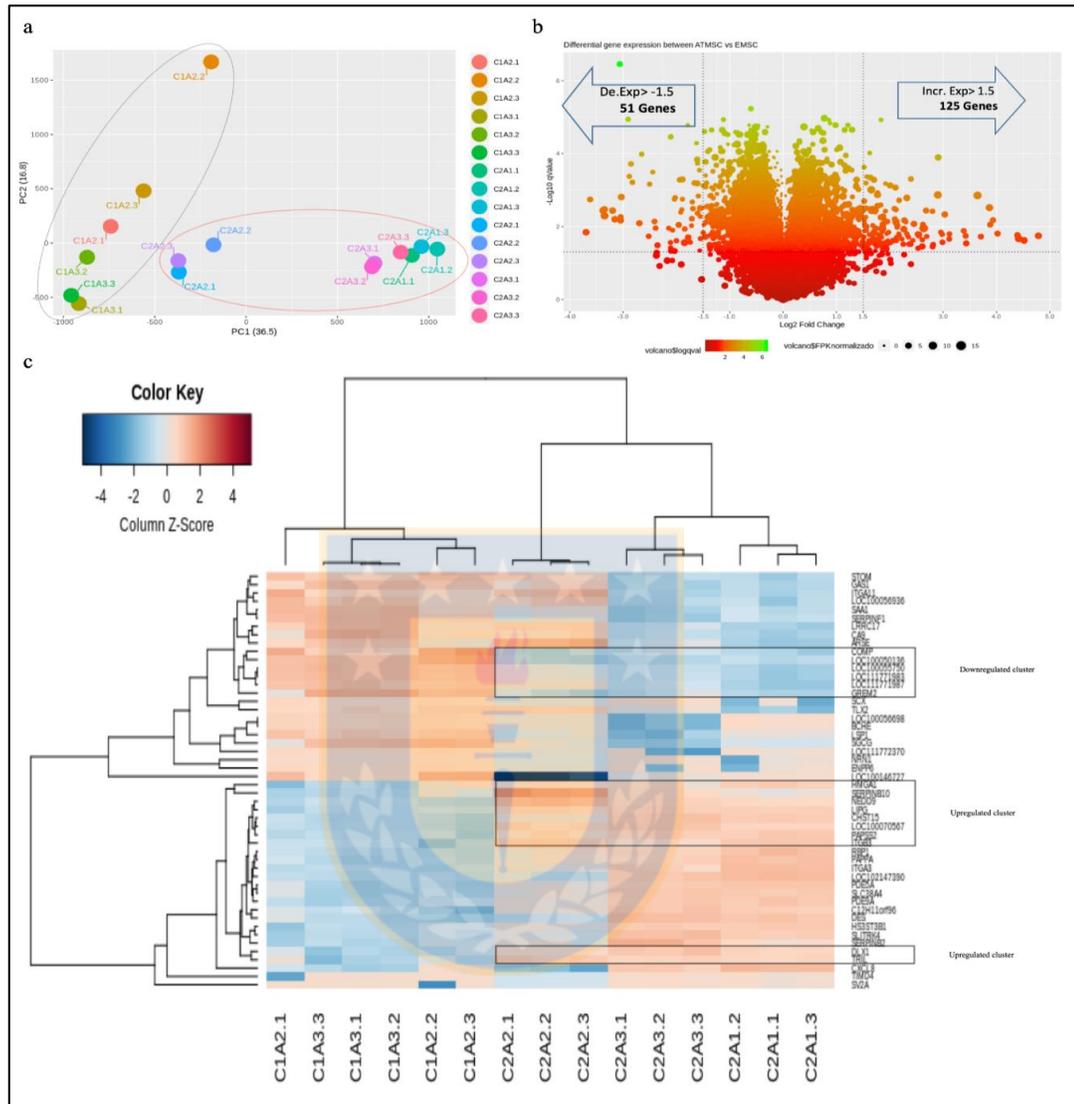
LSP1	Downregulado	1,61E-03	-2,02
TLX2	Downregulado	1,77E-03	-1,88
ITGA11	Downregulado	1,78E-03	-2,03
LOC100056698	Downregulado	1,80E-03	-3,61
LOC100146727	Downregulado	2,12E-03	-1,70
ARSE	Downregulado	3,22E-03	-1,69
SAA1	Downregulado	3,39E-03	-3,34
SCX	Downregulado	3,43E-03	-1,89
LOC111771983	Downregulado	3,60E-03	-3,37
LOC111771987	Downregulado	3,64E-03	-3,19
NRN1	Downregulado	4,07E-03	-1,92
LOC100055750	Downregulado	5,07E-03	-3,34
CA9	Downregulado	3,47E+09	-2,1
LIPG	Upregulado	1,26E-04	2,90
LOC100070567	Upregulado	4,95E-04	2,39
NEDD9	Upregulado	5,21E-04	1,70
DLX1	Upregulado	6,60E-04	1,91
ITGB3	Upregulado	7,46E-04	2,00

SERPINB10	Upregulado	8,55E-04	2,10
SV2A	Upregulado	1,15E-03	1,77
HMGA1	Upregulado	1,34E-03	1,76
SERPINB2	Upregulado	1,35E-03	2,89
LOC102147390	Upregulado	1,39E-03	3,02
CXCL8	Upregulado	1,39E-03	3,64
ITGA3	Upregulado	1,63E-03	2,31
TRIL	Upregulado	1,85E-03	1,83
SLC38A4	Upregulado	1,90E-03	2,17
PDE9A	Upregulado	2,56E-03	1,82
PAPSS2	Upregulado	2,70E-03	1,76
DES	Upregulado	3,03E-03	3,86
PAPPA	Upregulado	3,23E-03	2,08
CHST15	Upregulado	3,44E-03	2,11
TIMD4	Upregulado	3,62E-03	1,74
C12H11orf96	Upregulado	3,63E-03	2,67
PDE5A	Upregulado	3,76E-03	1,91
SLITRK4	Upregulado	3,79E-03	2,79

RBP1	Upregulado	3,81E-03	1,71
HS3ST3B1	Upregulado	5,24E-03	1,87

---



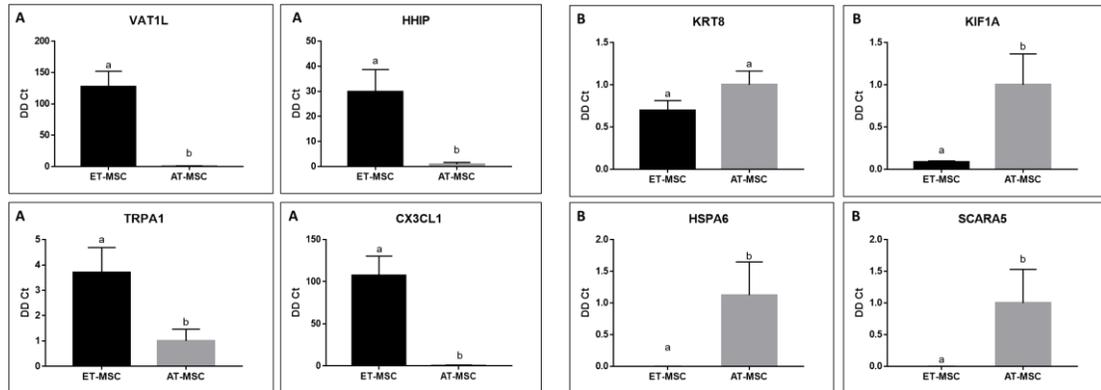


**Figura 8.** Análisis transcriptómico de AT-MSC y ET-MSC, a) Gráfico de PCA realizado con lecturas de todos los genes expresados. Los puntos representan muestras y se colorean de acuerdo con su ID y se rodean según su categoría, azul para AT-MSC rosa para ET-MSC. b) Volcano plot de genes expresados diferencialmente entre MSCs. Los puntos representan genes y el gradiente de color indica el significado, verde para el más significativo y rojo para el no estadísticamente significativo. La línea punteada horizontal indica el umbral significativo (valor  $q < 0.05$ ), y las líneas verticales, perpendiculares a la línea

umbral indican el umbral de fold change +/- 1.5 Log2. Los valores de fold change Log2 en la línea X se trazan contra Log10 de los valores q (línea Y). c) Agrupación jerárquica y visualización en vista de árbol de los 50 genes expresados diferencialmente más variables a través de las muestras (valor q <0.05). RPKM se convirtieron a puntuación Z; los colores rojizos a marrones indican genes regulados positivamente y los colores azul claro a azul oscuro representan genes regulados negativamente. Fuente: Elaboración propia.

## **2.2 Validación por qPCR.**

Para validar los datos de ARN-seq, se analizó el perfil de expresión de genes seleccionados usando qRT-PCR. Para esto, cuatro genes sobre expresados y cuatro sub expresados en ET-MSC fueron evaluados por qPCR. Como resultado, la expresión de 7 de los 8 genes analizados se correlacionó entre ARN-seq y qPCR, con un R = 0,91 y valores de p <0,05 para la expresión diferencial. Se muestran en la figura 9 los genes analizados y su comparación entre tipos de células.



**Figura 9.** Validación de RNA-seq mediante comparación de los niveles de expresión por qRT-PCR de cuatro genes sobre expresados (izquierda en el panel A), y cuatro genes sub expresados (derecha en el panel B). Los genes analizados fueron: sobre expresados VAT1L, HHIP, TRPA1, CX3C y sub expresados KRT8, HSPA6, KIF1A y SCARA5 en ET-MSCs comparado con AT-MSCs ( $p < 0.05$ ). Los datos de RT-qPCR demuestran que la secuenciación de ARNs fue fiable. Fuente: Elaboración propia.

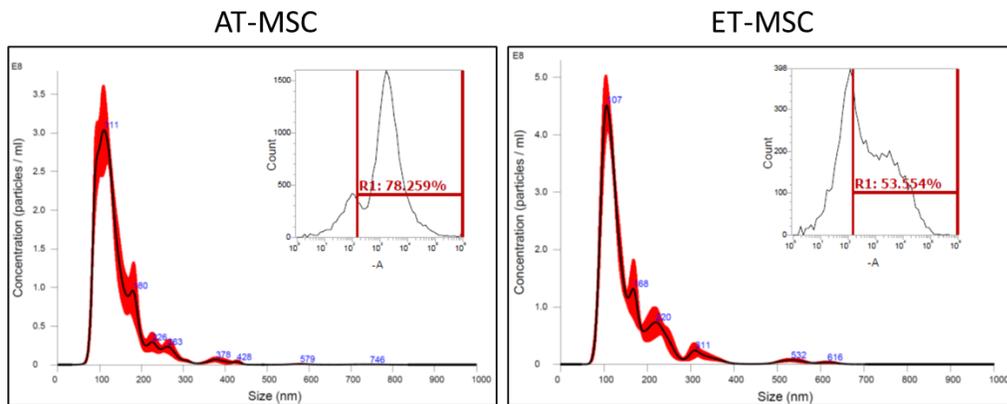
### 2.3 Análisis de enriquecimiento funcional.

El set de genes diferencialmente expresados fue utilizado para determinar su participación en las vías moleculares utilizando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes por su sigla en inglés). Un total de 35 clústers fueron identificados, de estos, 12 clusters fueron genes regulados negativamente y 23 clusters de genes regulados positivamente en ET-MSC con respecto a AT-MSC. Las vías más relevantes identificadas en los genes regulados negativamente fueron: funciones metabólicas incluyendo biogénesis

ribosomal, biosíntesis de tARN, metabolismo de carbono y síntesis de aminoácidos, mientras que las vías identificadas para aquellos genes regulados positivamente fueron: funciones regulatorias de acción típicamente mesenquimal tales como vías PI3K-AKT y TGF $\beta$ , señalización Hippo y regulación de pluripotencia.

#### **2.4 Perfil global de la expresión de miRNA: identificación, cuantificación y análisis de expresión diferencial.**

Las vesículas extracelulares se purificaron del sobrenadante de células cultivadas de ambos orígenes. La concentración promedio de las VE aisladas fueron:  $2,69 \pm 0,40$  y  $2,74 \pm 1,21 \times 10^{10}$  / ml, mientras que el tamaño promedio fue  $154 \pm 18$  vs  $142 \pm 11$   $\mu\text{m}$  para ET-MSC y AT-MSC respectivamente. No hubo diferencias significativas entre las muestras ni para la concentración ( $p=0,84$ ) ni para el tamaño del VE ( $p=0,09$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Concentración y tamaño de las VE aisladas desde medios de cultivo de AT-MSC y ET-MSC. Fuente: Elaboración propia.

Todas las muestras de VE recogidas produjeron ARN útil para la construcción de bibliotecas y la secuenciación posterior. Aunque algunas bibliotecas tenían un bajo nivel de concentración de ARN, la calidad de las lecturas asignables era aceptable con un promedio de 25 Pthreads después del recorte y la extracción del adaptador con 23 pb de longitud, lo que representa más del 90% del total de lecturas sin procesar. El número de lecturas mapeadas e identificadas usando la biblioteca Mirbase se anotaron y normalizaron usando Recuentos por millón (CPM) para cada miARN.

## 2.5 Análisis de expresión diferencial.

Se investigó la carga de miARN de las VE. Se identificó un total de 253 miARN, 31 de los cuales se expresaron diferencialmente ( $p < 0.05$ ). De estos, 20 estaban regulados positivamente en ET-MSK (Log2 fold change  $> 0.5$ ) y 7 regulados negativamente (Log2 fold change  $< -0.5$ ) (tabla 13 y figura 11).

**Tabla 13.** miARN expresados diferencialmente en ET-MSK. Fuente: Elaboración propia.

miARN	Log2 Fold Change	Expresión con respecto a AT-MSK
miR-380	10,37	Upregulado
miR-7177b	9,42	Upregulado
miR-369-3p	8,84	Upregulado
miR-3200	8,49	Upregulado
miR-329a	8,20	Upregulado
miR-9021	7,57	Upregulado
miR-494	7,49	Upregulado
miR-125a-3p	5,91	Upregulado

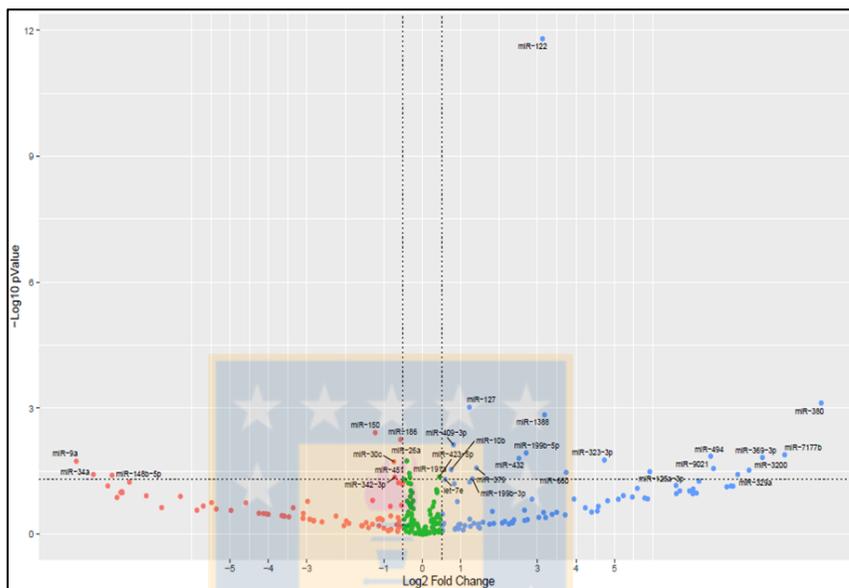
miR-323-3p	4,73	Upregulado
miR-660	3,74	Upregulado
miR-1388	3,17	Upregulado
miR-122	3,12	Upregulado
miR-199b-5p	2,70	Upregulado
miR-432	2,51	Upregulado
miR-379	1,40	Upregulado
miR-199b-3p	1,30	Upregulado
miR-127	1,22	Upregulado
miR-409-3p	0,81	Upregulado
miR-10b	0,75	Upregulado
let-7e	0,59	Upregulado
miR-186	-0,56	Downregulado
miR-342-3p	-0,71	Downregulado
miR-30c	-0,73	Downregulado
miR-150	-1,22	Downregulado
miR-148b-5p	-8,06	Downregulado
miR-34a	-8,55	Downregulado



miR-9a

-8,99

Downregulado

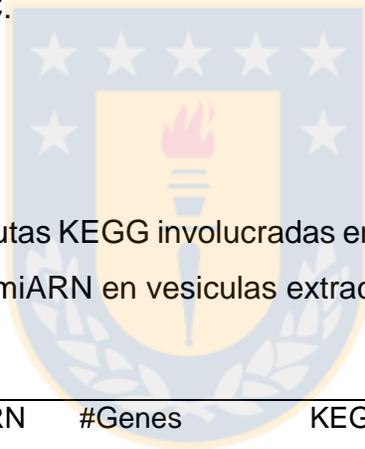


**Figura 11.** Volcano plot de de miARN expresados diferencialmente en ET-MSC. La línea punteada horizontal indica el umbral significativo (valor  $p < 0.05$ ), y las líneas verticales, perpendiculares indican el umbral de fold change  $\pm 0.5 \text{ Log}_2$ . Los valores de fold change  $\text{Log}_2$  en la línea X se trazan contra  $\text{Log}_{10}$  de los valores q (línea Y). Fuente: Elaboración propia.

## 2.6 Análisis de la vía de enriquecimiento funcional de miARN.

El análisis mirPath de los miARN expresados diferencialmente reveló 17 rutas KEGG con al menos dos miARN altamente regulados positivamente en ET-MSC ( $p < 0.001$ ) y cinco rutas reguladas positivamente en AT-MSC (tabla 14). Para las células endometriales, las vías más afectadas fueron la unión

adherente y la interacción ECM-receptor, las vías cancerosas (proteoglicanos, carcinoma de pulmón, leucemia mieloide crónica, glioma), TGF- $\beta$ , Foxo y vías de señalización de pluripotencia. Otras vías incluyen el metabolismo celular (biosíntesis y metabolismo de ácidos grasos, degradación de lisina, procesamiento de proteínas). Para el caso de AT-MSC, las vías encontradas estaban relacionadas con el metabolismo celular y los proteoglicanos en el cáncer, sin embargo, el número de miARN involucrados fue notablemente menor que en ET-MSC.



**Tabla 14.** Lista de las rutas KEGG involucradas en AT-MSC o ET-MSC, en base a la secuenciación de miARN en vesículas extracelulares. Fuente: Elaboración propia.

Tipo celular	#miARN	#Genes	KEGG Pathway	p-value
ET-MSC	15	140	Vías en cancer	$3.1 \times 10^{-5}$
ET-MSC	15	90	Proteoglicanos en cancer	$9.5 \times 10^{-16}$
ET-MSC	14	43	Uniones adherentes	$8.8 \times 10^{-10}$
ET-MSC	13	79	Carcinogenesis Viral	$5.2 \times 10^{-8}$
ET-MSC	13	62	Vías de señalización que regulan la pluripotencia de las células madre.	$2.1 \times 10^{-5}$

ET-MSC	13	62	Vías de señalización FoxO	$4.5 \times 10^{-6}$
ET-MSC	13	55	Vías de señalización de hormona tiroidea	$3.3 \times 10^{-6}$
ET-MSC	13	40	Vías de señalización TGF- beta	$7.3 \times 10^{-8}$
ET-MSC	13	33	Interacción ECM-receptor	$1.7 \times 10^{-23}$
ET-MSC	11	59	Ciclo celular	$5.8 \times 10^{-7}$
ET-MSC	11	44	Cancer pulmonary de células pequeñas	$2.0 \times 10^{-5}$
ET-MSC	11	35	Glioma	$3.4 \times 10^{-8}$
ET-MSC	10	64	Hepatitis B	$3.1 \times 10^{-5}$
ET-MSC	10	40	Leucemia mieloide crónica	$2.0 \times 10^{-7}$
ET-MSC	8	29	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	$3.3 \times 10^{-6}$
ET-MSC	7	20	Degradación de lisina	$5.6 \times 10^{-6}$
ET-MSC	4	3	Biosíntesis de ácidos grasos	$6.2 \times 10^{-7}$
AT-MSC	3	18	Metabolismo de los ácidos grasos	$3.3 \times 10^{-10}$
AT-MSC	3	5	Biosíntesis de ácidos grasos	$1.0 \times 10^{-32}$

AT-MSC	2	73	Proteoglicanos en cáncer	$2.3 \times 10^{-10}$
AT-MSC	2	54	Procesamiento de proteínas en retículo endoplásmico	$1.5 \times 10^{-8}$
AT-MSC	2	14	Degradación de lisina	$9.5 \times 10^{-10}$

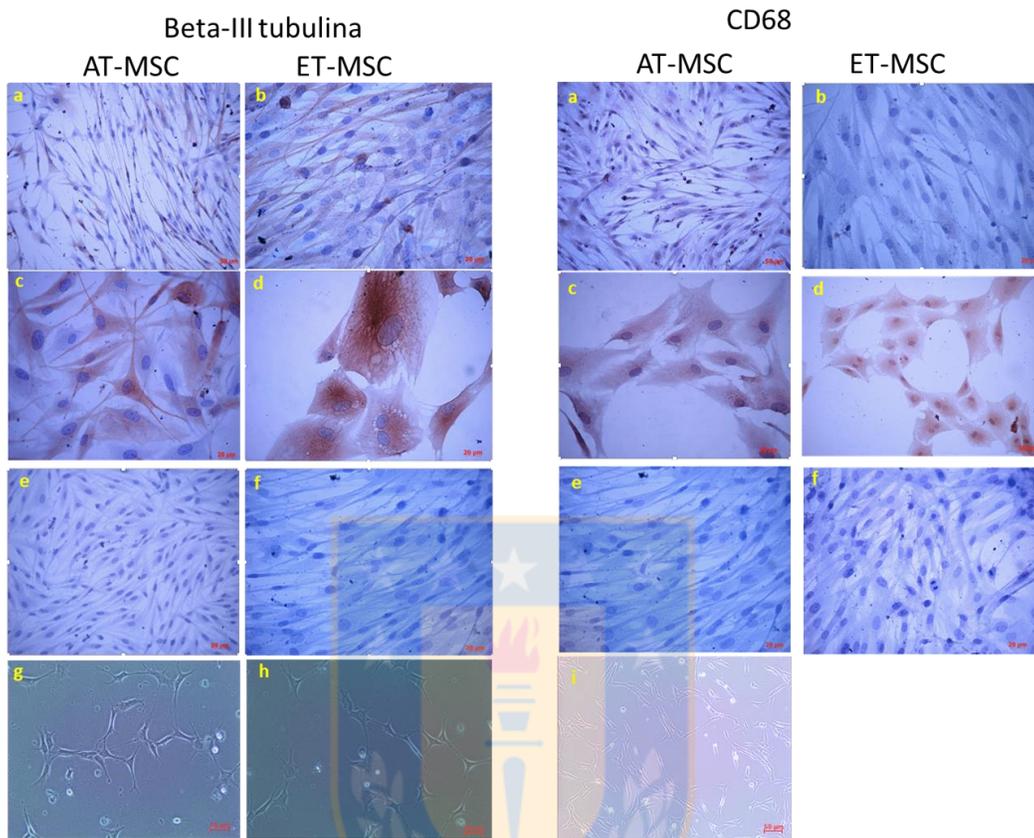
---

A partir de los datos obtenidos en el análisis de la vía de enriquecimiento de los ARNm celulares, se verificó si algunas de las vías representadas estaban realmente hiperactivadas. Para probar esto, se probaron la diferenciación neurogénica y la cardiomiogénica.

Las células fueron inducidas hacia la diferenciación neurogénica y sometidas a la identificación inmune de los marcadores de linaje neural beta III tubulina, un marcador de neuronas inmaduras y CD68, un marcador de microglia (figura 12). Para Beta III, el marcaje de tubulina se detectó en células adiposas y endometriales a pesar de la inducción. Sin embargo, la morfología y la intensidad del marcador cambiaron con la inducción (figura 12c y d panel izquierdo). Para CD68, las células ET-MSC indiferenciadas no mostraron marcaje para CD68, sin embargo, después de la inducción, el marcaje se intensificó. Para AT-MSC, el marcador se detectó en células no inducidas e inducidas. Después de la inducción neurogénica, las células mostraron características morfológicas indicativas de un cambio hacia un fenotipo

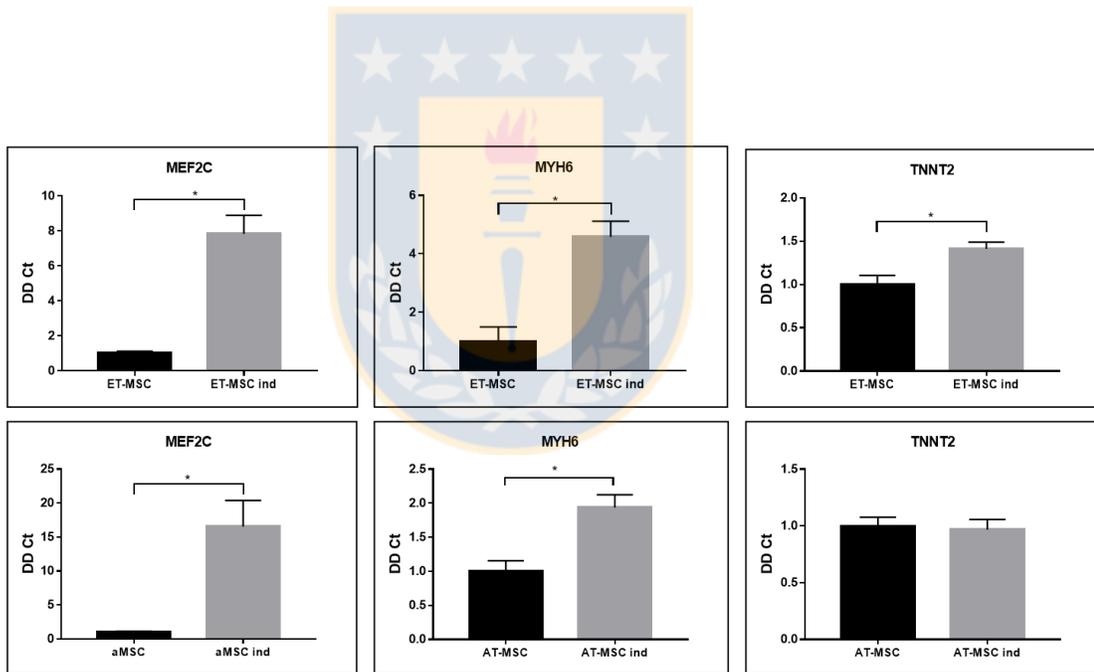
neurogénico, aunque no de microglía o neurona inmadura típica. Estas características morfológicas son mas claras cuando células de ambas fuentes son sembradas a baja confluencia e inducidas a diferenciación (figura 12 g, h). No se encontró marcaje en las células control no inducidas, pero que se incubaron con un anticuerpo primario no relacionado y se revelaron con el mismo anticuerpo secundario marcado con HRP que los grupos experimentales.





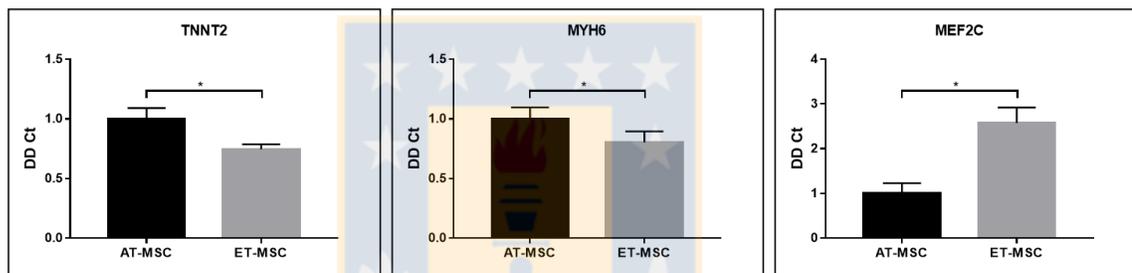
**Figura 12.** Inmunohistoquímica para marcadores de linaje neural beta-III tubulina (neuronas inmaduras) y CD68 (microglia) de AT-MSC y ET-MSC. En ambos paneles, **a** y **b**: AT-MSC y ET-MSC antes de la inducción de diferenciación neurogénica; **c** y **d**: AT-MSC y ET-MSC luego de la inducción; **e** y **f**: células no inducidas a diferenciación neurogénica y teñidas con un anticuerpo primario no específico; **g** y **h**: AT-MSC y ET-MSC inducidas a diferenciación neurogénica, sembradas a baja confluencia; **i**: AT-MSC no inducida a diferenciación sembrada a baja confluencia. Proyecciones y estructuras tipo neuronales son observables en **g** y **h**, pero no en **i**. Fuente: Elaboración propia.

Con respecto a la diferenciación cardiomiogénica, se comparó mediante qRT-PCR, la expresión de tres genes de interés. En el caso de ET-MSC en los tres genes evaluados (MEF2C, MYH6 y TNNT2) la expresión fue significativamente mayor tras la inducción ( $p < 0.0001$  para todos los casos), mientras que para AT-MSC los genes MEF2C y MYH6 fueron diferencialmente expresados tras la inducción ( $p < 0.0001$ ), mientras que no se observó diferencias significativas para el caso de TNNT2 ( $p = 0.265$ ) Figura 13.



**Figura 13.** Comparación de los niveles de expresión por qRT-PCR de tres genes en ET-MSC y AT-MSC antes y después de la inducción cardiomiogénica. Fuente: Elaboración propia.

Cuando se compararon células de ambas fuentes, tras la inducción cardiomiogénica, se observó diferencias significativas ( $p < 0.0001$ ) en el nivel de expresión de los genes TNNT2 y MYH6 en AT-MSC con respecto a ET-MSC, mientras que para el gen MEF2C la mayor expresión se observó en ET-MSC con respecto a AT-MSC ( $p < 0.0001$ ) (Figura 14).



**Figura 14.** Comparación de los niveles de expresión por qRT-PCR de tres genes entre ET-MSC y AT-MSC tras inducción cardiomiogénica. Fuente: Elaboración propia.

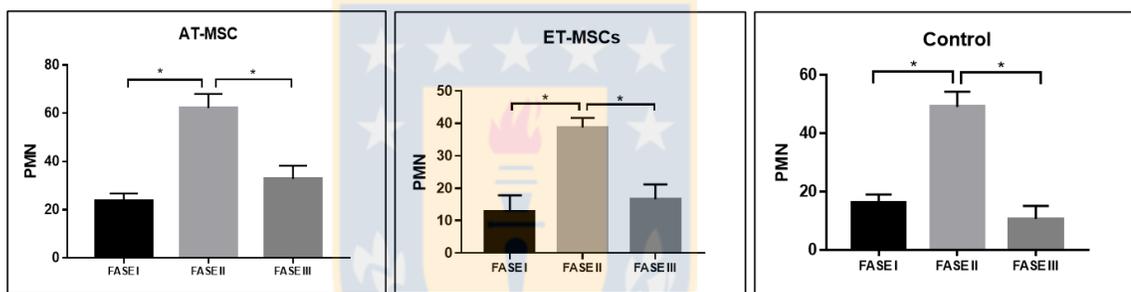
### **3 Evaluación de las propiedades anti inflamatorias y el potencial de anidamiento *in vivo* de MSCs tras la administración a un modelo animal de PMIE.**

#### **3.1 PMIE y efecto inmunomodulador de las MSCs.**

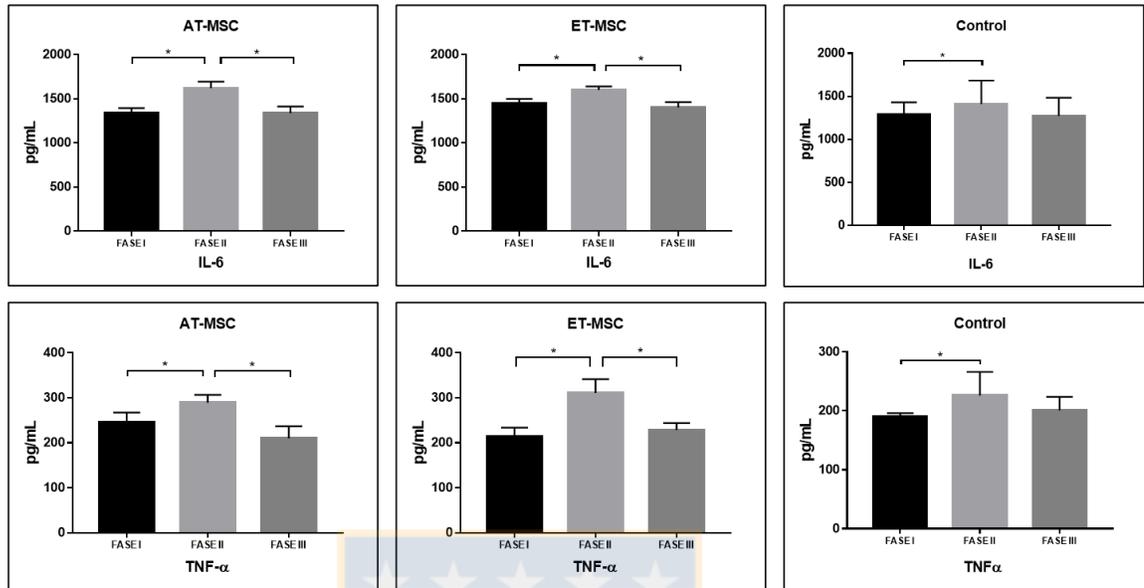
Durante la fase I de experimento, los valores basales de PMN reportados para todas las yeguas fue en promedio 23 PMNs, sin embargo, esta cantidad aumentó significativamente en biopsias de yeguas durante la fase II, después de la infusión de espermatozoides muertos ( $p= 0.001$ ), en donde se observó un valor promedio de 45 PMNs (figura 15). El mismo fenómeno se observó en los ensayos ELISA para IL-6 ( $p=0.04$ ) y TNF- $\alpha$  ( $p=0.03$ ) (figura 16). Esto fue confirmado por inmunohistoquímica de las biopsias, en donde se observa el mismo fenómeno (Figura 17).

Después de que se demostró la inflamación, se evaluó la actividad antiinflamatoria de las MSC (fase III). El grupo 1 recibió infusión intrauterina de  $2 \times 10^7$  AT-MSC marcadas en 20 ml de solución salina estéril al 0,9%, grupo 2, la misma cantidad de células madre endometriales marcadas en el mismo vehículo, mientras que el grupo 3 recibió solo solución salina. Después de 48 horas, se realizaron los mismos lavados, biopsias y medidas descritas anteriormente. Se encontró una reducción significativa ( $p < 0,0001$ ) del conteo de PMN en todas las

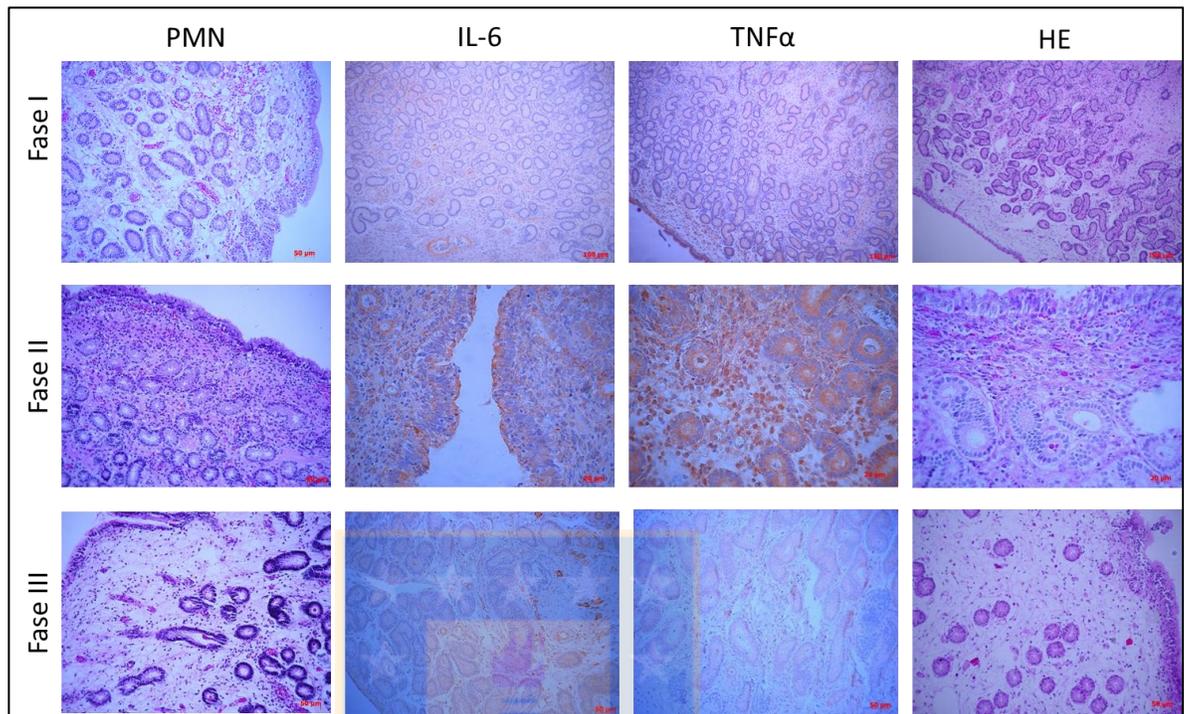
muestras, incluidas las yeguas de control que no recibieron células (figura 15). En los sobrenadantes, el ELISA detectó una disminución notable ( $p < 0.05$ ) de IL-6 y TNF- $\alpha$  en los dos grupos que recibieron la infusión de MSC, pero no en el grupo de control (Figura 16). El mismo fenómeno se visualizó mediante inmunohistoquímica (Figura 17).



**Figura 15.** Cantidad de PMNs endometriales durante las diferentes fases experimentales (I, II, y III). Barras indicadas con un asterisco son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.



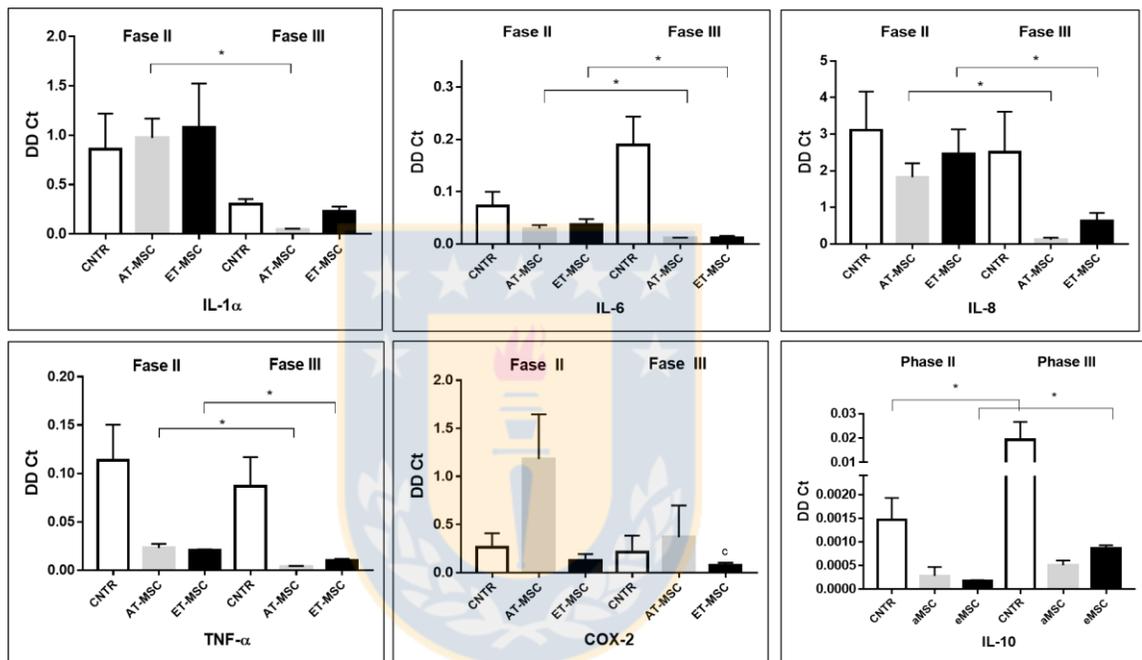
**Figura 16.** Patrón de expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  en fluido uterino durante las diferentes fases experimentales (I, II, y III). Barras indicadas con un asterisco son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ). Fuente: Elaboración propia.



**Figura 17.** Inmunohistoquímica de biopsias de endometrio. Patrón de expresión de PMN, IL-6 y TNF- $\alpha$  en tejido endometrial durante las diferentes Fases del estudio (I, II y III). HE= hematoxilina eosina. Fuente: Elaboración propia.

A nivel de ARNm, no se encontraron variaciones en la expresión de los transcriptos analizados en las yeguas control. Solo la IL-10 aumentó significativamente ( $p = 0.0164$ ) (figura 18). En el grupo tratado con AT-MSc, se encontró una disminución significativa en la expresión de IL-1 $\alpha$ , ( $p = 0.0003$ ); IL-6 ( $p = 0,04$ ); IL-8 ( $p = 0,006$ ); TNF- $\alpha$  ( $p = 0.004$ ); IL-10 no aumentó significativamente ( $p = 0.08$ ), y la expresión de COX-2 se mantuvo sin cambios, aunque con una tendencia a la disminución ( $p = 0.09$ ; Figura 18). En las yeguas

que recibieron ET-MSC, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-8 disminuyeron significativamente ( $p = 0.01$ ), IL-10 aumentó ( $p = 0.009$ ).

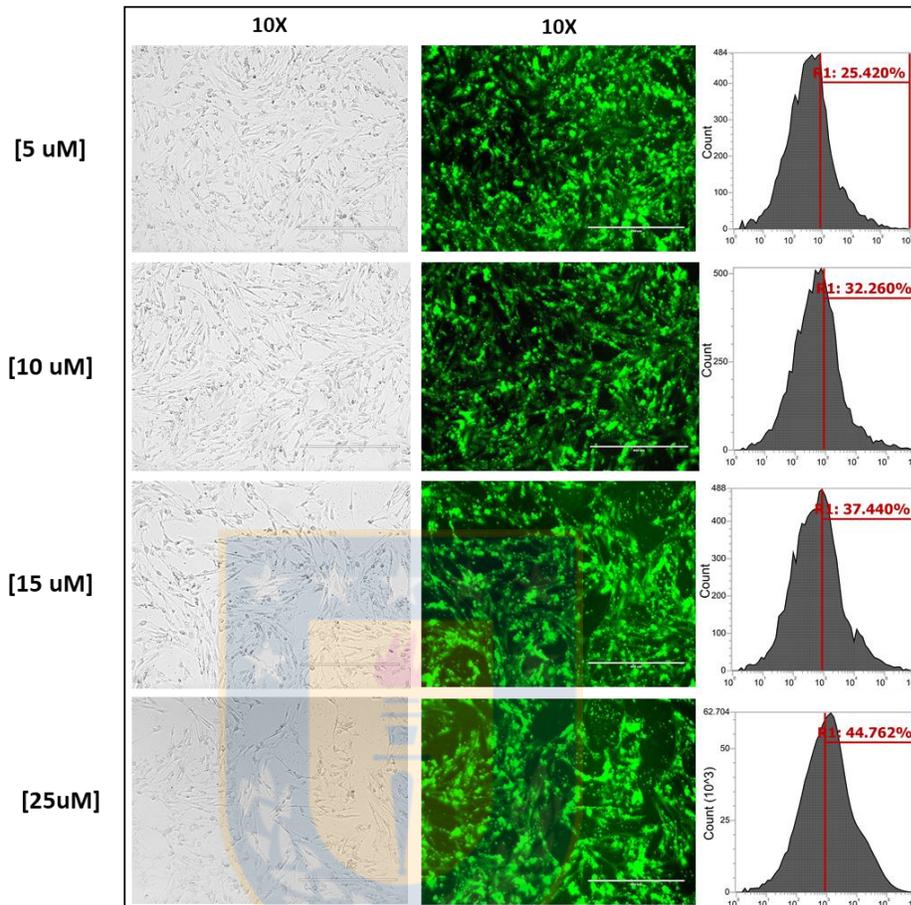


**Figura 18.** Expresión de ARNm de citoquinas pro y antiinflamatorias en fluidos uterinos de yeguas control y de yeguas tratadas con MSCs, durante las fases II y III del estudio. Fuente: Elaboración propia. Fuente: Elaboración propia.

### **3.2 Ensayo *in vitro* de marcaje de MSCs utilizando el kit Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit.**

Se desarrolló un ensayo *in vitro* que consistió en el uso del kit Vybrant CFDA SE Cell Tracer (Lifetechnologies, Santiago, Chile), en diferentes concentraciones, para marcar MSCs. Este ensayo permitió obtener información sobre la concentración ideal para marcar MSCs, condición indispensable para estudios de anidamiento.

El marcaje se logró con todas las concentraciones de CFDA probadas; sin embargo, las concentraciones superiores a 10  $\mu\text{M}$  condujeron al desprendimiento de células y al crecimiento lento, mientras que 5  $\mu\text{M}$  arrojaron una señal demasiado débil en el paso 4. Todo el etiquetado se cuantificó por citometría de flujo. Como conclusión, se eligieron 10  $\mu\text{M}$  para los tratamientos (Figura 19).

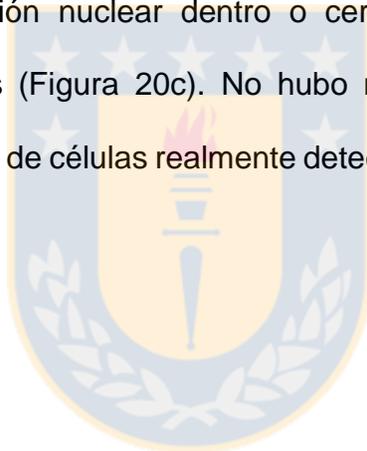


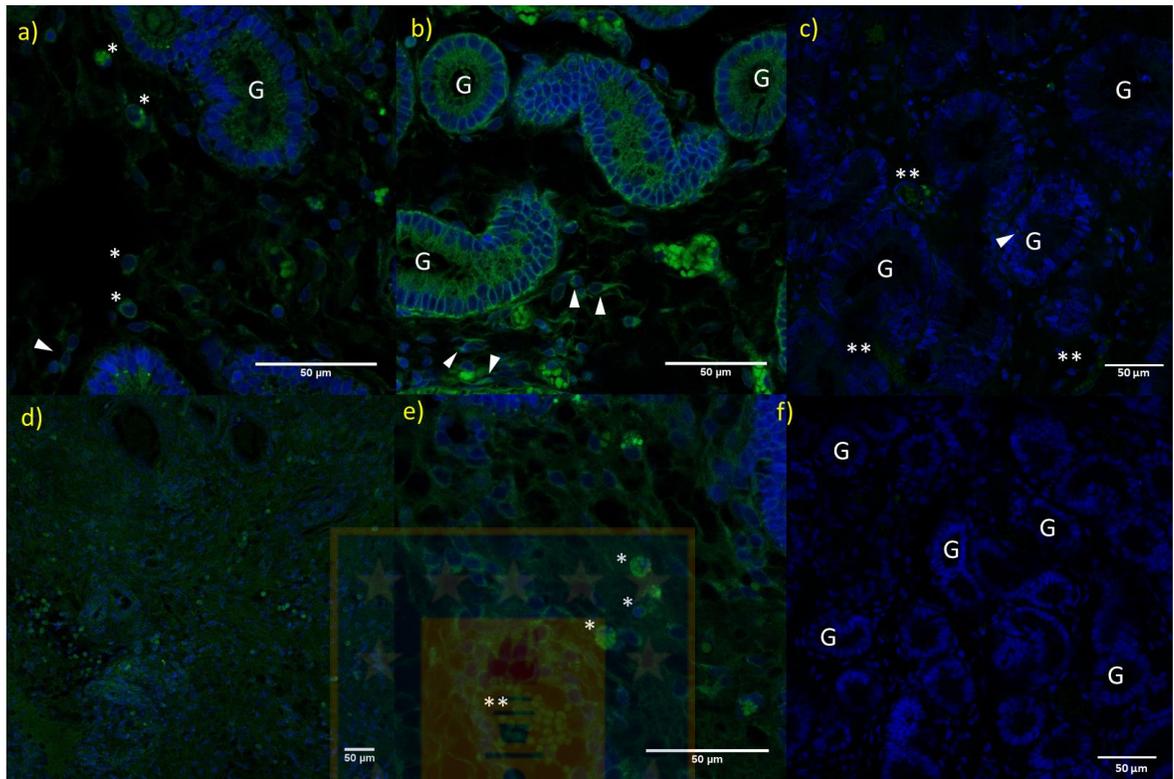
**Figura 19.** MSCs marcadas utilizando diferentes concentraciones de CFDA tras ser sometidas a la segunda expansión (P2). Fuente: Elaboración propia.

### 3.3 Anidamiento de las MSC.

La señal verde de las células marcadas con CFDA se detectó en todas las biopsias excepto en el control en el día 2 y persistió en los días 10 y 30 después de la infusión (Figura 20a-c). En el día 2, la señal fluorescente CFDA estaba típicamente muy concentrada cerca del epitelio glandular y en el estroma,

también se detectaron algunos restos en este punto temprano (Figura 20d), así como las células inmunes (Figura 20e). No se determinó la naturaleza exacta de estos glóbulos blancos, algunos presentaron apariencia de eosinófilos o macrófagos (asterisco en las Figuras 20a y e) otros tenían una morfología típica de PMN (Figura 20e). En los días 10 y 30, el marcaje disminuyó y se encontró principalmente en el estroma periglandular. Se detectaron algunas estructuras similares a células, aparentemente más pequeñas que MSC, con marcaje verde intenso, pero sin tinción nuclear dentro o cerca de la vasculatura, que se asemejan a eritrocitos (Figura 20c). No hubo marcaje en las yeguas control (Figura 20f). El número de células realmente detectadas en puntos de tiempo fijos no fue cuantificado.





**Figura 20.** Fotografías representativas del ensayo confocal para CFDA-SE en biopsias de yeguas a las 48h (a), 10 días (b) o 30 días (c), después del tratamiento con MSCs. Asterisco significa células polimorfonucleares; la punta blanca indica las células mesenquimales; G = glándula. En el panel inferior, d = bajo aumento de una biopsia a las 48 h, se pueden ver restos verdes, e) aumento de a) que muestra PMN (\*) y eritrocitos (\*\*), f) endometrio de control que no recibió células. Etiqueta verde = CFDA-SE, etiqueta azul = contratinción para el núcleo (TROPO-3). Las imágenes se seleccionaron de cualquier tipo de célula (AT-MSC o ET-MSC) en función de los mejores patrones de señal fluorescente. Fuente: Elaboración propia.

## VII. DISCUSIÓN

La endometritis es la principal enfermedad reproductiva en los caballos (Traub-Dargatz et al., 1991), puede provocar infertilidad y está relacionada con la incapacidad de la yegua para drenar los líquidos asociados con la inflamación (Troedsson et al., 1998).

Para que el proceso de implantación sea exitoso requiere, por un lado, una compleja secuencia de eventos de señalización, que son cruciales para el establecimiento de la gestación y, por otro lado, un gran número de mediadores moleculares (moléculas de adhesión, citoquinas, factores de crecimiento, etc.). Ambos están involucrados en la interacción embrio-maternal temprana (Perrini et al., 2016). El grado de producción endometrial de estos mediadores podrían verse alterados en una endometritis persistente. De hecho, los factores proinflamatorios transcritos (CXCL5, IL-1B, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) en las células epiteliales endometriales bovinas están elevadas en casos de endometritis subclínica o clínica (Fischer et al., 2010).

Muchas terapias han sido propuestas para tratar o prevenir endometritis en yeguas. La endometritis aguda post monta es usualmente tratada con irrigación uterina, el uso de agentes ecbólicos, antibióticos sistémicos y locales. Sin embargo, estas terapias no siempre son efectivas en el tratamiento de inflamaciones uterinas crónicas (Perrini et al., 2016). Para el caso de infertilidad

asociado a daño endometrial, la interacción embrio-maternal y la restauración de la receptividad uterina podría ser mejorada mediante el uso de medicina regenerativa.

La medicina regenerativa posee varias aplicaciones en el tratamiento de muchas patologías tanto en humanos como en medicina veterinaria. Estos tratamientos están basados en el uso de MSC.

Las MSCs son células multipotentes, que pueden ser aisladas desde varios tejidos de animales adultos, incluyendo la especie equina. En la actualidad, en medicina regenerativa del equino, las MSC son consideradas, principalmente, en función de múltiples fuentes de obtención, simplicidad de aislamiento, además de la capacidad de modular las respuestas inmunes y la inflamación, y su potencial regenerativo previniendo la formación de cicatrices (Stewart y Stewart, 2011).

En equinos, las MSCs han sido aisladas y caracterizadas principalmente a partir de tejido adiposo (AT-MSc) (Vidal et al., 2007; Ranera et al., 2012; Esteves et al., 2017), médula ósea (BM-MSc) (Frisbie y Smith, 2010; Eslaminejad et al., 2009) cordón umbilical (UCT-MSc), sangre de cordón umbilical (CB-MSc), células derivadas de fluido amniótico (AMC) (Iacono et al., 2012; Lange-Consiglio et al., 2011; Coli et al., 2011) y tejido endometrial (ET-MSc) (Cabezas et al., 2018, Navarrete et al., 2020), entre otros.

Como se esperaba, en este estudio, las células obtenidas de biopsias de animales vivos también produjeron MSC según lo juzgado por sus propiedades

biológicas, como la adherencia al plástico, la expresión de marcadores de superficie y la diferenciación hacia derivados mesodérmicos osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos.

Sin embargo, hasta la fecha, no existe un método de aislamiento estándar de cualquier tejido en equinos. Los pasos de aislamiento a menudo son seguidos por el mantenimiento de las células en material de cultivo plásticos, en condiciones ideales de crecimiento celular (Bourzac et al., 2010).

De los criterios recomendados por la ISCT para caracterizar las MSCs, aquellos que tienen relación con la adherencia al plástico y pluripotencia son los que normalmente se comparten entre las diferentes MSCs. (Guest et al., 2008; De Schauwer et al., 2012). La variedad de fenotipos celulares entre y dentro de los aislados celulares es bien reconocida en medicina regenerativa equina (Giovannini et al., 2008). En este sentido, falta por establecer consenso sobre la expresión de marcadores de superficie. Estas diferencias estarían explicadas, en parte, a diferencias en la fuente de obtención de las MSCs, forma de aislamiento y anticuerpos utilizados, los cuales no todos son especie específicos (Radcliffe et al., 2009; Ranera et al., 2011; De Schauwer et al., 2012; Colleoni et al., 2009). Por lo tanto, el inmunofenotipo de las MSCs sería dinámico, cambiando durante el transcurso del cultivo, lo que podría alterar sus características biológicas. (Mosna et al., 2010; Strioga et al., 2012) Esto fue demostrado por nuestro grupo de investigación, donde una limitada expresión de marcadores de superficie

(CD44, CD90, MHC-I) podría afectar la capacidad de migración de ET-MSC comparadas con AT-MSC (Cabezas et al., 2018). Lo mismo se ha reportado con respecto a la capacidad de expresar Oct-4, Sox-2 y Nanog y el potencial de diferenciación hacia diferentes linajes mesenquimales neurogénico, miogénico y hepatogénico. (Pennington et al., 2016).

En respuesta a esta situación, el uso de citometría de flujo multicolor permitiría discriminar diferentes fenotipos celulares a partir de la presencia o ausencia de múltiples antígenos de superficie y proteínas intracitoplasmáticas simultáneamente (De Schauwer et al., 2012).

Utilizando medios de diferenciación comerciales de la línea STEMPRO® se evaluó la capacidad que tienen las células madre mesenquimales putativas, provenientes de ambos orígenes, para diferenciarse hacia los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico. Para ambas fuentes se logró la correcta diferenciación hacia los linajes mesodermales mencionados anteriormente. Sin embargo, los medios de inducción utilizados, para el proceso de diferenciación *in vitro*, generan condiciones ambientales que no necesariamente replican condiciones naturales. La mayoría de estos medios comerciales posee moléculas bioactivas que regulan positivamente la expresión de genes, que son específicos para cada linaje, así mismo, proveen componentes necesarios para la posterior generación de productos intra

(adipogenesis) y extra (condrogénesis y osteogénesis) celulares (López y Jarazo. 2015).

Diferencias inevitables también se obtienen cuando comparamos condiciones *in vitro* e *in vivo*, principalmente en lo que tiene relación con las concentraciones de oxígeno (20% de oxígeno en incubadoras vs 1-8% presente en médula ósea y tejido adiposo). Esto también se ha visto reflejado en algunos estudios, en donde se compara el potencial de proliferación y expresión de genes de pluripotencia en condiciones diferentes de presión de O<sub>2</sub> (20% vs 5%), entre células mesenquimales obtenidas de diferente fuente (ASC vs BMSC) (Ranera et al., 2012). En otro reporte, se observó que, en células mesenquimales derivadas de médula ósea, la expresión de genes ligados a condrogénesis y el depósito de glicosaminoglicano sulfatados fueron aumentados, cuando la tensión de O<sub>2</sub> fue menor, mientras que la adipogénesis, osteogénesis, así como la proliferación no se vio afectada (Ranera et al., 2013).

Independientemente de la madurez y la fuente de obtención, las células no diferenciadas, aisladas de un tejido dado no son idénticos. Incluso aquellos aislados desde el macizo celular interno (MCI) de los blastocistos puede variar en el potencial de desarrollo (Thomson et al., 1998). La heterogeneidad entre las células dentro de un tejido aumenta con la edad del donante, lo que tendría relación con el grado de especialización (da Silva Meirelles et al., 2009). La variedad de fenotipos celulares entre y dentro de aislamientos celulares es bien

reconocido en medicina regenerativa equina (Giovannini et al., 2008; Reed y Johnson, 2008). Los fenotipos celulares específicos se seleccionan en muchas etapas durante el proceso de aislamiento y cultivo celular, incluido el proceso de dar “pases” (separando células desde la placa de cultivo y agregándolas a otro) (Toupadakis et al., 2010).

Factores epigenéticos se cree que contribuyen a la capacidad de las células para diferenciarse en el tejido del que se derivaron (Eilertsen et al., 2008), un concepto que ha sido abordado en estudios en equinos (Crovace et al., 2007; Toupadakis et al., 2010). Sin embargo, los resultados no son concluyentes.

Además de la fuente de obtención, el estado de salud individual puede influir en la viabilidad celular y, por lo tanto, en los resultados clínicos. En el síndrome metabólico equino (enfermedad de resistencia a la insulina), las AT-MSc tienen un potencial de diferenciación limitado y son senescentes (Marycz et al., 2016). En este mismo sentido MSC obtenidas a partir de tejidos sinoviales sanos y enfermos muestran características comparables de fenotipo y multipotencia, sin embargo, el potencial condrogénico es mejor cuando se obtiene a partir de tejidos sanos (Fülber et al., 2016).

Nuestro laboratorio demostró que las células madre mesenquimales equinas, derivadas de cadáveres, tanto de tejido endometrial como adiposo comparten propiedades biológicas significativas, pero tienen un patrón distintivo de marcadores de superficie y migración tal como fue posible observar en el

presente estudio (Cabezas et al., 2018). Esto podría verse reflejado en el perfil transcriptómico, permitiendo establecer, con mayor claridad, características distintivas de las células madre endometriales y adiposas.

En esta investigación se usaron animales vivos para analizar las semejanzas y diferencias entre los orígenes de las células. Nosotros y otros equipos de investigación, hemos demostrado que las células madre mesenquimales endometriales equinas tuvieron un rendimiento superior en la diferenciación osteogénica, muscular lisa, producción de péptidos antibacterianos y un mayor número de UFC en comparación con las células adiposas o de médula ósea (Khatun et al., 2017; Rink et al., 2017; Cabezas, et al., 2018). Se encontraron diferencias similares para el MSC endometrial humanas y bovinas (Lara et al., 2017). Sin embargo, tales ensayos *in vitro* tienen limitaciones en su capacidad para evaluar una gama más amplia de funciones biológicas. La tecnología NGS permite análisis más profundos que abarcan la expresión de decenas de miles de genes, en un ensayo de alto rendimiento con alta resolución y confiabilidad.

Para el análisis de datos mediante NGS, se agruparon por separado las AT-MSC y ET-MSC. Sin embargo, cabe señalar que una muestra biológica (correspondiente a ET-MSC) tuvo un compartimento más cercano a AT-MSC que a células endometriales. Esto puede deberse a la mezcla de poblaciones de células presentes en las biopsias, que no se logran separar efectivamente en el cultivo primario, dicho efecto se ha descrito anteriormente, cuando se usaron

cultivos primarios mixtos en ganado bovino (Lara, et al., 2018) y equinos (Castro et al., 2014, Cabezas, et al., 2018). Además, esto también puede apuntar a la influencia del ciclo estral o del estado metabólico del donante o de esta muestra en particular. Sin embargo, no podemos descartar este efecto, ya que no evaluamos ni el estro ni medimos las hormonas relacionadas en los donantes.

En la práctica de la investigación transcriptómica, uno de los principales productos es una enorme lista de genes expresados, transcritos y exones. Sin embargo, estos datos no tienen valor mientras no se evalúe la expresión diferencial y, lo que es más importante, el análisis de las vías de señalización. Encontramos 125 genes sobreexpresados y 51 subexpresados en el ET-MS, los que mediante la generación de clústers fueron analizados a través de mapas de calor. Cuando se realizó una exploración más profunda de los genes diferencialmente expresados, mediante el análisis de la vía de enriquecimiento, se detectaron diferencias notables entre las vías de señalización en cada origen celular.

El tejido endometrial presentó elementos de la vía de señalización Hippo expresados positivamente, esto no es sorprendente ya que a nivel endometrial se requiere esta señalización para la remodelación tisular, específicamente durante la fase secretora (Zhu et al., 2015, 2017). Se ha observado que Hippo puede activar RUNX2 favoreciendo una diferenciación de MSC al linaje osteogénico mientras disminuye la diferenciación adipogénica (Liu et al., 2012).

En vista de lo anterior, es digno de mencionar que tanto la vía de adhesión focal como la vía de actina estaban reguladas positivamente en los ET-MSCs, esto podría conducir a una predisposición hacia la diferenciación osteogénica y a una diferenciación adipogénica limitada, fenómeno observado en el presente estudio, y que se relaciona con lo observado por Cabezas, et al., 2018 células madre endometriales equinas.

La vía TGF- $\beta$  también fue regulada positivamente en ET-MSCs. Su expresión dinámica durante la fase secretora del ciclo estral potencialmente genera interacciones con la vía Hippo, a través de YAP-TAZ (Omwandho et al., 2010), generando una producción excesiva de matriz extracelular (Hiemer et al., 2014). Esto podría explicar, la regulación positiva de los receptores de ECM y las vías de adhesión focal en ET-MSCs observadas en este estudio, y nuevamente podría explicar la menor capacidad de migración de las ET-MSCs en comparación con AT-MSCs reportadas en este estudio y anteriormente por Cabezas, et al., 2018.

La ruta MAPK también se reguló positivamente en ET-MSCs, esto puede favorecer la diferenciación condrogénica a través de efectores SMAD de TGF- $\beta$  según lo informado por Khanmohammadi et al., (2012).

En el presente estudio, las vías de señalización que controlan la pluripotencia de las células madre y la ruta de Hedgehog (Shh) se regularon positivamente en el ET-MSCs. Estas vías impactan en la mantención de la plasticidad de varias MSC inactivas (Petrova y Joyner, 2014). Esta característica podría favorecer la

posibilidad de diferenciación a otros linajes no mesodérmicos, como la neurogénica. De hecho, las vías de señalización neurogénica, como la orientación axonal, la señalización de neurotrofinas y PI3K/AKT, juegan un papel importante en el rompecabezas regulador y de diferenciación de la ontogenia neuronal (Lee et al., 2007; Hossini et al., 2016; Pramanik et al., 2017) también fueron regulados de forma positiva.

La diferenciación neurogénica realizada en este estudio demostró que las MSC experimentaron al menos algunas etapas de desarrollo neuronal, las que fueron identificadas cuando células de ambas fuentes fueron sembradas a baja confluencia, en donde fue posible observar proyecciones y estructuras tipo neuronales. Los precursores de neuronas inmaduras se determinaron mediante tinción anti-tubulina III y microglia mediante tinción de CD68 en ensayos de inmunohistoquímica. Mediante PCR se confirmó una sobreexpresión de MAP2, un marcador de neuronas maduras solo en ET-MSC y, aunque las células mostraron características morfológicas indicativas de un cambio en un fenotipo neurogénico, las microglías o las neuronas inmaduras típicas no fueron cuantificadas.

Otros autores mostraron el potencial neuronal de ET-MSC humanas que se convirtieron en progenitores oligodendrocíticos, neuronas motoras y poseían una respuesta neurogénica a b-FGF y NGF (Shoae-Hassani et al., 2011; Ebrahimi-Barough et al., 2013; Azami et al., 2013). Nuestros hallazgos abren nuevas

opciones para el tratamiento veterinario equino contra enfermedades como el síndrome de Stringhalt y la hemiplejia laríngea, ambas tratadas quirúrgicamente.

La diferenciación cardiomiogénica realizada en este estudio, permitió evidenciar diferencias en el nivel de expresión de genes vinculados con la diferenciación cardiomiogénica, entre MSC derivadas de diferente fuente. En este caso las ET-MSC tras la inducción se observó un mayor perfil de expresión de MEF2C comparadas con AT-MSC. Este gen es sindicado como un factor regulador clave en la activación de las vías transcripcionales involucradas en la diferenciación cardiomiocítica (Goldenthal y Marín-García, 2003). MEF2C precede (y media a su vez) la activación de la expresión de marcadores precoces, intermedios y terminales de diferenciación de células cardíacas incluyendo factor natriurético auricular (FNA) y péptido natriurético tipo B (PNB), cadena ligera de miosina (CLM), cadena pesada de  $\alpha$  (codificada por en gen MYH6) y  $\beta$  -miosina y troponina cardíaca C (Goldenthal y Marín-García, 2003).

La diferenciación cardiomiocítica ha sido establecida en modelos murino (Doevendans et al., 2000) y humanos (Muller et al., 2000, Toma et al., 2002) *in vitro*, mientras que en equinos, existe evidencia de diferenciación miogénica en células madre pluripotentes inducidas (Quattrocelli et al., 2016), y en AT-MSC usando vectores lentivirales (Sung et al., 2016), MSC derivadas de cordón umbilical (Reed y Johnson 2007), mientras que no ha sido reportado antes bajo las condiciones de este estudio, en particular para ET-MSC. Al respecto, esto es

una gran oportunidad de abordar estudios posteriores nuestro laboratorio, que puedan apoyar en el uso potencial que puede tener las MSC en afecciones musculares o cardiacas.

Las MSC ejercen su acción mediante mecanismos diferentes, aún no claramente definidos, que incluyen la secreción de una gran cantidad de factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , EGF, VEGF, otros mediadores no proteicos comoIDO, INOS, PGE<sub>2</sub> y también citoquinas (IL-1RA, IL-10) que promueven una correcta regeneración de la lesión (Perrini, et al., 2016; Branly, et al., 2018), a través de la inhibición de la apoptosis y fibrosis, aumento de la angiogénesis, mitosis y/o diferenciación de células progenitoras residentes y a través de la modulación de la respuesta inmune (Yagi et al., 2010). Hoy en día se acepta la existencia de un mecanismo paracrino entre las MSC y las células blanco, En este proceso podrían estar involucradas las vesículas extracelulares como un componente integral en la comunicación célula-célula.

La abundancia de VE secretadas por MSC también puede variar dependiendo de la fuente (Iacono et al., 2017). Las VE tienen el potencial de reducir, *in vitro*, la tasa de apoptosis en células endometriales equinas, aumentar la proliferación celular, regular a la baja la expresión de genes proinflamatorios y disminuir la secreción de citocinas proinflamatorias (Perrini et al., 2016).

Las VE contienen varias moléculas activas como lípidos, proteínas, ARNm y miARN. Estas VE se han utilizado *in vitro* e *in vivo* para reparar el daño tisular,

aumentando la tasa de curación (Biancone et al., 2012; Bruno et al., 2012) Estos principios bioactivos son parte de la secretómica y parecen ser, parcialmente responsables de los efectos terapéuticos de MSC.

La secuenciación del miARNoma de las VE secretadas por las células adiposas y endometriales en este trabajo reforzó los hallazgos del transcriptoma de ARNm, lo que demuestra que AT-MSC y ET-MSC tienen diferentes perfiles de ARN, que probablemente deben representar la naturaleza del nicho del que fueron aislados.

Las AT-MSC secretan miARN presentes en VE que están implicados principalmente en la regulación de las vías KEGG relacionadas con el metabolismo, la biosíntesis de ácidos grasos, la degradación de lisina y el procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, la misma tendencia que en nuestro análisis transcriptómico de ARNm anterior, indicativo de una alta actividad mitocondrial y mayor tasas de proliferación (Mischen et al., 2008).

Los miARN más expresados diferencialmente en AT-MSC fueron mir-9a y mir-34a, que son específicos del tejido adiposo y están relacionados con procesos de obesidad (Jing et al., 2011; Fu et al., 2012; Pan et al., 2018) con potencial terapéutico comprobado para reprimir la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 en AT-MSC humanas (mir-9; (Qian et al., 2017). Mir-9a también promovió la diferenciación neuronal de BM-MSC al reprimir la proteína Notch-1 y mejorar la proteína MAP2 (Jing et al., 2011). Es posible hipotetizar que la diferenciación neurogénica de AT-MSC que se muestra

en el presente estudio, podría estar mediada por este miARN particular. Por otro lado, mir-34a tiene actividad supresora de tumores y es una herramienta prometedora en oncología, debido a que apunta a numerosos reguladores de la proliferación de células cancerosas y la resistencia a la quimioterapia (Misso et al., 2014; Zhang et al., 2019) y también tiene potencial de diferenciación osteogénica en MSC de rata (Liu et al., 2019).

En el caso de las ET-MS, a partir de los miARN secretados en VE, tres vías involucradas en la reorganización de la matriz extracelular fueron las más representadas, lo que está en concordancia con nuestros hallazgos transcriptómicos, a su vez esto puede estar relacionado con el entorno dinámico del endometrio y el papel fundamental de MSC para mantener la homeostasis del tejido (Lara et al., 2018).

Dos miARNs; mir-380 y mir-122 fueron sobreexpresados en ET-MS. Estos miARNs participan en la regulación de la apoptosis, la adhesión celular y controlan la transición epitelial/mesenquimal (TEM) en la línea celular de cáncer de ovario humano SKOV3 (mir-380; Su et al., 2017). Mir-122 es un modulador clave en la fibrosis hepática al regular negativamente la proliferación y transactivación de las células estrelladas hepáticas (Zeng et al., 2015). Lou et al., 2017 sobreexpresaron mir-122 en AT-MS humanas y mejoraron la eficacia terapéutica contra la fibrosis hepática causada por el tetracloruro de carbono, mejorando la deposición de colágeno y suprimiendo la activación de las células

estrelladas hepáticas. Otro remodelador de ECM expresado fue let-7e, su represión induce una regulación positiva del colágeno y una deposición excesiva (Dangi-Garimella et al 2011; Makino et al., 2013).

De interés, mir-3200 está altamente regulado en VE de ET-MSC. Se ha demostrado que este miARN tiene actividad antitumoral en tejido endometrial (Zhu, et al., 2018). Otros miARN identificados en este estudio también están relacionados con la actividad antitumoral en diferentes órganos y tejidos, como mir-369-3p en tejidos gástricos (Dong et al., 2019), mir-329a en neuroblastoma (Yang et al., 2014).

Las células definen su fenotipo, plasticidad y características biológicas de acuerdo con el origen de estas (Lander, et al., 2012). En ese sentido, el MSC humanas y animales mostraron propiedades de proliferación e inmunomoduladoras distintas dependiendo del tejido donante (Phinney, et al., 1999; Patel y Genovese, 2011; Carrade y Borjesson, 2013). El perfil de expresión diferencial de ARN de las células, incluida su red de miARN permite esbozar su identidad biológica y comprender el papel real del nicho.

Aquí, la señalización de TGF- $\beta$  y las vías de pluripotencia de las células madre coinciden como altamente reguladas en ET-MSC, tanto en el perfil transcriptómico como en el de miARN-VE, señalando como una característica diferencial clave de estas células con respecto a AT-MSC del mismo animal. Probablemente, el endometrio requiere un momento más preciso en la regulación

de la expresión génica. Además, la señalización del ciclo celular y la vía Foxo vinculadas con la regulación de PTEN y PI3K / AKT, que están alteradas en ET-MSC de este estudio, podrían permitir una renovación y remodelación de tejido celular más intensa en comparación con AT-MSC (Gan, et al., 2008).

Perfilar la carga de miARN de VE secretada por ET-MSC podría ayudar en el diseño e implementación de terapias contra trastornos relacionados con ECM como la fibrosis en diferentes órganos y enfermedades relacionadas con el cáncer. En este contexto, aprovechar la comunicación cruzada mediada por citoquinas inmunomoduladoras, factores de crecimiento, VE y proteínas de remodelación de la matriz extracelular permite preparar estrategias precisas para el tratamiento de patologías como la fibrosis uterina crónica o la endometriosis (Choi et al., 2014).

En base a los resultados obtenidos en este estudio y la discusión de estos es preciso establecer que, dependiendo de la fuente de la cual son aisladas las MSC (AT vs ET), a partir de un mismo donante, es posible establecer claras diferencias. En lo que respecta al perfil trascritómico, fue posible observar vías de señalización claramente definidas, para cada tipo celular, las que a su vez se vieron reflejadas en el perfil de miARN a través de la secreción de VE, el que también fue diferente en dependencia del nicho. A la luz de estos datos es posible considerar un tipo celular por sobre otro para posibles terapias celulares, en dependencia del tipo de patología. Es de suma importancia continuar con

caracterizaciones moleculares que incluyan MSC de otras fuentes y definir el potencial uso de estas.

Seguidamente, se estudió si las células de distintos orígenes pueden elicitar una respuesta anti inflamatoria *in vivo* en un modelo de PMIE, así como su capacidad de anidarse en el endometrio de dichas yeguas. En el presente trabajo, se indujo inflamación en todas las yeguas tras la inoculación de espermatozoides muertos, según el recuento de PMN y la expresión de marcadores inflamatorios específicos.

De acuerdo con lo anterior, tres horas después del desafío con espermatozoides, hubo un aumento significativo en el recuento de PMN en todas las yeguas en comparación con las mediciones de referencia. Los neutrófilos migran a la luz uterina en 30 minutos (Katila, 1995) y tienen una respuesta inflamatoria máxima entre 6 y 12 h (Troedsson, 1999). En yeguas susceptibles a PMIE, la neutrofilia puede ocurrir tan pronto como 2 a 12 horas después de la monta (Woodward et al., 2013a). Otros estudios indican una disminución en el número de neutrófilos en el endometrio junto con un aumento en la respuesta antiinflamatoria, cuando se infundieron MSC derivados de la médula ósea antes de la inseminación de yeguas sanas (Ferris et al., 2014).

Las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  aumentaron según lo observado en las pruebas de ELISA y los ensayos de inmunohistoquímica. Esto fue validado por la expresión génica de los marcadores mencionados mediante RT-qPCR. Tal como propusieron Fumuso y colaboradores en 2003, el incremento de proteínas

señalizadoras, tales como IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ , son las responsables de la modulación de la respuesta inflamatoria aguda, cumpliendo un rol regulatorio en la recuperación de la endometritis durante el estro. Un aumento en la expresión de IL-6 y TNF- $\alpha$  a nivel de proteínas, y de IL-1 e IL-8 a niveles de ARNm en yeguas durante la fase II, podría ser responsable de una mayor permeabilidad vascular y una fuga exacerbada de PMN, causando edema local (Contran et al., 1999) como se detecta en la inmunohistoquímica.

En el caso de IL-6, esta citoquina podría actuar inicialmente, promoviendo la inflamación aguda y el reclutamiento de PMNs, sin embargo, luego cumple un rol protector a través de la inducción de citoquinas moduladoras de la inflamación, tal como IL-1RA (Tilg et al., 1994) y la inducción de la apoptosis y fagocitosis de PMNs, llevando la inflamación a su término (Fumuso et al., 2003).

La expresión de IL-1, IL-8 y TNF- $\alpha$  es mayor en el endometrio de yeguas susceptibles a PMIE que en yeguas resistentes, incluso sin exposición al semen (Fumuso et al., 2006, 2007; Palm et al., 2008). IL-1 $\beta$  se expresa constitutivamente y se regula en el endometrio de yeguas después de la inoculación bacteriana experimental (Marth et al., 2015). Las yeguas resistentes a PMIE muestran un pico de citoquinas antiinflamatorias IL-10, IL-1RA e IL-6, dos a seis horas después de la monta, mientras que las yeguas susceptibles no pueden activar dicha respuesta antiinflamatoria (Woodward et al., 2013). Después de 48 h, se detectó la reducción de IL-6 y TNF- $\alpha$  mediante inmunotinción de biopsias y se confirmó mediante ELISA en los lavados uterinos.

La significativa reducción de PMNs, observada 48 horas después de inducir la inflamación uterina en yeguas, puede asociarse al factor de resistencia a endometritis persistente que estas poseen. Es decir, yeguas con una apropiada contractibilidad miometrial son capaces de remover por sí solas el contenido uterino resultante de la monta o IA (Nikolakopoulos y Watson, 1999), acortando la respuesta inflamatoria del útero y reduciendo, en este caso, la expresión de otras citoquinas proinflamatorias, tales como IL-8 y COX-2. En este sentido, la reducción de IL-8 también implicó una reducción de la cantidad de PMNs, posiblemente por el rol quimiotáctico que ejercen sobre éstos (Zerbe et al., 2003).

En el presente estudio la expresión de COX-2 no se vio afectada tras la inducción experimental de la inflamación. Lara et al., (2017) demostraron en las células madre endometriales bovinas desafiadas con PGE<sub>2</sub>, un fuerte aumento en las citoquinas proinflamatorias, pero no en las transcripciones de COX-2. Esto podría ser indicativo de que los niveles de COX-2 no son un paso limitante para la activación de las citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, en el presente estudio, no se cuantificó PGE<sub>2</sub> en las muestras obtenidas, mientras que Palm et al. (2008) demostraron un aumento en la COX-2 a nivel endometrial después de la exposición al plasma seminal. Otros también demostraron, en modelos celulares bovinos, que los espermatozoides pueden estimular la transcripción de

citoquinas proinflamatorias y la secreción de PGE2 sin aumentar la expresión de COX-2 (Elweza et al., 2018).

En respuesta al daño tisular las MSCs secretan una amplia gama de moléculas bioactivas que contienen componentes inmunomoduladores, tales como PGE2, TGF- $\beta$ , IL-10, antígeno leucocitario humano G (HLA-G), factor inhibidor de leucemia (LIF), IL-1RA e iNOS (da Silva et al., 2008; da Silva et al., 2009; Fioratti et al., 2012). Una de las demostraciones más concluyentes acerca de la capacidad de la MSCs para modular la respuesta inflamatoria, fue el tratamiento usando MSCs humanas en ratones con síndrome de lesión pulmonar agudo. El resultado fue una reducción de edema pulmonar, atenuación de la infiltración de neutrófilos, disminución de concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$  en plasma, fluido alveolar y tejido pulmonar, y aumento de la concentración de IL-10 e IL-1RA (Ortiz et al., 2007; Iyer y Rojas, 2008).

Particularmente en equinos, el uso de MSC se ha orientado a la reducción de la inflamación en casos de osteoartritis y promover la curación en lesiones de tendón y ligamento (Smith y Webbon, 2005; Frisbie et al., 2009). Las MSC equinas expresan STC-1 (bloquea los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno), TSG-6 (antagonista del receptor de la citoquina proinflamatoria IL-1) e IL1-RA que reducen la inflamación y también previenen la lesión del tejido inducida por hipoxia (Angelone et al., 2017). En condiciones *in vitro*, se ha demostrado que el efecto inmunomodulador de las MSC se ejerce combinando

interacciones dependientes de contacto y de factores solubles (Carrade et al., 2012).

MSC equinas aisladas de diferentes fuentes son capaces de disminuir la proliferación de leucocitos, producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  además incrementa la secreción de PGE2 e IL-6 (Carrade et al., 2012). Sin embargo, el potencial de expresar diferentes factores inmunomoduladores, especialmente NO, MHC-I e IL-6 puede variar entre células de diferente origen, no obstante, pueden producir un efecto inmunomodulador global comparable en un entorno inflamatorio (Cassano et al., 2018). En un estudio similar se determinó el perfil transcriptómico de moléculas inmunomoduladoras en MSC derivadas de diferentes fuentes. La expresión de moléculas co-estimuladoras necesarias para gatillar y amplificar la respuesta de linfocitos T helper, tras la activación de células T, CD40 y CD80 fue marcada en todas las células independiente de su fuente. Lo mismo se observó en TGF- $\beta$ , mientras que el factor de crecimiento hepático fue moderado a débilmente expresado (De Schauwer et al., 2014).

Al evaluar el anidamiento, tras la infusión de MSC equinas marcadas, a nivel uterino, se logró detectar éste en todas las yeguas infundidas, y persistió los días 10 y 30 post infusión, mientras que no se detectó anidamiento en las yeguas control. Las células en ambos casos (10 y 30 días), se incorporaron en tejidos periglandulares. Mambelli et al., (2014) informaron la diferenciación morfológica y funcional de las células del estroma endometrial glandular y periglandular,

después del trasplante de AT-MSC a nivel uterino. No está claro si estos cambios fueron inducidos por el MSC trasplantado en las células endometriales residentes, o si fueron causados por la localización, proliferación y diferenciación de las células trasplantadas.

Ensayos *in vivo* de implantación local, en tendón flexor digital superficial en equinos, de células madre embrionarias (ESC por su sigla en inglés) y MSC equinas alogénicas, demostraron que para el caso de las ESC estas persisten por hasta 90 días en el sitio de inyección, mientras que para las MSC mostraron <5% de supervivencia a los 10 días, disminuyendo en número durante el transcurso del experimento (<0.2% a los 90 días post tratamiento (Guest et al., 2010). Esto sugiere, que la propiedad de autorrenovación *per se* no se mantiene, ya que las células eventualmente desaparecen después de cierto período. En un estudio similar, se comparó el nivel de sanación tras una osteotomía bilateral del cuarto hueso metacarpiano, utilizando fibrina solamente o en combinación con MSC marcadas derivadas de periostio. En este estudio, no fue posible establecer diferencias en la tasa de sanación (medida por radiografía e histología), sin embargo, fue posible detectar la presencia de MSC hasta la semana 12 post tratamiento (Gittel et al., 2013). Por lo tanto, se cree que las MSC actúan en gran medida terapéuticamente al liberar una amplia gama de citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas y proteínas inmunomoduladoras (Stewart y Stewart, 2011).

Aunque el anidamiento de las MSC se ha documentado en algunos casos, solo un pequeño porcentaje de estas células logra injertarse con éxito en varios modelos de enfermedad endometrial (Mambelli et al., 2013; Gil-Sanchis et al., 2015). En este sentido, los datos relativos a la acción antiinflamatoria y anidamiento de MSC depositadas en el útero de las yeguas son contradictorios. Rink y colaboradores (2018), usando MSC endometriales marcadas, infundidas en el útero de yeguas sanas no detectaron anidamiento después de 24 horas, sin embargo, se observó una atenuación de la inflamación en respuesta a la infusión uterina. Mambelli et al., 2013 detectaron el anidamiento en el endometrio de yeguas con endometriosis, que se infundieron con MSC de origen adiposo marcadas con CFDA al igual que en nuestro trabajo. Se detectaron células marcadas a los 7 y 21 días, pero no al día 60, y los autores atribuyeron esto a la dilución de la fluorescencia dentro de las células. En este estudio evaluamos anidamiento en los días 10 y 30, pero no se llevó a cabo la prueba en el día 60. Por lo tanto, esta es, hasta la fecha, la duración más larga de persistencia endometrial de MSC exógenas en equinos. Si bien no se intentó cuantificar el número real de células marcadas en las biopsias, parece que el marcaje de las MSC, en el presente estudio, fue más fuerte que en el informe anterior (Mambelli et al., 2013). Una posible explicación podría ser que, tras inducir un estado inflamatorio del endometrio, se genere una interrupción en el revestimiento

epitelial, que podría actuar como un sitio de acoplamiento para un proceso de anidamiento más pronunciado.

Nuestros hallazgos y los de Mambelli et al., 2013 están en línea con un experimento de referencia *in vitro*, en el que los autores incubaron conjuntamente biopsias endometriales equinas de yeguas sanas y de yeguas con endometriosis con AT-MSc previamente marcadas (Falomo et al., 2015). Las MSC adiposas se infiltraron en el espacio periglandular y glandular a partir del día 3 en ambos tejidos, preferentemente en el patológico. Además, cuando se evaluó el perfil de expresión de varias citoquinas pro y antiinflamatorias mediante qPCR, en el tejido endometrial equino, se encontró un aumento de los niveles de expresión de IL-6 e IL-8 en ambos grupos. Esto está en concordancia con nuestros resultados *in vivo* descritos en este documento. A la inversa de los resultados obtenidos en este estudio, los autores encontraron una disminución en los niveles de expresión de IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ . Sin embargo, los estudios *in vitro* no reflejan, necesariamente, el equilibrio mucho más complejo del escenario *in vivo* pro y antiinflamatorio.

En este sentido, existen factores como la variabilidad en los métodos de cultivo, fuentes celulares, métodos de administración, número de células, ruta y tipo de administración y pasaje de las células utilizadas, que pueden influenciar el resultado deseado, respondiendo de manera diferente a los estímulos

ambientales. Por lo tanto, los ensayos preclínicos que incorporen evaluaciones múltiples, durante un período de tiempo significativo, son vitales para desarrollar tratamientos estandarizados. (Lopez y Jarazo, 2015).

En general, se puede proponer que, dado el bajo número de células detectadas y la disminución de los marcadores inflamatorios después de la inoculación de las células, las MSC ejerce su función antiinflamatoria preferentemente por un mecanismo paracrino y no necesariamente por anidación y proliferación, aunque ambos eventos ocurren.

Finalmente, tras la discusión de los resultados obtenidos, es necesario definir proyecciones que permitan establecer herramientas que complementen este estudio, así como contribuir al estudio y uso de MSC en medicina veterinaria, como por ejemplo el uso de herramientas bioinformáticas, que podrían ayudar a desarrollar perfiles más específicos de MSC, cruciales para un tratamiento dirigido y acciones terapéuticas focalizadas. Así mismo, puede ser posible identificar moléculas y vías involucradas, en dependencia del nicho que, de acuerdo con uno de los objetivos de este trabajo, abre una posibilidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos en la medicina regenerativa del equino, donde el MSC endometrial, así como su perfil secretor podría desempeñar un papel importante.

Como resumen se presenta la tabla 15, que permite tener una imagen global de los resultados obtenidos en el presente trabajo.

**Tabla 15.** Resumen de parámetros medidos y comparados entre células equinas obtenidas desde diferente origen (endometriales y adiposas). Fuente: Elaboración propia.

Parámetro	Células endometriales	Células adiposas
Expresión de marcadores de superficie	+++	+
Migración		
• SDF1- $\alpha$	+	+
• PGE <sub>2</sub>	+	+
Tri-potencia		
• Condrogénesis	+	+
• Adipogénesis	+	+
• Osteogénesis	+	+
Diferenciación		
Neurogénica		
• B-III Tubulina	+	+
• CD68	+	+
• Morfología	±	±

Diferenciación

cardiomiogénica

• MEF2C	++	+
• MYH6	+	++
• TNNT2	+	++

---

Perfil transcriptómico

125 genes sobre expresados.

51 genes sobre expresados.

Vías relevantes: PI3K-AKT y TGF $\beta$ , señalización Hippo y

Vías relevantes: biogénesis ribosomal, biosíntesis de tARN, metabolismo de carbono y síntesis de aminoácidos

regulación de pluripotencia

Perfil de miARN en VEs

mir-380, mir-122 y mir-3200

mir-9a y mir-34a

Vías relevantes: adherencia e interacción ECM-receptor, las vías cancerosas, TGF- $\beta$ , Foxo y vías de señalización de pluripotencia.

Vías relevantes: metabolismo celular y los proteoglicanos en el cáncer

---

Potencial

inmunomodulador *in vivo*

- PMNs	+	+
- ELISA (IL-6 y TNF- $\alpha$ )	++	++
- RT-qPCR	-	+

---

IL-1 $\alpha$	+	+
IL-6	+	+
IL-8	+	+
TFN- $\alpha$	-	-
COX-2	+	-
IL-10		
Anidamiento		
- Epitelio glandular	+	+
- Estroma	+	+

---



## VIII. CONCLUSIONES

1. En el presente estudio, se aislaron MSC de tejido adiposo y endometrial de un mismo donante, que cumplían con las propiedades biológicas típicas de dichas células, tales como adherencia al plástico, expresión de marcadores de superficie, potencial de migración y la diferenciación hacia derivados mesodérmicos clásicos tales como: osteogénico, condrogénico y adipogénico. No obstante, hubo diferencias entre las células, lo cual podría ser atribuible al origen de estas.
2. Aquí presentamos evidencias de una mayor plasticidad de las MSC equinas, particularmente de las MSC endometriales, que se diferenciaron de los tres linajes mesodérmicos canónicos junto con la diferenciación neuro y cardiomiogénica. Esto, hasta donde se conoce, aún no se ha reportado.
3. El nicho original del que se aíslan las MSC define tanto sus atributos biológicos, así como el perfil transcriptómico de las células, observándose patrones de expresión génica claramente definidas y diferenciadas entre células de diferente origen, incluida la secreción de VE para garantizar una comunicación adecuada con su entorno intrínseco y la homeostasis tisular.
4. La administración intrauterina de MSC redujo la inflamación asociada a endometritis inducida postmonta, independiente del origen de las células

(adiposas o endometriales). Ambos tipos de células se anidaron en el endometrio, hasta los 30 días post inoculación.



## IX. REFERENCIAS.

1. Adair, T., 2005. Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am. J. Physiol.* 289. DOI: 10.1152/ajpregu.00840.2004.
2. Anitua, E., Nurden, P., Prado, R., Nurden, A., Padilla, S. 2019. Autologous fibrin scaffolds: When platelet- and plasma-derived biomolecules meet fibrin. *Biomaterials*; 192, 440–460. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.11.029.
3. Alghamdi, A., Foster, D. 2005. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophil extracellular traps. *Biol Reprod* 73, 1174–1181. DOI: 10.1095/biolreprod.105.045666.
4. Alghamdi, A., Foster, D., Troedsson M. 2004. Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils and improves fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. *Reproduction*; 127: 593–600. DOI: 10.1530/rep.1.00096.
5. Alghamdi, A., Lovaas, B., Bird, S., Lamb, G., Rendahl, A., Taube, P., Foster, D. 2009. Species-specific interaction of seminal plasma on sperm–neutrophil binding. *Anim Reprod Sci*; 114, 331–344. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.10.015.
6. Alghamdi, A., Foster, D., Carlson C., Troedsson, M. 2005 Nitric oxide levels and nitric oxide synthase expression in uterine samples from mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis. *Am. J. Reprod. Immunol.*; 53, 230-237. DOI: 10.1111/j.1600-0897.2005.00270.x.
7. Allen W. 1993. Equine endometritis: John Hughes international workshop. *Equine Vet J* 25, 184-193.
8. Amable, P., Teixeira, M., Carias, G., Granjeiro, J., Borojevic, R. 2014. Gene expression and protein secretion during human mesenchymal

cell differentiation into adipogenic cells. *BMC Cell Biology*, 15(1), 1–10. DOI: 10.1186/s12860-014-0046-0.

9. Angelone, M., Conti, V., Biacca, C. 2017. The Contribution of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma to the Treatment of Chronic Equine Laminitis: A Proof of Concept. *Int J Mol Sci* 2017;18:2122. DOI: 10.3390/ijms18102122.
10. Arufe, C., De la Fuente, A., Mateos, J., Fuentes, I., De Toro, F., Blanco, F. 2011. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev.*; 20(7):1199-1212. doi:10.1089/scd.2010.0315.
11. Atamas, S. 2002. Complex cytokine regulation of tissue fibrosis. *Life Sci* 72, 631–643. DOI: 10.1016/S0024-3205(02)02299-3.
12. Azami, M., Ai, J., Ebrahimi-Barough, S., Farokhic, M., Fard, S. 2013. In vitro evaluation of biomimetic nanocomposite scaffold using endometrial stem cell derived osteoblast-like cells. *Tissue and Cell*, 45(5), 328-337. DOI:10.1016/j.tice.2013.05.002.
13. Barbero, A., Ploegert, S., Heberer, M., Martin, I. 2003. Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 48, 1315–1325. DOI: 10.1002/art.10950.
14. Barnes, P. 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci*; 94(6):557–72. DOI: 10.1042/cs0940557.
15. Barturen, G., Rueda, A., Hamberg, M., Alganza, A., Lebron, R., Kotsyfakis, M., Hackenberg, M. (2014). sRNAbench: profiling of small RNAs and its sequence variants in single or multi-species high-throughput experiments. *Methods Next-Generation Seq*, 1, 21–31. [https://doi:10.2478/mngs-2014-0001](https://doi.org/10.2478/mngs-2014-0001).
16. Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., Henriques-Normark, B. 2006. An endonuclease allows *Streptococcus*

pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* 16, 401–407. DOI: 10.1016/j.cub.2006.01.056.

17. Berinstein, A., Piatti, P., Gaggino, O., Schudel, A., Sadir, A. 1991, Enhancement of the immune response elicited with foot-and-mouth disease virus vaccines by an extract of the *Mycobacterium* sp. wall. *Vaccine* 9, 883-888. DOI: 10.1016/0264-410X(91)90008-T.
18. Bernardo, M., Fibbe, W. 2013. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* 13 (3) 392-402. DOI: 10.1016/j.stem.2013.09.006.
19. Berry-Miller, S. 2012. Continued use of unproven stem cell therapies in the clinic: the need for controlled studies that demonstrate efficacy and preclinical studies to optimize treatment. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 03(04), 3–5. DOI: 10.4172/2157-7579.1000e107.
20. Biancone, L., Bruno, S., Deregibus, M.C., Tetta, C., Camussi, G. 2012. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant*. 27(8):3037–42. DOI: 10.1093/ndt/gfs168.
21. Bockeria, L., Bogin, V., Bockeria, O., Le, T., Alekryan, B., Woods, E., Brown, A., Ichim, T., Patel, A. 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *J Transl Med.*, 11, 56. DOI: 10.1186/1479-5876-11-56.
22. Boswell, S., Cole, B., Sundman, E., Karas, V., Fortier, L. 2012. Platelet-rich plasma: A milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*; 28, 429–439. DOI: 10.1016/j.arthro.2011.10.018.
23. Branly, T., Contentin, R., Desancé, M., Jacquet, T., Bertoni, L., Jacquet, S., Galéra, P. 2018. Improvement of the Chondrocyte-Specific Phenotype upon Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Differentiation: Influence of Culture Time, Transforming Growth Factors and Type I Collagen siRNAs on the Differentiation Index. *Int. J. Mol. Sci*, 19(2), 435. DOI:10.3390/ijms19020435.

24. Brehm, W., Aklin, B., Yamashita, T., Rieserx, F., Trub, T., Jakob, P., Mainil-Varlet, P. 2006. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage* 14, 1214–1226. DOI: 10.1016/j.joca.2006.05.002.
25. Brinkmann, V. 2011. Neutrophil extracellular traps in microbial infections. In: Tacchini-Cottier F, Zandbergen G (eds), *Neutrophils in Infectious Diseases*. Bentham eBooks, Dubai, pp. 3–10. DOI: 10.2174/978160805023911101010003.
26. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
27. Brinkmann, V., Zychlinsky, A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol* 198, 773–783. DOI: 10.1083/jcb.201203170.
28. Brinsko, S., Blanchard, T., Varner, D., Schumacher, J., Love, C., Hinrichs, K., Hartman, D. 2011. *Manual of Equine Reproduction (THIRD EDITION)*. CHAPTER 6. Endometritis, 73-84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-06482-8.00015-6>.
29. Brinsko, S., Rigby, S., Varner, D., Blanchard, T. 2003. A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis. *Proc. Am. Ass Equine Practnrs.* 49, 363-365.
30. Bruno, S., Grange, C., Collino, F., Deregibus, M.C., Cantaluppi, V., Biancone, L., Tetta, C., Camussi, G. 2012. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 7(3). DOI: 10.1371/journal.pone.0033115.
31. Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Staroniewicz, Z., Siemieniuch, MJ. 2014. Comparison of the biopsy and cytobrush

techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reprod Biol Endocrinol.*;12:27. DOI: 10.1186/1477-7827-12-27.

32. Burr, S., Dazzi, F., Garden, O. 2013. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol. Cell Biol.*; 91 12–18. DOI: 10.1038/icb.2012.60.
33. Bourzac, C., Smith, L., Vincent, P., Beauchamp, G., Lavoie, J.P. and Laverty, S. 2010. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet. J.* 42, 519-527. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00098.x.
34. Cabezas, J., Lara, E., Pacha, P., Rojas, D., Veraguas, D., Saravia, F., Rodríguez-Alvarez, LI., Castro, F. 2014. The Endometrium of Cycling Cows Contains Populations of Putative Mesenchymal Progenitor Cells. *Reprod Dom Anim.* 1-10. DOI: 10.1111/rda.12309.
35. Cabezas, J., Rojas, D., Navarrete, F., Ortiz, R., Rivera, G., Rodríguez-Alvarez, LI., Castro, FO. 2017. Equine mesenchymal stem cells derived from endometrial or adipose tissue share significant biological properties, but have distinctive pattern of surface markers and migration. *Theriogenology.* 106. 10.1016/j.theriogenology.2017.09.035.
36. Cadario, ME. 2014. Revisiting the diagnosis and the treatment options for an old problem: Chronic and post-breeding endometritis in the mare. *The Practitioner.*; 1:21-25. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x.
37. Caplan, A. 2008. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell* 3 229–230. DOI: 10.1016/j.stem.2008.08.008.
38. Caplan, A., Correa, D. 2011. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*; 9 11–15. DOI: 10.1016/j.stem.2011.06.008.
39. Caplan, A., Dennis, J. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98 1076–1084. DOI: 10.1002/jcb.20886.

40. Caplan, A., Sorrell, J. 2015. The MSC curtain that stops the immune system. *Immunology Letters*. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.06.005.
41. Caplan, A. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. Orthopaedic Research Society, 9(5), 641–50. DOI: 10.1002/jor.1100090504.
42. Carmeliet, P., Jain, R. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 473 298–307.
43. Carnevale, E., Ginther, O. 1992 Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. *Theriogenology* 37, 1101-1115. doi:10.1016/0093-691x(92)90108-4.
44. Carrade, D., Affolter, V., Outerbridge, C., Watson, J., Galuppo, L., Buerchler, S., Kumar, V., Walker, N. y Borjesson, D. 2011. Intradermal injections of equine allogeneic umbilical cord-derived mesenchymal stem cells are well tolerated and do not elicit immediate or delayed hypersensitivity reactions. *Cytotherapy* 13, 1180-1192. DOI: 10.3109/14653249.2011.602338.
45. Carrade, D., Borjesson, D. 2013. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells in Veterinary Species. *Comparative*, 63(3), 207-217.
46. Carrade, D., Lame, M., Kent, M., Clark, K., Walker, N., Borjesson, D. 2012. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Med*; 4:1-11. DOI: 10.3727/215517912X647217.
47. Cassano, J., Fortier, L., Hicks, R., Harman, R., Van de Walle, G. 2018. Equine mesenchymal stem cells from different sources display comparable immune related gene expression profiles in response to interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). *Vet Immunol Immunopathol*; 202. DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.06.008.

48. Castro, F., Torres, A., Cabezas, J., Rodriguez-Alvarez, L. 2014. Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. *Res Veterinary Sci*, 96(1), 95-101. DOI:10.1016/j.rvsc.2013.12.005.
49. Chan, R., Schwab, K., Gargett, C. 2004. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol. Reprod.* 70:1738–1750. DOI: 10.1095/biolreprod.103.024109.
50. Cheung, A., Liu I., Walsh, E., Miller, M. 1985, Phagocytic and killing capacities of uterine-derived polymorphonuclear leukocytes from mares resistant and susceptible to chronic endometritis. *Am. J. Vet. Res.* 46, 1938-1940. DOI: 10.1095/biolreprod35.5.1168.
51. Christoffersen, M., Baagoe, C., Jacobsen, S, Bojesen, A., Petersen M., Lehn- Jensen, H. 2010 Evaluation of the systemic acute phase response and endometrial gene expression of serum amyloid A and pro- and anti-inflammatory cytokines in mares with experimentally. *Vet. Immunology and Immunopathology*.138: 95-105. DOI: 10.1016/j.vetimm.2010.07.011.
52. Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A., Jacobsen, S., Petersen, M., Troedsson M., Lehn-Jensen, H. 2012 Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Vet. Res.* 8, 41. DOI: 10.1186/1746-6148-8-41.
53. Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, et al. 2009. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet Res Commun*; 33:811-21. DOI: 10.1007/s11259-009-9229-0.
54. Conran, R., Kumar, V., Collins, T., Robbins, S. 1999. Robbins Pathologic Basic of Disease, 6th ed.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA.

55. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G., Pistoia, V., Uccelli, A. 2006 Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-372. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2657.
56. Condorelli, G., Latronico, M., Cavarretta, E. 2014. microRNAs in Cardiovascular Diseases: Current Knowledge and the Road Ahead. *JACC* 63(21), 2177-2187. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.01.050.
57. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C., Corselli, M., Park, T., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 3:301–313. DOI: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
58. Crisman, M., Scarratt, W., Zimmerman, K. 2008. Blood proteins and inflammation in the horse. *Vet Clin North Am Equine Pract.*;24:285–97. DOI: 10.1016/j.cveq.2008.03.004.
59. Crovace, A., Lacitignola, L., De Siena, R., Rossi, G., Francioso, E. 2007. Cell therapy for tendon repair in horses: an experimental study. *Vet. Res. Commun.* 31, Suppl. 1, 281-283. DOI: 10.1007/s11259-007-0047-y.
60. Dangi-Garimella, S., Strouch, M., Grippo, P., Bentrem, D., Munshi H. G. 2011. Collagen regulation of let-7 in pancreatic cancer involves TGF- $\beta$ 1-mediated membrane type 1-matrix metalloproteinase expression. *Oncogene*, 30(8), 1002–1008. DOI:10.1038/onc.2010.485.
61. da Silva Meirelles, L., Caplan, A., Nardi, N. 2008. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*; 26:2287–99. DOI: 10.1634/stemcells.2007-1122.
62. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P., Nardi, N. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* 119, 2204–2213. DOI: 10.1242/jcs.02932.

63. da Silva Meirelles, L., Fontes, A., Covas, D., Caplan, A. 2009 Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev* 2009; 20:419–27. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002.
64. da Silva Meirelles, L., Sand, T., Harman, R., Lennon, D., Caplan, A. 2009. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng. Part A* 15, 221-229. DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0103.
65. de Mattos Carvalho A., Alves A., De Oliveira P., Cisneros L., Amorim R, Hussni C., Deffune E. 2011. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(1), 26–34.
66. Deppermann, C., Kubes, P. 2018. Start a fire, kill the bug: The role of platelets in inflammation and infection. *Innate Immun.* 2018, 24, 335–348. DOI: 10.1177/1753425918789255.
67. de Schauwer, C., Goossens, K., Piepers, S., Hoogewijs, M., Govaere, J., Smits, K., Meyer, E., Van Soom, A., Van de Walle, G. 2014 Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Res. Ther.* 5, 6. DOI: 10.1186/scrt395.
68. de Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G., Van Soom, A. 2011. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology.* 75(8): 1431-1443. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.00.
69. de Schauwer, C., Piepers, S., Van de Walle, G. 2012. In Search for Cross-Reactivity to Immunophenotype Equine Mesenchymal Stromal Cells by Multicolor Flow Cytometry. *Cytometry A*;81(4):312-23. DOI: 10.1002/cyto.a.22026.

70. Devaux, Y., McCann, G., Wagner, D., Squire, I. 2013. Prognostic microRNAs after AMI. *Circ Res.*; 113(5), e46-e47. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302030.
71. Díaz, I., Guisado, A., Ordoñez, A. 2016. What are the micro-RNAs? What are they? What potential benefits could be in the care context?. *CardiCore*, 51(4), 161-166. DOI: 0.1016/j.carcor.2015.02.002.
72. Dieudonne, F., Sévère, N., Biosse-Duplan, M., Weng, J., Su, Y., Marie, P. 2013. Promotion of osteoblast differentiation in mesenchymal cells through Cbl-mediated control of STAT5 activity. *Stem Cells*, 31(7), 1340–1349. DOI: 10.1002/stem.1380.
73. Dinarello, C. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*; 77(8):1627–52.
74. Doevendans, P., Kubalak, S., An, R., Becker, D., Chien, K., Kass, R. 2000. Differentiation of cardiomyocytes in floating embryoid bodies is comparable to fetal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol Life.*;32:839–851. DOI: 10.1006/jmcc.2000.1128.
75. Doig, P., Waelchli, R. 1993. Endometrial biopsy. *Equine Reproduction*. McKinnon y Voss. Lea y Febiger. Philadelphia. pp: 225-233.
76. Doig, P., Mcknight, J., Miller, R. 1981. The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.* 22: 72-76.
77. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, r I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4): 315-317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

78. Dong, L., Zhang, Z., Xu, J., Wang, F., Ma, Y., Li, F., Yu, J. 2019. Consistency analysis of micro RNA -arm expression reveals micro RNA -369-5p/3p as tumor suppressors in gastric cancer. *Molecular Oncology*, 13(7), 1605-1620. DOI10.1002/1878-0261.12527.
79. Eilertsen, K., Floyd, Z., Gimble, J. 2008. The epigenetics of adult (somatic) stem cells. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18, 189-206. DOI: 10.1615/critreveukargeneexpr.v18.i3.10.
80. Elweza, A., Ezz, M., Acosta, T., Talukder, A., Shimizu, T., Hayakawa, H., Shimada, M., Imakawa, K., Zaghloul, A., Miyamoto, A. 2018. Aproinflammatory response of bovine endometrial epithelial cells to active sperm in vitro. *Mol Reprod Dev* 2018; 85:215–226. DOI:10.1002/mrd.22955.
81. Eslaminejad, M., Taghiyar, L., Dehghan, M., Falahi, F., Kazemi Mehrjerdi, H. 2009. Equine marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, differentiation, and culture optimization. *Iran J Veterinary Res*;10(1):1-11.
82. Esteves, C., Sheldrake, T., Mesquita, S., Pesantez, J., Menghini, T., Dawson, L., et al. 2017. Isolation and characterization of equine native MSC populations. *Stem Cell Res Ther* 2017;8(1):80. DOI: 10.1186/s13287-017-0525-2.
83. Faezeh, A., Abbas, P., Hossein, K., Hesam, D. 2015. Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotype and Growth Characteristics, Gene Expression Profile and Differentiation Potentials. *Cell Journal*. 16(4):456-466. DOI: 10.22074/cellj.2015.491.
84. Falomo, M., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C., Zavan, B. 2015. Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. *Biomed Res Int.*,141485. DOI: 10.1155/2015/141485.

85. Ferris, R., Frisbie, D. y McCue, P. 2014. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology* 82, 36-42. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.02.015.
86. Fiala, S., Esmeraldino, A., Jobim, M., Garbade, P., Wolf, C., Richter, G., Gregory, R., Mattos R. 2010. Endometrial fibrotic changes. Is one biopsy enough to diagnose degenerative changes? *Anim Reprod Sci.*; 121(Suppl):89-90.
87. Filion, M., Phillips, N. 2001. Therapeutic potential of mycobacterial cell wall-DNA complexes. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 2157-2165. DOI: 10.1517/13543784.10.12.2157.
88. Fioratti, E., Villaverde, A., Melo, C., Tsunemi, M., Papa, F., Alvarenga, M. 2012. Influence of steroidal anti-inflammatory drugs on viability and fertility of equine semen. *J Equine Vet Sci*;32:771-5. DOI: 10.1016/j.jevs.2012.03.008.
89. Fischer, C., Drillich, M., Oda, S., Heuwieser, W., Einspanier, R., Gabler, C. 2010. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod Fertil Dev.*;22:818-2. DOI: 10.1071/RD09120.
90. Friedenstein, A., Piatetzky-Shapiro, Il., Petrakova, K. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.*; 16(3):381-390.
91. Frisbie, D., Kisiday, J., Kawcak, C. 2009. Evaluation of adipose-derived stromal vascular fraction or bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *J Orthop Res*;27: 1675-80. DOI: 10.1002/jor.20933.

92. Frisbie, D., Smith, R. 2010. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine Veterinary J* 2010;42(1):86-89. DOI: 10.2746/042516409X477263.
93. Fu, T., Choi, S., Kim, D., Seok, S., Suino-Powell, K., Xu, H., Kemper, J. 2012. Aberrantly elevated microRNA-34a in obesity attenuates hepatic responses to FGF19 by targeting a membrane coreceptor  $\beta$ -Klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), 16137–16142. DOI:10.1073/pnas.1205951109.
94. Fuchs, T., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., Zychlinsky, A. 2007. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 176, 231– 241. DOI: 10.1084/JEM20410IA2.
95. Fülber, J., Maria, D., Correia da Silva, L., Massoco, C., Agreste, F., Baccarin, R. 2016. Comparative study of equine mesenchymal stem cells from healthy and injured synovial tissues: an in vitro assessment. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:35. DOI: 10.1186/s13287-016-0294-3.
96. Fumuso, E., Aguilar, J., Giguire, S., Rivulgo, M., Wade, J., Rogan, D. 2007. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol*; 118 (1–2):30–9. DOI: 10.1016/j.vetimm.2007.04.009.
97. Fumuso, E., Giguire, S., Wade, J., Rogan, D., Videla-Dorna, I., Bowden, RA. 2003. Endometrial IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha, mRNA expression in mares resistant or susceptible to post-breeding endometritis. Effects of estrous cycle, artificial insemination and immunomodulation. *Vet Immunol Immunopathol*; 96(1–2):31–41. DOI: 10.1016/s0165-2427(03)00137-5.
98. Gan, B., Sahin, E., Jiang, S., Sanchez-Aguilera, A., Scott, K., Chin, L., DePinho, R. 2008. mTORC1-dependent and -independent regulation of

stem cell renewal, differentiation, and mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49), 19384–19389. DOI:10.1073/pnas.0810584105.

99. Gargett, C. 2007. Uterine stem cells: what is the evidence? *Human Reprod Update*. 13: 87–101. DOI: 10.1093/humupd/dml045.
100. Gil-Sanchis, C., Cervelló, I., Khurana, S., Faus, A., Verfaillie, C., Simón, C. 2015. Contribution of different bone marrow-derived cell types in endometrial regeneration using an irradiated murine model. *Fertil Steril.*;103(6): 1596–605. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.030.
101. Giovannini, S., Brehm, W., Mainil-Varlet, P. and Nestic, D. 2008. Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 76, 118-129. DOI: 10.1111/j.1432-0436.2007.00207.x.
102. Gittel, C., Brehm, W., Burk, J., Juelke, H., Staszky, C. and Ribitsch, I. 2013. Isolation of equine multipotent mesenchymal stromal cells by enzymatic tissue digestion or explant technique: comparison of cellular properties. *BMC Vet. Res.* 9, 221. DOI: 10.1186/1746-6148-9-221.
103. Godwin, E, Young N, Dudhia J, Beamish I, Smith R. 2012. 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*, 44(1), 25–32.
104. Gordon, A., Kozin, E., Keswani, S., Vaikunth, S., Katz, A., Zoltick, P., Favata, M., Radu, A., Soslowsky, L., Herlyn, M., Crombleholme, T. 2008. Permissive environment in postnatal wounds induced by adenoviral-mediated overexpression of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 prevents scar formation. *Wound Repair Regen* 16 70-79. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2007.00326.x.
105. Gordon S, Mantovani A. 2011. Diversity and plasticity of mononuclear phagocytes. *Eur. J. Immunol.* 41 2470–2472. DOI: 10.1002/eji.201141988

106. Gressner, O., Weiskirchen, R., Gressner, A. 2007. Biomarkers of liver fibrosis: clinical translation of molecular pathogenesis or based on liver-dependent malfunction tests. *Clin Chim Acta* 381, 107–113. DOI: 10.1016/j.cca.2007.02.038.
107. Goldenthal, M., Marín-García, J. 2003. Stem cells and cardiac disorders: an appraisal. *Cardiovasc Res.* 2;58(2):369-377. DOI:10.1016/s0008-6363(02)00783-6.
108. Guest, D., Smith, M., Allen, W. 2008. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J*; 40:178-81. DOI: 10.2746/042516408X276942.
109. Guest, D., Smith, M., Allen, W. 2010. Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J*;42(7) 624 636-42. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00112.x.
110. Gurtner, G., Callaghan, M., Longaker, M. 2007. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med.*;58:299-312. DOI:10.1146/annurev.med.58.082405.095329.
111. Hamalainen, M., Lilja, R., Kankaanranta, H., Moilanen, E. 2008. Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids. Reversal by histone deacetylase inhibitors. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21, 331-339. DOI: 10.1016/j.pupt.2007.08.003.
112. Hemberg, E., Lundeheim, N., Einarsson, S. 2005. Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in Thoroughbred mares. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 52, 474-477. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2005.00760.x.

113. Hiemer, S., Szymaniak, A., Varelas, X. 2014. The Transcriptional Regulators TAZ and YAP Direct Transforming Growth Factor -induced Tumorigenic Phenotypes in Breast Cancer Cells. *The Journal Of Biological Chemistry*, 289(19), 13461–13474. DOI:10.1074/jbc.M113.529115.
114. Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R., Aupperle, H., Dhein, S., Steif, B., Schoon, H. 2009. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci* 111: 261-278. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2008.03.019.
115. Holmes, B. 2010. The regeneration game: getting all touchy-feely. *New Sci.* 205 (2747) 36–39. DOI: 10.1016/S0262-4079(10)60364-8.
116. Horwitz, E., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Keating, A. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393–395. DOI: 10.1080/14653240500319234.
117. Hu, Y., Liao, L., Wang, Q., Ma, L., Ma, G., Jiang, X., Zhao, R. 2003. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J. Lab. Clin. Med.* 141, 342–349. DOI: 10.1016/S0022 2143(03)00022-2.
118. Hughes, J., Loy, R. 1969. Investigations on the effect on intrauterine inoculation of *Streptococcus zooepidemicus* in the mare. *Proc Am Assoc Equine Pract.*15:289–92.
119. Hurtgen, J. 2006. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology* 66, 560-566. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.006>
120. Huth, N., Schoniger, S., Sieme, H., Bartmann, C., Schooln, H. 2014. Lymphocyte subpopulations in the equine endometrium: a methodical

approach with diagnostic implications. *Pferdeheilkunde* 30, 4-14. DOI: 10.21836/PEM20140101.

121. Hossini, A., Megges, M., Prigione, A., Lichtner, B., Toliat, M., Wruck, W., Adjaye, J. 2015. Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks. *BMC Genomics*, 16, 84. DOI:10.1186/s12864-015-1262-5.
122. Iacono, E., Brunori, L., Pirrone, A., Pagliaro, P., Ricci, F., Tazzari, P., et al. 2012. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction* ;143(4):455e68. DOI: 10.1530/REP-10-0408.
123. Iacono, E., Pascuccib, L., Rossia, B., et al. 2017. Ultrastructural characteristics and immune profile of equine MSCs from fetal adnexa. *Reprod*;154(4):509-19. DOI: <https://doi.org/10.1530/REP-17-0032>.
124. Jacobsen, S., Andersen, P. 2007. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Vet Educ*.19:38–46. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2007.tb00550.x.
125. Jiang, Y., Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., Verfaillie, C. 2002 Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896–904. DOI: 10.1016/S0301-472X(02)00869-X.
126. Jing, L., Jia, Y., Lu, J., Han, R., Li, J., Wang, S., Jia, Y. 2011. MicroRNA-9 promotes differentiation of mouse bone mesenchymal stem cells into neurons by Notch signaling. *NeuroReport* 22(5), 206–211. DOI:10.1097/WNR.0b013e328344a666.

127. Katila, T. 2012. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod Dom Anim* 47(Suppl. 5), 31–41. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2012.02120.x
128. Katila, T. 1995. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen (monograph). *Biol Reprod* 1:515–7. DOI: 10.1093/biolreprod/52.monograph\_series1.515
129. Katkiewicz, M., Witkowski, M., Zajac, S. 2007. Endometrial biopsy of mares: visualization of healthy and diseased structure. *Med Weter* 63: 463-466.
130. Kenney, R. 1975. Prognostic value of endometrial biopsy in the mare. *J Reprod. Fertil. (Suppl)*. 23: 347-348.
131. Kenney, R. 1978. Cyclic and pathologic changes of mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172: 241-262.
132. Kenney, R., Doig, P. 1986. Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D.A. Ed, *Current Therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 723–729.
133. Khanmohammadi, M., Khanjani, S., Bakhtyari, M., Zarnani, A., Edalatkhah, H., Akhondi, M. M., Kazemnejad, S. 2012. Proliferation and chondrogenic differentiation potential of menstrual blood- and bone marrow-derived stem cells in two-dimensional culture. *Int J Hematol*, 95, 484–493. DOI:10.1007/s12185-012-1067-0.
134. Khatun, M., Sorjamaa, A., Kangasniemi, M., Sutinen, M., Salo, T., Liakka, A., Piltonen, T. 2017. Niche matters: The comparison between bone marrow stem cells and endometrial stem cells and stromal fibroblasts reveal distinct migration and cytokine profiles in response to inflammatory stimulus. *PLoS ONE*, 12(4), e0175986. DOI:10.1371/journal.pone.0175986.

135. Knudsen, P., Dinarello, C., Strom, T. 1987. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J. Immunol.* 139, 4129-4134.
136. Knutti B, Pycock JF, van der Weijden GC, Kupper U. 2000. The influence of early postbreeding uterine lavage on pregnancy rate in mares with intrauterine fluid accumulations after breeding. *Equine Veterinary Education.*;5:346-349. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2000.tb00056.x.
137. Kolf, C., Cho, E., Tuan, R. 2007. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1). DOI: 10.1186/ar2116.
138. Kotilainen, T., Huhtinen, M., Katila, T. 1994. Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*; 41:629–36. DOI: 10.1016/0093-691X(94)90173-G.
139. Krakowski, L., Krawczyk, C., Kostro, K., Stefaniak, T., Novotny, F., Obara, J. 2011. Serum levels of acute phase proteins: SAA, Hp and progesterone (P4) in mares with early embryonic death. *Reprod Domest Anim.*; 46:624–9. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01715.x.
140. Kraus, K., Kirker-Head, C. 2006. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35, 232–242. doi: 10.4055/cios.2018.10.3.271
141. Lander, A., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham M., Oskarsson, T. 2012. What does the concept of the stem cell niche really mean today?. *BMC Biol*, 10, 19. DOI:10.1186/1741-7007-10-19.
142. Lange-Consiglio, A., Corradetti, B., Bizzaro, D., Magatti, M., Ressel, L., Tassan, S, et al. 2011. Characterization and potential applications of progenitor-like cells isolated from horse amniotic membrane. *J Tissue Eng Regen Med* 2011; 6:622e35. DOI: 10.1002/term.465.

143. Lange-Consiglio, A., Tassan, S., Corradetti, B., Meucci, A., Perego, R., Bizzaro, D., Cremonesi, F. 2013. Investigating the potential of equine mesenchymal stem cells derived from amnion and bone marrow in equine tendon diseases treatment in vivo. *Cytherapy*; 10:1016–23. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.03.002.
144. Lara, E., Rivera, N., Cabezas, J., Navarrete, F., Saravia, F., Rodríguez-Alvarez, L., Castro, F. 2018. Endometrial Stem Cells in Farm Animals: Potential Role in Uterine Physiology and Pathology. *Bioengineering*, 5(3), 75. DOI:10.3390/bioengineering5030075.
145. Lara, E., Rivera, N., Rojas, D., Rodríguez-Alvarez, L., Castro, F. 2017. Characterization of mesenchymal stem cells in bovine endometrium during follicular phase of oestrous cycle. *Reprod. Domest. Anim*, 52(5), 707–714. DOI:10.1111/rda.12969.
146. Le Blanc, M., Causey R. 2009. Clinical and subclinical endometritis in the Mare: both threats to fertility. *Reprod Dom Anim* 44(Suppl. 3), 10–22. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x.
147. Le Blanc, M. 2010 Advances in the diagnosis and treatment of chronic infectious and post-mating-induced endometritis in the mare. *Reprod. Dom. Animals* 45, Suppl. 2, 21-27. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2010.01634.x.
148. Lee, J., Lee, M., Jin, H., Kim, D., Yang, Y., Oh, W., Jeun, S. 2007. Efficient Intracytoplasmic Labeling of Human Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stromal Cells with Ferumoxides. *Cell Transplantation*, 16, 849–857. DOI:10.3727/000000007783465271.
149. Leppänen, M., Miettinen, S., Mäkinen, S., Wiipola, P., Heikkilä, P., Katiskalahti, T., & Tulamo, R-M. 2009. Management of equine tendon and ligament injuries with enriched autologous adipose derived mesenchymal stem-cells: a clinical study. *Regenerative Medicine*, 4(6).

150. Li, D., Lv, Y., Pei, X., Li, Y., Liu, Y., Guo, D. 2010. Significance of nitric oxide concentration in plasma and uterine secretions with puerperal endometritis in dairy cows. *Vet Res Commun*; 34(4):315–21. DOI: 10.1007/s11259-010-9355-8.
151. Li, H., Fu, X. 2012. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res* 348, 371–377. DOI:10.1007/s00441-012-1393-9.
152. Liechty, K., Kim, H., Adzick, N., Crombleholme, T. 2000. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scar less fetal wound repair. *J Pediatr Surg* 35 866-872. DOI: 10.1053/jpsu.2000.6868.
153. Lin, P., Correa, D., Kean, T., Awadallah, A., Dennis, J., Caplan, A. 2014. Serial transplantation and long-term engraftment of intraarterially delivered clonally derived mesenchymal stem cells to injured bone marrow. *Mol. Ther.* 22 160–168. DOI: 10.1038/mt.2013.221.
154. Liu, H., Dong, Y., Feng, X., Li, L., Jiao, Y., Bai, S., Zhao, Y. 2019. miR-34a promotes bone regeneration in irradiated bone defects by enhancing osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells in rats. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 180. DOI:10.1186/s13287-019-1285-y.
155. Liu, I., Rakestraw, P., Coit, C., Harmon, F., Snyder, J. 1997. An in vitro investigation of the mechanism of neuromuscular regulation in myometrial contractility. *Pferdeheilkunde* 13, 557. DOI: 10.1016/S0378-4320(01)00198-1.
156. Liu, Y., Berendsen, A., Jia, S., Lotinun, S., Baron, R., Ferrara, N., Olsen B. 2012. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest* 122(9), 3101-3113. DOI:10.1172/JCI61209.

157. Lögters, T., Margraf, S., Altrichter, J., Cinatl, J., Mitzner, S., Windolf, J., Scholz, M. 2009: The clinical value of neutrophil extracellular traps. *Med Microbiol Immunol* 198, 211–219. DOI: 10.1007/s00430-009-0121-x.
158. López MJ, Jarazo J. 2015. State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Vet J.*; 47(2):145-154. doi:10.1111/evj.12311.
159. Lou, G., Yang, Y., Liu, F., Ye, B., Chen, Z., Zheng, M., Liu, Y. 2017. MiR-122 modification enhances the therapeutic efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells against liver fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 21(1), 2963–2973. DOI:10.1111/jcmm.13208.
160. Iyer, S., Rojas, M. 2008 Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells novel concept for future therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.*; 8 569–581. DOI: 10.1517/14712598.8.5.569.
161. Maia, L., Landim-Alvarenga, F., Taffarel, M., Moraes, C., Machado, G., Melo, G., Amorim, R. 2015. Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses. *BMC Vet Res*; 11:63. doi: 10.1186/s12917-015-0361-5.
162. Makino, K., Jinnin, M., Hirano, A., Yamane, K., Eto, M., Kusano, T., Ihn, H. 2013. The Downregulation of microRNA let-7a Contributes to the Excessive Expression of Type I Collagen in Systemic and Localized Scleroderma. *The Journal of Immunology*, 190(8), 3905–3915. DOI:10.4049/jimmunol.1200822.
163. Mambelli. L. Mattos, R., Winter, G., Madeiro, D., Morais, B., Malschitzky, E. Miglino, M., Kerkis, A., Kerkis, I. 2014. Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis. *PLoS ONE*; 9:e97889. DOI: 10.1371/journal.pone.0097889.

164. Mambelli L, Winter G, Kerkis A, Malschitzky E, Mattos R, Kerkis I. 2013 A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. *Theriogenology* 79, 744-750.
165. Manning C., Schwartz A., Liu W., Xie J., Havlioglu N., Sakiyama-Elbert S., Silva M., Xia Y., Gelberman R., y Thomopoulos M. 2013. Controlled delivery of mesenchymal stem cells and growth factors using a nanofiber scaffold for tendon repair. *Acta Biomater.* 9, 6905-6914. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.02.008.
166. Mantovani, A., Biswa, S., Galdiero, M., Sica, A., Locati, M. 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229 176–185. DOI: 10.1002/path.4133.
167. Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Wiedenbauer, E., Krautgartner, W., Stoiber, W., Belohradsky, B., Rieber, N., Kormann, M., Koller, B., Roscher, A., Roos, D., Griese, M., Eickelberg, O., Doring, G., Mall, M., Hartl, D., 2010. CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med* 16, 1018–1024. DOI: 10.1038/nm0711-899a.
168. Marfe G., Rotta G., De Martino L., Tafani M., Fiorito F., Di Stefano C., Poletini M., Ranalli M., Russ, MA. y Gambacurta A. 2012. A new clinical approach: use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. *Life Sci.* 90, 825-830.
169. Marth, C., Young, N., Glenton, L., Noden, D., Browning, G., Krekeler, N. 2015. Deep sequencing of the uterine immune response to bacteria during the equine oestrous cycle. *BMC Genom*; 16:1–19. DOI:10.1186/s12864-015-2139-3.
170. Marycz, K., Kornicka, K., Marędziak, M., Golonka, P., Nicpoń, J. 2016. Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by predominance of autophagy over selective mitophagy. *J Cell Mol Med*; 20(12):2384-404. DOI: 10.1111/jcmm.12932.

171. Memon, I., Sawa, Y., Miyagawa, S., Taketani, S., Matsuda, H. 2005 Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130, 646–653. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.02.024 .
172. Menon, V., Thomas, R., Ghale, A., Reinhard, C., Pruszek, J. 2014. Flow cytometry protocols for surface and intracellular antigen analyses of neural cell types. *J Vis Exp.* 18; (94). DOI: 10.3791/52241.
173. Metcalf, E. 2014. The effect of platelet-rich plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis (PMIE). *J. Equine Vet. Sci.* 34, 128. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.086.
174. Mischen, B. T., Follmar, K., Moyer, K., Buehrer, B., Olbrich, K., Levin, L., Erdmann, D. 2008. Metabolic and Functional Characterization of Human Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Engineering. *Plastic and Reconstructive Surgery* 122(3) 725–738. DOI:10.1097/PRS.0b013e318180ec9f.
175. Miernik, K., Karasiński, J. 2011. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction (Cambridge, England)*. 143. 203-9. 10.1530/REP-11-0202.
176. Misso, G., Di Martino, M., De Rosa, G., Farooqi, A., Lombardi, A., Campani, V., Caraglia, M. 2014. Mir-34: A new weapon against cancer? *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 3(9), e194. DOI:10.1038/mtna.2014.47.
177. Mo, I., Yip, K., Chan, W., Law, H., Lau, Y., Chan, G. 2008. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. *BMC Cell Biol.* 9 52. DOI: 10.1186/1471-2121-9-52.

178. Mosna, F., Sensebe, L., Krampera, M. 2010. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*; 19:1449-470. DOI: 10.1089/scd.2010.0140.
179. Moore, K., Malefyt, R., Coffman, R., O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19 683-765. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.
180. Morrison, S., Dryden, V., Bras, R., Morrell, S. 2014. How to Use Stem Cells in Clinical Laminitis Cases. *Am As of Eq Practs (AAEP)* 60, 499–503.
181. Muller, M., Fleischmann, B., Selbert, S., Ji, G., Endl, E., Middeler, G., Muller, O., Schlenke, P., Frese, S., Wobus, A., Hescheler, J., Katus, H., Franz, W. 2000. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *FASEB J*;14:2540–2548. DOI: 10.1096/fj.00-0002com.
182. Mutlu, L., Hufnagel, D., Taylor, H. 2015. The Endometrium as a Source of Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Biology of Reproduction*. 92(6):138, 1–11. DOI: 10.1095/biolreprod.114.126771 .
183. Navarrete, F., Saravia, F., Cisterna, G., Rojas, F., Silva, P., Rodriguez-Alvarez, Ll., Rojas, D., Cabezas, J., Mançanares, A.C y Castro, F.O. 2020. 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*. 155. 10.1016/j.theriogenology.2020.06.010.
184. Neeli, I., Dwivedi, N., Khan, S., Radic, M. 2009. Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils. *J Innate Immun* 1, 194–201. DOI: 10.1159/000206974.
185. Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P., Leelahavanichkul, K., Koller, B., Brown, J., Hu, X., Jelinek, I., Star, R., Mezey, E. 2009. Bone marrow stromal cells attenuate

sepsis via prostaglandin E(2) - dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med.* 15:42-49. DOI: 10.1038/nm.1905.

186. Nicpoń, J., Marycz, K., Grzesiak, J. 2013. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection in horses suffering from bone spavin. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 753–4. DOI: 10.2478/pjvs-2013-0107.

187. Nikolakopoulos, E., Watson, E. 1999. Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology*. 52. 413-23. DOI:10.1016/S0093-691X(99)00139-9.

188. Nixon, A., Dahlgren, L., Haupt, J., Yeager, A., Ward, D. 2008. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research*, 69(7), 928–37. DOI: 10.2460/ajvr.69.7.928.

189. Nöth, U., Osyczka, A., Tuli, R., Hickok, N., Danielson, K., Tuan, R. 2002. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res.* 20, 1060–1069. DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00018-9.

190. Olman, M. 2009. Beyond TGF- $\beta$ : a prostaglandin promotes fibrosis. *Nat Med* 15, 1360–1361. DOI: 10.1038/nm1209-1360.

191. Omwandho, C., Konrad, L., Halis, G., Oehmke, F., Tinneberg, H. 2010. Role of TGF- $\beta$ s in normal human endometrium and endometriosis, *Human Reproduction*, 25(1), 101–109. DOI:10.1093/humrep/dep382.

192. Ortiz, L., DuTreil, M., Fattman, C., Pandey, C., Torres, G., Go, K. 2007. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci*; 104:11002–7. DOI: 10.1073/pnas.0704421104.

193. Ortiz, L., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N., Phinney, D. 2003. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci*.100 8407-8411. DOI: 10.1073/pnas.1432929100.
194. Overbeck, W., Jäger, K., Schoon, H., Witte, T. 2013. Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus an in vitro study. *Theriogenology*. 79:1262–8. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.02.007.
195. Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Aurich, C. 2008. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*; 70(5):843–851. DOI:10.1016/j.theriogenology.2008.04.054.
196. Pan, Y., Hui, H., Hoo, R., Feng, T., Lam, K., Xu, A. 2018. miR-34a Aggravates Obesity-Induced Adipose Inflammation and Metabolic Dysfunction via Blocking Polarization of Anti-inflammatory M2 Macrophage. *Diabetes*, 67(1), 2025-P. DOI:10.2337/db18-2025-p.
197. Parham, P. 2005. *The immune system*. 2nd ed. New York, NY: Garland Science.
198. Pasolini, M.P., Del Prete, C., Fabbri, S, y Auletta, L. 2016. Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry–A Review. 10.5772/62461.
199. Patel, A., Genovese, J. 2011. Potential clinical applications of adult human mesenchymal stem cell (Prochymal®) therapy. *Stem Cells Cloning*, 4, 61–72. DOI:10.2147/SCCAA.S11991.

200. Pennington, M., Curtis, T., Divers, T. et al. 2016. Equine mesenchymal stromal cells (MSC) from different sources efficiently differentiate into hepatocyte like cells (HLC). *Tissue Eng Part C Met*; 22(6):596-07. DOI: 10.1089/ten.TEC.2015.0403.
201. Peranteau, W., Zhang, L., Muvarak, N., Badillo, A., Radu, A., Zoltick, P., Liechty, K. 2008. IL-10 overexpression decreases inflammatory mediators and promotes regenerative healing in an adult model of scar formation. *J Invest Dermatol.* 128 1852-1860. DOI: 10.1038/sj.jid.5701232.
202. Perrini C, Strillacci MG, Bagnato A, et al. 2016. Microvesicles secreted from equine amniotic derived cells and their potential role in reducing inflammation in endometrial cells in an in-vitro model. *Stem Cell Res Ther*; 7:169. DOI: 10.1186/s13287-016-0429-6.
203. Petrova, R., Joyner, A. 2014. Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development*, 141, 3445- 3457. DOI: 10.1242/dev.083691.
204. Phinney, D., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., Prockop, D. 1999. Donor Variation in the Growth Properties and Osteogenic Potential of Human Marrow Stromal Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(3), 424–436. DOI:10.1002/(SICI)1097-4644(19991201)75:3<424::AID-JCB8>3.0.CO;2-8.
205. Pilsczek, F., Salina, D., Poon, K., Fahey, C., Yipp, B., Sibley, C., Robbins, S., Green, F., Surette, M., Sugai, M., Bowden, M., Hussain, M., Zhang, K., Kubes, P. 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol* 185, 7413–7425. DOI: 10.4049/jimmunol.1000675.
206. Potente, M., Gerhardt, H., Carmeliet, P. 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell.* 146 873–87. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.039

207. Pramanik, S., Sulistio, Y., Heese, K. 2017. Neurotrophin Signaling and Stem Cells—Implications for Neurodegenerative Diseases and Stem Cell Therapy. *Mol Neurobiol*, 54, 7401–7459. DOI:10.1007/s12035-016-0214-7.
208. Pycock, JF. Breeding management of the problem mare. In: Samper JC, editor. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. St Louis: Saunders Elsevier; 2009. pp. 139-164. DOI: 10.1016/B978-1-4160-5234-0.00013-1.
209. Quattrocelli, M., Giacomazzi, G., Broeckx, S. Y., Ceelen, L., Bolca, S., Spaas, J. H., Sampaolesi, M. 2016. Equine-Induced Pluripotent Stem Cells Retain Lineage Commitment Toward Myogenic and Chondrogenic Fates. *Stem cell reports*, 6(1), 55-63. DOI:10.1016/j.stemcr.2015.12.005.
210. Qian, D., Wei, G., Xu, C., He, Z., Hua, J., Li, J., Hu, Q. 2017. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) repair acute necrotized pancreatitis by secreting microRNA-9 to target the NF- $\kappa$ B1 / p50 gene in rats. *Scientific Reports*, 7, 581. DOI:10.1038/s41598-017-00629-3.
211. Radcliffe, C., Flaminio, J., Fortier, L. 2010. Temporal Analysis of Equine Bone Marrow Aspirate During Establishment of Putative Mesenchymal Progenitor Cell Populations. *Stem Cells Dev*; 19:269-82. DOI: 10.1089/scd.2009.0091.
212. Raicevic, G., Rouas, R., Najar, M., Stordeur, P., Boufker, H., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevessignsky, M., Lagneaux, L. 2010. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Hum. Immunol.* 71 235–244. DOI: 10.1016/j.humimm.2009.12.005.
213. Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., et al. 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol*; 144:147-54. DOI: 10.1016/j.vetimm.2011.06.033.

214. Ranera, B., Ordovas, L., Lyahyai, J., Bernal, M., Fernandes, F., Remacha, A., et al. 2012. Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary J* 2012;44(1). DOI: 10.1111/j.2042-3306.2010.00353.x.
215. Ranera, B., Remacha, A., Álvarez-Arguedas, S., Castiella, T., Vazquez, F.J., Romero, A., Zaragoza, P., Martin-Burriel, I. and Rodellar, C. 2013. Expansion under hypoxic conditions enhances the chondrogenic potential of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Vet. J.* 195, 248-251. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.06.008.
216. Rebordao, M., Galvao, A., Amaral, A., Szostek, A., Lukasik, K., Piotrowska-Tomala, K., Skarzynski, D., Ferreira-Dias, G. 2013. Estrous Cycle Phases on Mare Endometrium Secretory Function and Fibrosis Markers (TIMP 1 and TGF $\beta$ 1) after Neutrophil Extracellular Traps and Cytokines Action. Rodriguez-Martinez H (ed.), Willey-Blackwell, *Reprod Dom Anim* 48 (Supplement 1), pp. 114.
217. Rebordao, M., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T. 2014. Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *J Reprod Immunol.* 106:41–9. DOI: 10.1016/j.jri.2014.08.003.
218. Redd, M., Cooper, L., Wood, W., Stramer, B., Martin, P. 2004 Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359 777-784. DOI:10.1098/rstb.2004.1466.
219. Reed, S., Johnson, S. 2008. Equine umbilical cord blood contains a population of stem cells that express Oct4 and differentiate into mesodermal and endodermal cell types. *J Cell Physiol.*;215(2):329-336. DOI:10.1002/jcp.21312.
220. Reghini, M., Bussiere, M., Neto, C., Castro-Chaves, M., Resende, H., Fioratti, E., Farras, M., Alvarenga, M. 2014. Effect of use of platelet rich

plasma on post-breeding uterine inflammatory response of mares. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 127. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.086.

221. Reitamo, S., Remitz, A., Tamai, K., Uitto, J. 1994. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest.* 94:2489-2492. DOI: 10.1172/JCI117618.

222. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A., Zhao, R., Shi, Y. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2. 141–150. DOI: 10.1016/j.stem.2007.11.014.

223. Renzi, S., Ricco, S., Dotti, S., Sesso, L., Grolli, S., Cornali, M., Carlin, S., Patrino, M., Cinotti, S. y Ferrari, M. 2013. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res. Vet. Sci.* 95, 272-277. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.01.017.

224. Ricketts, S., Alonso, S. 1991. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. *Equine Vet. J.* 23, 189-192. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1991.tb02751.x.

225. Riddle, W., LeBlanc, M., Stromberg, A. 2007 Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology* 68, 395-402. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.050.

226. Rink, B., Beyer, T., French, H., Watson, E., Aurich, C., Donadeu, F. 2018. The fate of autologous endometrial mesenchymal stromal cells after application in the healthy equine uterus. *Stem Cells Dev*; 27(15):1046–1052. DOI:10.1089/scd.2018.0056.

227. Rogan, D., Fumuso, E., Rodríguez, E., Wade, J., Sánchez. B. 2007. Use of a mycobacterial cell wall extract (MCWE) in susceptible mares to clear experimentally induced endometritis with *Streptococcus*

- zoepidemicus. *J. Equine Vet. Sci.* 27, 112-117. DOI: 10.1016/j.jevs.2007.01.010.
228. Ryan, J., Barry, F., Murphy, J., Mahon, B. 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm.* 2: 8. DOI: 10.1186/1476-9255-2-8
229. Samper J. 2000. Preface. *Equine breeding management and artificial insemination.* Saunders. Philadelphia. pp: 7-8.
230. Samper, J., Pycocock, J. 2007. The normal female reproductive system. The normal uterus in estrus. *Current Therapy in Equine Reproduction.* Missouri: Saunders Elsevier. p. 32-35.
231. Sato, Y., Ohshima, T., Kondo, T. 1999. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochem Biophys Res Commun* 265 194-199. DOI: 10.1006/bbrc.1999.1455.
232. Sayed, A., Xia, K., Salma, U., Yang, T., Peng, J. 2014. Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases. *Heart Lung Circ.* 23(6), 503–510. DOI: 10.1016/j.hlc.2014.01.001.
233. Schäffler, A., Büchler, C. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25(4). DOI: 10.1634/stemcells.2006-0589.
234. Schnabel L., Lynch M., van der Meulen M., Yeager A., Kornatowski M. y Nixon A. 2009. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J. Orthop. Res.* 27, 1392-1398.

235. Schwab, K., Chan, R., Gargett, C. 2005. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 84: 1124–1130. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.02.056.
236. Shi, S., Wu, X., Wang, X, et al. 2016. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocyte-Like Cells Is Regulated by the Combined Low Dose Treatment of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 and 5-Azacytidine. *Stem Cells Int.*; 2016:3816256. DOI:10.1155/2016/3816256.
237. Shoaee-Hassani, A., Mortazavi-Tabatabaei, S., Sharif, S., Rezaei-Khaligh, H., Verdi, J. 2011. DHEA provides a microenvironment for endometrial stem cells neurogenesis. *Med Hypothesis*, 76(6), 843–846. DOI:10.1016/j.mehy.2011.02.033.
238. Sikora, M., Król, J., Nowak, M. et al. 2015. The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Vet Scand* 58, 50. DOI:10.1186/s13028-016-0233-4.
239. Smith, R., Korda, M., Blunn, G., Goodship, E. 2003. 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*, 35. DOI: 10.2746/042516403775467388.
240. Smith, R., Webbon, P. 2005. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: Heralding a new dawn?. *British journal of sports medicine*. 39. 582-4. DOI:10.1136/bjism.2005.015834.
241. Snider, T., Sepoy, C., Holyoak, G. 2011. Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology* 75(9): 1567-1581. DOI:10.1016/j.theriogenology.2010.12.013

242. Sorrell, J., Baber, M., Caplan, A. 2009. Influence of adult mesenchymal stem cell son in vitro vascular formation. *Tissue Eng. Part A* 15 17511–21761. DOI: 10.1089/ten.tea.2008.0254.
243. Sotiropoulou, P., Perez, S., Gritzapis, A., Baxevanis, C., Papamichail, M. 2006. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24 74-85. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0359.
244. Souza, D., Alves-Filho, J., Cunha, F., Lima, C., Teixeira, M. 2011. Neutrophils in the context of polymicrobial sepsis. In: Tacchini-Cottier F, Zandbergen G (eds), *Neutrophils in Infectious Diseases*. Betham eBooks, Dubai, pp. 20–36. DOI: 10.2174/978160805023911101010020.
245. Spaas, J., Guest, D. y Van de Walle, G. 2012. Tendon regeneration in human and equine athletes: Ubi Sumus-Quo Vadimus (where are we and where are we going to)? *Sports Med.* 42, 871-890. DOI: 10.1007/BF03262300.
246. Stagg, J., Galipeau, J. 2013. Mechanisms of immune modulation by mesenchymal stromal cells and clinical translation. *Curr. Mol. Med.* 13 856–867. DOI: 10.2174/1566524011313050016.
247. Sternberger, L., Hardy, P., Cuculis, J., Meyer, H. 1997. The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*; 18(5): 315-333. DOI:10.1177/18.5.315.
248. Stewart, M., Stewart, A. 2011. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, mechanisms of action. *Vet Clinics North Am: Equine Pract*; 27:243-61. DOI: 10.1016/j.cveq.2011.06.004.

249. Strioga, M., Viswanathan, S., Darinkas, A., Slaby, O., Michalek, J. 2012. Same or Not the Same? Comparison of Adipose Tissue-Derived Versus Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem and Stromal Cells. *Stem Cells Dev*; 21(14):2724-752. DOI: 10.1089/scd.2011.0722.
250. Su, H., Liu, D., Yan, C., Wang, G. 2017. MicroRNA-380-5p inhibits migration and invasion of ovarian cancer SKOV3 cells and regulates epithelial-mesenchymal transition factors. *Int J Clin Exp Pathol*, 10(2), 1331–1339.
251. Sung, S., Hwang, M., Kim, A. 2016. MyoD Overexpressed Equine Adipose-Derived Stem Cells Enhanced Myogenic Differentiation Potential. *Cell Transplant.*;25(11):2017-2026. DOI:10.3727/096368916X691015.
252. Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M., Dinarello, C., Mier, J. 1994. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood.*;83(1):113-118.
253. Taylor, H. 2004. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*. 292:81–85. DOI:10.1001/jama.292.1.81.
254. Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., Jones, J. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147. DOI: 10.1126/science.282.5391.1145.
255. Toma, C., Pittenger, M., Cahill, K., Byrne, B., Kessler, P. 2002. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*;105(1):93-98. DOI:10.1161/hc0102.101442.
256. Toupadakis, C., Wong, A., Genetos, D., Cheung, W., Borjesson, D., Ferraro, G., Galuppo, L., Leach, J., Owens, S., Yellowley, C. 2010.

Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am. J. Vet. Res.* 71, 1237-1245. DOI: 10.2460/ajvr.71.10.1237.

257. Traub-Dargatz, J., Salman, M., Voss, J. 1991. Medical problems of adult horses as ranked by equine practitioners. *J Am Vet Res.*; 198:1745–7.

258. Troedsson, M. 1999. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology* 52: 461-471. DOI:10.1016/S0093-691X(99)00143-0.

259. Troedsson, M., Woodward, M. 2016. Our current understanding of the pathophysiology of equine endometritis with an emphasis on breeding-induced endometritis. *Reproductive Biology*. 16. DOI:10.1016/j.repbio.2016.01.003.

260. Troedsson, M., Desvouses, A., Hansen, P., Buhi, W. 2006. Equine seminal plasma protect live spermatozoa from PMN-binding and phagocytosis, while providing a mechanism for selective sperm elimination of apoptotic and dead spermatozoa. *Anim Reprod Sci* ; 94:60–1. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.04.032.

261. Troedsson, M., Esteller-Vico, A., Scoggin, K., Squires, E., Ball, B. 2014. Equine seminal plasma derived lactoferrin regulates binding of PMNs to Spermatozoa. *J Equine Vet Sci* ;34 (1):49. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.10.029.

262. Troedsson, M., Liu, I., Ing, M., Pascoe, J. 1995. Smooth muscle electrical activity in the oviduct and the effect of oxytocin, PGF2a and PGE2 on the myometrium and oviduct of the cycling mare. In: Sharp DC, Bazer FW, editors. *Biology of reproduction/equine reproduction VI*. Monograph series 1. pp. 439–52. DOI: 10.1530/jrf.0.0990299.

263. Troedsson, M., Loseth, K., Alghamdi, A., Dahms, B., Crabo, B. 2002. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *An Reprod Sci*; 68:273–8. DOI: 10.1016/S0378-4320(01)00164-6.
264. Troedsson, M., Liu, I., Ing, M., Pascoe, J., Thurmond M. 1993a. Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *J. Reprod. Fertil.* 99, 307-313. DOI: 10.1530/jrf.0.0990307.
265. Troedsson, M., Liu, I., Crabo, B. 1998. Sperm transport and survival in the mare: a review. *Theriogenology*; 50(5):807-818. DOI:10.1016/s0093-691x(98)00185-x.
266. Troedsson, M., Liu, I., Thurmond, M. 1993b. Immunoglobulin (IgG and IgA) and complement (C3) concentrations in uterine secretion following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible to versus resistant to chronic uterine infection. *Biol. Reprod.* 49, 502-506. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00143-0.
267. Tunon, A., Katila, T., Magnusson, U., Nummijarvi, A., Rodriguez-Martinez, H. 2000. T-cell distribution in two different segments of the equine endometrium 6 and 48 hours after insemination. *Theriogenology* 54, 835-841. DOI: 10.1016/S0093-691X(00)00395-2.
268. Tuppits, U., Orro, T., Einarsson, S., Kask, K., Kavak, A. 2014. Influence of the uterine inflammatory response after insemination with frozen-thawed semen on serum concentrations of acute phase proteins in mares. *Anim Reprod Sci*; 146:182–6. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2014.02.007.
269. Valchos, I., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., ... Hatzigeorgiou, A. G. 2015. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, 43(1), 460-466. DOI:10.1093/nar/gkv403.

270. van Royen, N., Piek, J. 2009. A critical review of clinical arteriogenesis research. *J Am Coll Cardiol* 55 17–25. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.06.058.
271. Vidal, M., Kilroy, G., López, M., Johnson, J., Moore, R., Gimble, J. 2007. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Veterinary Surg*;36(7). DOI: 10.1111/j.1532-950X.2007.00313.x.
272. Wang, Y., Sacchetti, A., van Dijk, M., van der Zee, M., van der Horst, P., Joosten, R., Burger, C., Grootegoed, J., Blok, L., Fodde, R. 2012. Identification of quiescent, stem cell-like in the distal female reproductive tract. *PLoS One* 7, e40691. 10.1371/journal.pone.0040691.
273. Waterman, R., Tomchuck, S., Henkle, S., Betancourt, A. 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS ONE* 5. DOI: 10.1371/journal.pone.0010088.
274. Watson, E. 2000 Post-breeding endometritis in the mare. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 221-232. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00110-X)
275. Watson, E., Stokes, C., 1990. Effect of susceptibility to endometritis on specific antibody in the endometrium of mares. *Theriogenology* 34, 39–45. DOI:10.1016/0093-691X(90)90575-E.
276. Watson, E., Thomson, S. 1996. Lymphocyte subsets in the endometrium of genitally normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Vet. J.* 28, 106-110. DOI:10.1053/rvsc.2001.0532.

277. Watt, S., Gullo, F., van der Garde, M., Markeson, D., Camicia, R., Khoo, C., Zwaginga, J. 2013. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *British Medical Bulletin*. 108 25–53. DOI: 10.1093/bmb/ldt031.
278. Weinrauch, Y., Drujan, D., Shapiro, S., Weis, J., Zychlinsky, A. 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417, 91–94. DOI: 10.1038/417091a.
279. Wilke, M., Nydam, D., Nixon, A. 2007 Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *J. Orthop. Res.* 25, 913–925. DOI: 10.1002/jor.20382.
280. Windt, D., Bootsma, H., Burghout, P., Gaast-de Jongh, C., Hermans, P., Flier, M. 2012. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* resists extracellular human neutrophil elastase- and cathepsin G-mediated killing. *FEMS Immunol Med Microbiol* 66, 445–448. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.01028.x.
281. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., & Black, I. B. 2000. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61(4), 364–370. DOI:10.1002/1097-4547(20000815)61:4<364::AID-JNR2>3.0.CO;2-C.
282. Woodward, E., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, KE., Troedsson, M. 2013a. Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding induced endometritis. *Reproduction*. 145(3):289–96. DOI: 10.1530/REP-12-0452.
283. Woodward, E., Christoffersen, M., Campos, J., Horohov, D., Scoggin, K., Squires, E., Troedsson, M. 2013b. An investigation of uterine nitric oxide production in mares susceptible and resistant to persistent breeding-induced endometritis and the effects of immunomodulation. *Reprod. Dom. Animals* 48, 554-561. DOI: 10.1111/rda.12124.

284. Woodward, E., Christoffersen, M., Horohov, D., Squires, E., Troedsson, M. 2015. The effect of treatment with immune modulators on endometrial cytokine expression in mares susceptible to persistent breeding-induced endometritis. *Equine Vet. J.* 47, 235-239. DOI: 10.1111/evj.12266.
285. Yagi, H., Soto-Gutierrez, A., Parekkadan, B., Kitagawa, Y., Tompkins, R., Kobayashi, N., Yarmush, M. 2010. Mesenchymal stem cells: mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant.*;19:667–79. DOI: 10.3727/096368910X508762.
286. Yamaguchi, T., Wing, J., Sakaguchi, S. 2011. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol.* 23(6) 424-30. DOI: 10.1016/j.smim.2011.10.002.
287. Yang, H., Li, Q., Zhao, W., Yuan, D., Zhao, H., Zhou, Y. 2014. MiR-329 suppresses the growth and motility of neuroblastoma by targeting KDM1A. *FEBS Letters*, 588, 192–197. DOI:10.1016/j.febslet.2013.11.036.
288. Yen, B., Huang, H., Chien, C., Jui, H., Ko, B., Yao, M., Shun, C., Yen, M., Lee, M., Chen, Y. 2005. Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 23, 3–9. DOI: 10.1634/stemcells.2004-0098.
289. Yuksel, Z., Buber, E., Kocagoz, T., Alp, A., Saribas, Z., Can, N. 2011. Mycobacterial strains that stimulate the immune system most efficiently as candidates for the treatment of bladder cancer. *J Mol Microbiol Biotechnol.*;20(1):24-28. DOI:10.1159/000324331.
290. Zeng, C., Wang, Y., Xie, C., Sang, Y., Li, T., Zhang, M., Zhuang, S. 2015. Identification of a novel TGF- $\beta$ -miR-122-fibronectin 1/serum response factor signaling cascade and its implication in hepatic fibrogenesis. *Oncotarget*, 6(14), 12224–12233. DOI:10.18632/oncotarget.3652.

291. Zerbe, H., Engelke, F., Klug, E., Schoon, H., Leibold, W., 2004. Degenerative endometrial changes do not change the functional capacity of immigrating uterine neutrophils in mares. *Reprod Dom Anim* 39, 94– 98. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2004.00486.x.
292. Zhang, L., Liao, Y., Tang, L. 2019. MicroRNA-34 family: A potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* 38, 53. DOI:10.1186/s13046-019-1059-5.
293. Zhu, C., Li, W., Li, Y., Gao, R. 2012. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase- 1 are correlated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *J Dig Dis* 13, 558–563. DOI: 10.1111/j.1751-2980.2012.00629.x.
294. Zhu, H. Y., Ge, T. X., Pan, Y.B., Zhang, S. 2017. Advanced role of Hippo signaling in endometrial fibrosis: implications for intrauterine adhesion. *Chin Med J (Engl)*, 130(22): 2732–2737. DOI:10.4103/0366-6999.218013.
295. Zhu, H., Wang, J., Tong, X., Xue, Y. M., Zhang, S. 2015. S100P regulates trophoblast-like cell proliferation via P38 MAPK pathway. *Gynecol Endocrinol*, 31(10), 796–800. DOI:10.3109/09513590.2015.1069268.
296. Zhu, L., Shu, Z., Shun, X. 2018. Bioinformatic analysis of four miRNAs relevant to metastasis-regulated processes in endometrial carcinoma. *Cancer Management and Research*, 10, 2337–2346. DOI:10.2147/CMAR.S1.

