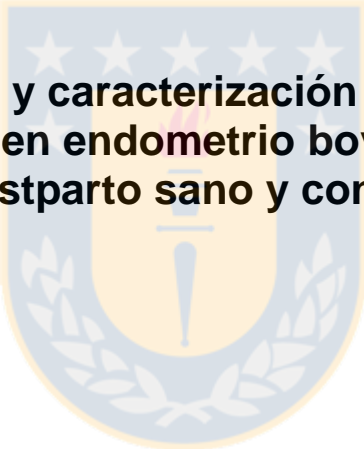




Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Veterinarias - Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias



**Identificación y caracterización de células madre
mesenquimales en endometrio bovino durante el ciclo
estral y postparto sano y con endometritis.**

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

EVELYN ELIA LARA NAVARRETE
CHILLÁN-CHILE
2017

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



*A mi hijo
A mi esposo
A mi familia*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas que con su apoyo y colaboración hicieron posible realizar este trabajo de investigación.

A mi tutor de tesis el Dr. Fidel Castro por su guía y apoyo en la realización de este estudio, por haber depositado su confianza en mi y haberme entregado las herramientas necesarias para poder desarrollar y culminar este proceso.

A la Universidad de Concepción y a la Dirección de Postgrado por la oportunidad brindada para la adquisición del grado. Y a Clarita por su constante ayuda y disposición.

A la planta faenadora Frigosur y el fundo El Rodadero, por permitirme obtener las muestras necesarias para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Escudero por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haber depositado su confianza en mi, para poder desarrollar parte del trabajo experimental.

A las personas que apoyaron con sus conocimientos y/o ayuda profesional en el desarrollo del trabajo experimental, como mi amiga Jesenia Acurio, profesor José Cox, profesora Lleretny Rodríguez y compañeros de laboratorio Nathaly Rivera, Daniela Rojas, Joel Cabezas, Paulina Pachá, y Juan López.

A mi esposo Alejandro por su paciencia, amor y apoyo incondicional y que junto a mi hijo son mi motivación principal para seguir adelante con nuestros sueños.

A mis padres y hermana por su constante apoyo y preocupación, y que sin duda son un pilar muy importante en mi vida y han hecho de mi la persona que soy.



IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES EN
ENDOMETRIO BOVINO DURANTE EL CICLO ESTRAL Y POSTPARTO SANO Y CON
ENDOMETRITIS.

Aprobada por:

Fidel Ovidio Castro Reboredo

Ing. Zootecnista, PhD

Profesor guía

Oliberto Sánchez Ramos

Microbiólogo, PhD

Evaluador interno

Carlos Escudero Orozco

Médico, MDPHD

Evaluador interno

Victor Parraguez Gamboa

Med. Veterinario, PhD

Evaluador externo

Lleretny Rodríguez Alvarez

Lic. Microbiología, PhD

Director (s) de programa



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada por:

Proyecto FONDECYT REGULAR N° 1110642 (2011-2014).

Beca CONICYT para estudios de doctorado nacional N° 21150425 (2015-2017).



TABLA DE CONTENIDOS	Página
Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	xi
ABREVIACIONES	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Características y funcionalidad del endometrio uterino	3
-Cambios uterinos y regeneración endometrial	4
-Endometritis postparto y alteración de la regeneración endometrial	7
Células madre en la regeneración endometrial	9
-Células madre adultas	9
-Nicho de células madre	12
-Rol de células madre en la regeneración endometrial	13
Células madre en endometrio	15
-Origen de las células madre en endometrio	15
-Identificación de células madre en endometrio	17
- Clonogenicidad y proliferación	17
- Diferenciación celular	18
-Marcadores moleculares de células madre en endometrio	19
-Células madre de endometrio bovino	22
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
Diseño Experimental	27
Obtención y selección de muestras	28
Cultivo celular primario	30
Evaluación de propiedades funcionales de MSCs	31
-Clonogenicidad	32
-Proliferación celular	32

-Diferenciación celular	33
Evaluación de marcadores moleculares de MSCs	34
-Extracción de ARN	35
- Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real	35
-Extracción de proteínas	38
- SDS-PAGE y Western blot	38
-Inmunohistoquímica	39
Análisis estadístico	40
3. RESULTADOS	42
Experimento 1. Identificación y caracterización de MSCs y sus marcadores moleculares en endometrio durante el ciclo estral bovino	42
Experimento 1.1 Evaluación de propiedades funcionales de MSCs	42
Experimento 1.2 Evaluación de marcadores moleculares de MSCs	48
Experimento 2. Identificación y caracterización de MSCs y sus marcadores moleculares en endometrio durante el postparto de vacas sanas y con endometritis	52
Experimento 2.1 Evaluación de propiedades funcionales de MSCs	54
Experimento 2.2 Evaluación de marcadores moleculares de MSCs	60
4. DISCUSIÓN	65
Hacia un modelo integrativo de la presencia y función de MSCs en endometrio bovino	76
5. CONCLUSIONES	81
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Fases del ciclo estral en la hembra bovina y su regulación hormonal.	4
Figura 2	Organización de la diferenciación de células madre.	10
Figura 3	Diseño experimental del estudio de Células madre mesénquimales en endometrio bovino.	27
Figura 4	Tractos reproductivos, morfología ovárica y concentraciones plasmáticas sanguíneas de estradiol y progesterona de hembras bovinas seleccionadas para fase folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral.	42
Figura 5	Imágenes representativas de la morfología <i>in vitro</i> de células de cultivo primario derivadas de endometrio bovino en fase folicular, fase luteal temprana y tardía del ciclo estral.	43
Figura 6	Imágenes representativas de la formación de colonias <i>in vitro</i> de cultivos primarios de endometrio bovino.	44
Figura 7	Imágenes representativas de la diferenciación <i>in vitro</i> condrogénica, osteogénica y adipogénica a los 7 y 14 días de células endometriales bovinas de fase folicular y luteal tardía del ciclo estral.	46
Figura 8	Imágenes representativas de la presencia o ausencia de banda de genes y proteínas para diferenciación condrogénica, osteogénica y adipogénica en células endometriales bovinas de fase folicular y luteal tardía del ciclo estral, inducidas <i>in vitro</i> durante 7 y 14 días.	47
Figura 9	Análisis de la expresión de marcadores OCT4, SOX2, CD44 y CD117 a través de PCR a tiempo real, en tejido y células derivadas de cultivos primarios de endometrio bovino durante la fase folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral.	49
Figura 10	Imágenes representativas de inmunohistoquímica de biopsias de tejido endometrial en fase folicular y luteal temprana y tardía para la detección de Oct4, Sox2 y Cd44.	51

Figura 11	Expresión de proteínas Oct4, Sox2 y Cd44 mediante western blot en tejido endometrial y células derivadas de cultivo primario durante las fases del ciclo estral bovino.	52
Figura 12	Corte histológico y tinción hematoxilina y eosina de biopsias de endometrio postparto en vacas sanas, con endometritis subclínica y clínica.	54
Figura 13	Imágenes representativas de la morfología <i>in vitro</i> de células de cultivo primario derivadas de biopsia endometrial en el postparto en vacas sanas, con endometritis subclínica y clínica.	55
Figura 14	Imágenes representativas de la formación de colonias <i>in vitro</i> de cultivos primarios de endometrio bovino sano, endometritis subclínica y clínica en el postparto bovino.	56
Figura 15	Imágenes representativas de la diferenciación <i>in vitro</i> de células de endometrio sano y con endometritis subclínica y clínica durante el postparto bovino a los 7 y 14 días.	58
Figura 16	Imágenes representativas de la presencia o ausencia de banda de genes y proteínas para diferenciación condrogénica, osteogénica y adipogénica en células de endometrio postparto bovino en vacas sanas, con endometritis subclínica y clínica, inducidas <i>in vitro</i> durante 7 y 14 días.	59
Figura 17	Expresión relativa de genes OCT4, SOX2, CD44 y CD117 a través de PCR a tiempo real, en tejido y células derivadas de cultivos primarios durante el postparto bovino en endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica.	61
Figura 18	Imágenes representativas de inmunohistoquímica de biopsias de endometrio sano, endometritis subclínica y clínica para la detección de Oct4 y Sox 2.	62
Figura 19	Expresión de las proteínas Oct4 y Sox2 mediante western blot en células derivadas de cultivo primario de endometrio postparto bovino.	63

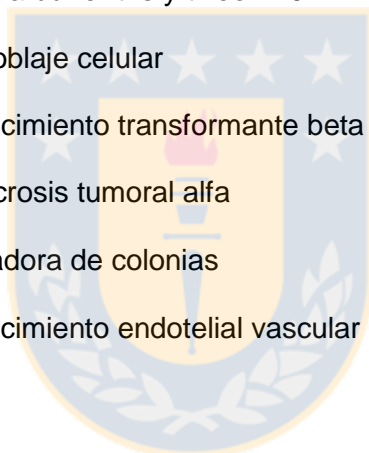
ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Resumen de estudios que han identificado posibles candidatos de células madre endometriales en animales de granja.	23
Tabla 2	Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real.	37
Tabla 3	Descripción y dilución de anticuerpos primarios utilizados en western blot.	39
Tabla 4	Descripción y dilución de anticuerpos secundarios utilizados en Western blot.	39
Tabla 5	Eficiencia clonogénica y tiempo de doblaje celular de células de cultivo primario <i>in vitro</i> de endometrio durante el ciclo estral bovino.	44
Tabla 6	Muestras seleccionadas durante el postparto bovino en endometrio sano y con endometritis subclínica y clínica.	53
Tabla 7	Eficiencia clonogénica y tiempo de doblaje celular de células de cultivo primario <i>in vitro</i> de endometrio de postparto de vacas sanas, con endometritis subclínica y clínica.	56
Tabla 8	Resumen de resultados de ensayos funcionales e identificación de marcadores de células madre mesenquimales en endometrio bovino durante el ciclo estral y postparto.	64

ABREVIACIONES

AAM	Antibiótico antimicótico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BMP	Proteína morfogénica ósea
CL	Cuerpo lúteo
COX	Ciclooxigenasa
CP	Punto de cruce
DEPC	Dietil pirocarbonato
E2	Estradiol
EC	Eficiencia clonogénica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Receptor de estrógeno
FA	Fosfatasa alcalina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GFP	Proteína verde fluorescente
IGF	Factor de crecimiento insulínico
IL	Interleukina
iPS	Célula madre pluripotente inducida
MSCs	Células madre mesenquimales
NK	Células Natural killer
P4	Progesterona
PBS	Solución fosfato salino
PGES	Prostaglandinas E

PGF2α	Prostaglandina F2 alfa
PGHS2	Prostaglandina-endoperóxido sintasa 2
PMN	Polimorfonucleares
PR	Receptor de progesterona
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
GABA	Ácido γ -aminobutírico
SDS-PAGE	Electroforesis con dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SP	Población lateral
TBS-T	Solución salina buffer tris y tween 20
TDC	Tiempo de doblaje celular
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidad formadora de colonias
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular



RESUMEN

El endometrio se somete a períodos críticos de remodelación, reparación y regeneración a lo largo de la vida reproductiva de la hembra. Las células madre se postulan como responsables de la renovación celular en tejidos alta y continuamente regenerativos como el endometrio. Las células madre mesenquimales de endometrio han sido las más estudiadas y son consideradas como una atractiva fuente celular, accesible y renovable para terapias regenerativas. Los avances en la identificación y caracterización de estas células han sido realizados principalmente en humanos y modelos murinos, siendo pocos los estudios existentes en otras especies de importancia agrícola como el ganado bovino. El objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar células madre mesenquimales en endometrio bovino a través del ciclo estral y en el postparto de vacas sanas y con endometritis.

Se tomaron muestras de endometrio a partir de tractos reproductivos post-mortem, durante el ciclo estral en las fase folicular (desde el día 18 hasta la ovulación o día 0) (n=4), luteal temprana (día 1-4) (n=4) y luteal tardía (día 11-14) (n=4), y biopsias endometriales durante el postparto (20-60 días) de vacas sanas (n=5), con endometritis subclínica (n=5) y clínica (n=3). Se aislaron, cultivaron y expandieron células de cultivo primario de endometrio, y se realizaron los ensayos de funcionalidad como clonogenicidad, proliferación y diferenciación a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico durante 7 y 14 días. Junto con ello se determinó la presencia de marcadores moleculares específicos para cada estirpe a nivel de ARNm y/o proteínas como AGGRECAN y SOX9 en diferenciación condrogénica, SPARC y RUNX2 en osteogénica y PAPP1 y Ppar γ en adipogénica. Además, se evaluó en tejido y células por RT-qPCR la expresión de OCT4, SOX2, NANOG (marcadores de pluripotencia), CD44 y CD117 (marcadores de multipotencia) y las proteínas codificadas Oct4, Sox2 y Cd44 por western blot o inmunohistoquímica.

Todas las células aisladas desde endometrio bovino mostraron características típicas de células madre mesenquimales, como morfología fibroblástica, adherencia al plástico y fueron capaces de proliferar, autorenovarse y formar colonias. Durante las fases del ciclo estral se obtuvieron similares resultados para el número de colonias y eficiencia clonogénica, pero el tiempo de doblaje celular fue significativamente mayor en células de la fase luteal temprana ($40,6 \pm 5,8$ horas) en comparación con fase folicular ($33,2 \pm 4,5$ horas) y luteal tardía ($34,5 \pm 5,6$ horas), con un valor de $p < 0,05$. Estas mismas células no mostraron habilidad para diferenciarse a alguna estirpe mesodérmica, como si se observó en el resto

de las células de las fases del ciclo estral que se diferenciaron a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico, con presencia de marcadores específicos de cada linaje a partir de los 7 días de inducidas las células. Por su parte, las células de postparto bovino con endometritis clínica mostraron diferencias significativas respecto a endometrio sano, con un menor número de colonias ($0,8 \pm 0,8$) y eficiencia clonogénica ($0,1 \pm 0,1$); a su vez un mayor tiempo de doblaje celular ($42 \pm 1,4$), todas las células de endometrio de postparto fueron capaces de diferenciarse a linaje condrogénico y osteogénico, y en el caso de linaje adipogénico, sólo las células de endometritis clínica no mostraron diferenciación. Cada diferenciación celular fue observada a partir de los 7 días de inducción, con presencia de la mayoría de los marcadores específicos para cada linaje.

El patrón de expresión génica en tejido y células derivadas de endometrio bovino fue esencialmente el mismo para todas las muestras, ya que expresaron OCT4, SOX2, CD44 y CD117, no así NANOG. En cuanto a las proteínas, se observó en la mayoría de las muestras de tejido y células la presencia de Oct4 y Sox2, a excepción de la expresión de Oct4 en células durante las fases del ciclo estral. Cd44 fue observado en células y tejido del ciclo estral, excepto en células en la fase folicular.

Por lo tanto, se plantea que el endometrio bovino presenta poblaciones de células madre mesenquimales y células progenitoras estromales que expresan marcadores de pluripotencia/multipotencia que varían en función del transcurso del ciclo estral y de la inflamación inherente a procesos patológicos puerperales. Este estudio permitió establecer un modelo animal para la obtención y caracterización de células madre mesenquimales en endometrio, lo que puede ser de gran utilidad en la obtención, identificación y caracterización de estas células en otras especies y/o su potencial uso en medicina regenerativa.

Palabras clave: células madre, células madre mesenquimales, endometrio, bovino, ciclo estral, postparto, endometritis.

ABSTRACT

The endometrium undergoes critical periods of remodeling, repair and regeneration throughout the entire female reproductive life. Stem cells are postulated as responsible of cell renewal in highly regenerative tissues such as endometrium. Mesenchymal endometrial stem cells, one of the most studied kind, are considered an attractive, renovable and accessible cell source for regenerative therapies. Advances in their characterization and identification have been mainly done in humans and murine models, being scarce in other relevant agricultural species, such as cattle. The objective of this research was to identify and characterize endometrial mesenchymal stem cells throughout the estrous cycle and postpartum of healthy cows and with endometritis.

For this study endometrium samples were taken post-mortem from reproductive tracts (n=4; in each phase), throughout the estrous cycle, in the follicular phase (from day 18 till ovulation or day 0), early luteal phase (days 1 - 4) and late luteal phase (days 11 - 14), and endometrial biopsies during postpartum (days 20 - 60) in healthy cows (n=5) and those with subclinical (n=5) and clinical (n=3) endometritis. Cell cultures taken from endometrial cell primary cultures were isolated, seeded and expanded to finally undergo functionality assays such as clonogenicity, proliferation and mesodermic differentiation to chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineages during 7 and 14 days. Along with this, the presence of specific molecular markers for each lineage were determined at ARNm and/or protein level, such as AGGRECAN and SOX9 for chondrogenic differentiation, SPARC and RUNX2 for osteogenic and PAPP1 and Pparg for adipogenic. Moreover, in tissue and cells the expression of OCT4, SOX2, NANOG (pluripotency markers), CD44 and CD117 (multipotency markers) by RT-Qpcr and the Oct4, Sox2 and Cd44 coded proteins were evaluated by Western Blot or Immunohistochemistry.

All the isolated cells from bovine endometrium showed typical mesenchymal stem cell characteristics such as fibroblastic morphology, adherence to plastic and were able to proliferate, self-renew and form colonies. Throughout the oestrus cycle stages, similar results were obtained for number of colonies and clonogenic efficiency, nevertheless, the cell doubling time was significantly higher in the early luteal phase (40.6 ± 5.8 hours) in comparison to the follicular (33.2 ± 4.5 hours) and late luteal phase (34.5 ± 5.6 hours), with a p value $<0,05$. These same cells did not show ability to differentiate into mesodermic lineage, as observed for the other cells of the stages of the oestrus cycle which differentiated

into chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineages with the presence of specific markers for each starting at day seven of induction. On the other hand, postpartum cells from endometritis cows showed significant differences with healthy puerperal endometrium with a lower number of colonies (0.8 ± 0.8) and clonogenic efficiency (0.1 ± 0.1), and in turn higher cell doubling time (42 ± 1.4). Moreover, all postpartum endometrial cells were able to differentiate to chondrogenic and osteogenic lineages; and in the case of adipogenic lineage, only cells from clinical endometritis did not show differentiation. Cellular differentiation was observed at the 7th day of induction, with the presence of most of the specific markers of each lineage.

The genetic expression pattern was essentially the same for all samples both in cells and tissue from bovine endometrium, these expressed OCT4, SOX2, CD44 and CD117 but not NANOG. Regarding proteins, most of the tissue and cell samples showed the presence of Oct4 and Sox2, but Oct4 was not expressed during the stages of the oestrous cycle and Cd44 was observed in cells and tissue of oestrous cycle, except in cells in the follicular phase.

Therefore, it is proposed that the bovine endometrium harbors mesenchymal stem cells and stromal progenitor cell populations which express pluripotency/multipotency markers the expression of that vary through the course of the oestrous cycle and due the inherent inflammatory pathological puerperal events. This study allowed the settlement of an animal model for isolation and characterization of endometrial mesenchymal stem cells, which might be of great usefulness in the collection, identification and characterization of these cells in other species and/or for their potential usage in regenerative medicine.

Keywords: stem cells, mesenchymal stem cells, endometrium, bovine, oestrous cycle, postpartum, endometritis.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia del útero recae en su rol crucial en la reproducción y supervivencia de las especies, siendo el principal responsable de la implantación del embrión y mantención del normal desarrollo del feto hasta el final de la gestación (Spencer y cols., 2005). El útero se somete a grandes cambios a lo largo de las distintas etapas de la vida reproductiva de la hembra (Teixeira y cols., 2008). Los cambios ocurren principalmente a nivel de endometrio, el cual presenta una capacidad regenerativa y remodeladora excepcional (Maruyama y cols., 2010). El constante suministro de células diferenciadas ha llevado a postular la idea de la participación de un componente de origen celular, como las células madre, las cuales son capaces de proveer continuamente las células necesarias para la regeneración de los tejidos adultos (Gargett y Ye, 2012).

Las células madre están presentes en la mayoría de los tejidos adultos en forma escasa y con un potencial limitado de proliferación (Maruyama y cols., 2010). Poseen un rol clave en la homeostasis e integridad del tejido, siendo capaces de mantener, generar y reemplazar células diferenciadas terminalmente como consecuencia de la renovación celular fisiológica o algún daño tisular ocasionado (Li y Xie, 2005).

La existencia de células madre en endometrio se postuló a mediados del siglo XX, pero no fue hasta un buen tiempo después en que se publicó la primera evidencia funcional en endometrio humano (Chan y cols., 2004). A partir de ello, se han logrado una serie de avances en la identificación y caracterización de las poblaciones de células madre existentes en el endometrio, particularmente en la de MSCs (Gargett y Masuda, 2010). Las MSCs promueven la angiogénesis, previenen la fibrosis y apoptosis, y además poseen propiedades inmunosupresoras y anti-inflamatorias (Caplan y Hariri, 2015). Además, las MSCs de endometrio pueden aislarse fácilmente del tejido de biopsia endometrial, el cual se obtiene de manera no invasiva y sin la necesidad de anestesia (Darzi y cols., 2016). Todas estas características, hacen que las MSCs de endometrio sean consideradas como una atractiva fuente celular, accesible y renovable para terapias regenerativas, tanto a nivel del tracto reproductivo, como en otros tejidos (Gargett y cols., 2012; Cervelló y cols., 2013). La identificación de MSCs ha sido dificultada por la falta de conocimiento acerca de su ubicación de origen y marcadores de superficie celular (Beyer y da Silva, 2006). Se ha propuesto que las MSC cumplen con tres características fundamentales: 1) adherencia a plástico, 2) capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*, y 3) fenotipo característico de marcadores de superficie tales como CD105, CD73 y CD90, y pérdida de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34, CD14 (CD11b), CD19

(CD79 α) y HLA-DR (Dominici y cols., 2006). Sin embargo, la identificación de marcadores moleculares de células madre es muy poco específica y están consensuados sólo para la especie humana (Gargett y Masuda, 2010). Es por ello que para la identificación de MSCs se realizan principalmente estudios que evalúan propiedades físicas, fenotípicas y funcionales típicas de células madre (Eckfeldt y cols., 2005). Asimismo, en los ensayos *in vitro* se examinan funciones de clonogenicidad, potencial proliferativo, auto-renovación y diferenciación, mientras que en los ensayos *in vivo* se evalúan funciones tales como la auto-renovación y la reconstitución del tejido (Gargett, 2007).

La mayoría de la información existente acerca de la identificación de MSCs en endometrio proviene de humanos y roedores, mientras que en el ámbito de medicina veterinaria se han estudiado algunas especies como caninos, porcinos, ovinos y bovinos. El bovino es una especie que ha sido utilizada frecuentemente en investigación biomédica y biotecnológica, ya que es un animal de importancia agrícola con un valor comercial significativo y que podría utilizarse como modelo para la aplicación de medicina regenerativa (Rossi y cols., 2014). Los estudios registrados acerca de la presencia de células madre en endometrio bovino son muy escasos y omiten períodos de la vida reproductiva de la hembra y del estado inflamatorio del tejido por los que transita el tejido endometrial y que son críticos en la remodelación, reparación y regeneración del endometrio bovino. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue identificar y caracterizar células madre mesenquimales en endometrio bovino, a través del ciclo estral y en el postparto de vacas sanas y con endometritis.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Características y funcionalidad del endometrio uterino.

El endometrio es un tejido activo y dinámico que posee componentes celulares como epitelio luminal y glandular, estroma, endotelio y algunas células del sistema inmune (Gargett, 2007). En bovinos el endometrio presenta una estructura uniforme, en donde el epitelio luminal rodea al tejido conectivo o estroma, el cual posee una gran vasculatura (Spencer y cols., 2012). El epitelio de la mucosa endometrial está formado por células secretoras provistas de microvellosidades y algunas de cilios en su borde apical (Mitko y cols., 2008). La submucosa está formada predominantemente por tejido conectivo y de sostén, junto con estructuras glandulares de tipo tubular, simple o ramificada (Ross y cols., 2007). Además, en la superficie del endometrio se presentan engrosamientos circunscritos ricos en fibroblastos y con una gran irrigación sanguínea, los cuales corresponden al área caruncular aglandular, que adquiere gran importancia durante la preñez en el intercambio de gases y micronutrientes entre la hembra gestante y su feto (Bazer y cols., 2012).

En el estroma se puede identificar matriz extracelular y fibroblastos, pero también macrófagos, linfocitos y otros tipos de células residentes y migratorias (Uduwela y cols. 2000). Las células estromales tienen una estrecha relación con el epitelio subyacente, lo que influye en su desarrollo, crecimiento, diferenciación y función, de acuerdo a los estímulos hormonales presentes (Spencer y cols., 2012). Además se presentan células de tipo endotelial, junto con fibras de músculo liso que forman parte de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido (Girling y Rogers 2005). En cuanto a las células del sistema inmune residentes en el endometrio, se pueden encontrar principalmente macrófagos, linfocitos T y células NK, que son las encargadas de regular la respuesta inmune local para la protección del tracto genital frente a alguna infección y para evitar el rechazo inmunológico durante la implantación embrionaria (Salamonsen y cols., 2003).

En hembras bovinas jóvenes el endometrio presenta poco espesor y contenido de glándulas, estas características cambian una vez que la hembra alcanza la madurez sexual, ya que el útero comienza a presentar cambios estructurales y fisiológicos, en función del perfil hormonal predominante (Madoz y cols., 2016).

Cambios uterinos y regeneración endometrial.

El endometrio es un tejido altamente regenerativo que durante las diversas etapas del período reproductivo de la hembra, se somete a una gran cantidad de ciclos de proliferación, crecimiento, diferenciación, apoptosis y/o pérdida celular (Szotek y cols., 2007; Gargett y cols., 2008). En las especies que presentan un ciclo estral, el endometrio presenta períodos de crecimiento y apoptosis celular, con baja pérdida de tejido endometrial y sin exhibir un sangramiento (Gargett, 2007). A su vez, estos cambios están regulados por las hormonas sexuales que son factores claves en la regeneración del tejido, mediante efectos mitogénicos y/o de diferenciación en células estromales y epiteliales del endometrio, durante el ciclo estral y también en la preñez (Spencer, 2004).

El ciclo estral representa un patrón cíclico de actividad ovárica, en la cual los dos ovarios actúan como una sola unidad frente a señales hormonales sistémicas, e influyendo en la dinámica folicular (Henriet y cols., 2012). Las estructuras presentes en el ovario varían dependiendo de la fase del ciclo estral en la que se encuentren y se relacionan, además, con concentraciones de P4 y E2 en plasma sanguíneo (Singh y cols., 2003). En bovinos, el ciclo se repite cada 17 y 23 días durante todo el año y en el se contemplan las fases folicular (proestro y estro) y luteal (metaestro y diestro) (Stevenson, 2007) (Figura 1).

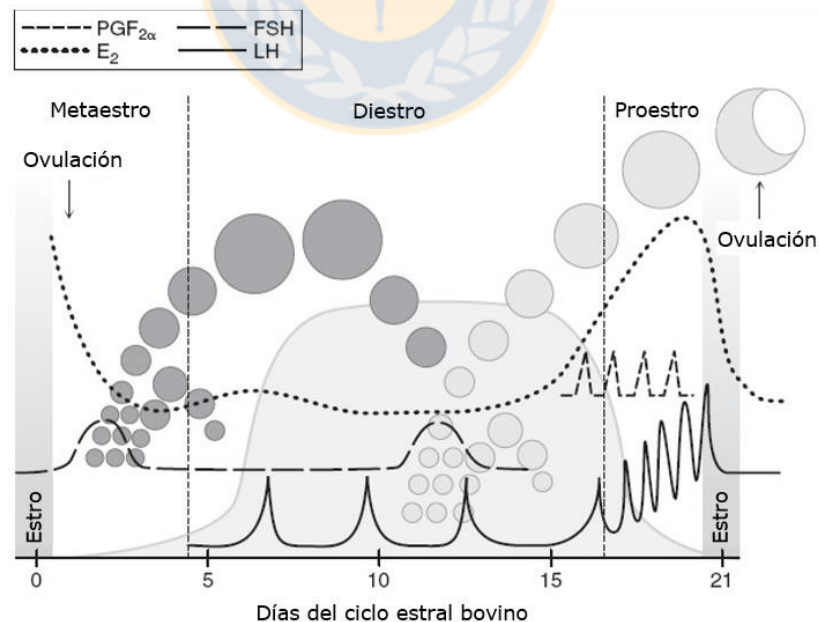


Figura 1. Fases del ciclo estral en la hembra bovina y su regulación hormonal. Fuente: Modificado de Stevenson (2007) en *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*.

Cada ciclo estral comienza con el estro o cuando la hembra presenta receptibilidad sexual, debido a un aumento en los niveles de E2 circulantes por presencia del folículo pre-ovulatorio ($>5\text{pg/mL}$) (Noseir, 2003). Además, los niveles de progesterona son bajos y se presenta engrosamiento del tejido mediante la proliferación del epitelio luminal y glandular, y/o de células del estroma y endotelio (Zhu y Pollard, 2007). Durante la etapa folicular los estrógenos regulan la supervivencia, viabilidad y los efectos mitogénicos en las células endometriales, mediante la interacción con el receptor $\text{ER}\alpha$, el cual es el principal receptor presente en el tejido endometrial adulto (Wada-Hiraiké y cols., 2006).

Por su parte el CL es la principal fuente de progesterona, en donde después del día 14 del ciclo estral las concentraciones de P4 son menores a 1 ng/mL , con una lenta regresión del CL ya no funcional (Rivadeneira, 2013). Después de la ovulación, el CL se desarrolla y las concentraciones plasmáticas de progesterona comienzan a aumentar progresivamente hasta $>4\text{ ng/mL}$ entre los días 10 y 12 días del ciclo para permanecer constante hasta la luteólisis, que comienza entre los días 16 a 19 del ciclo (Kastelic y cols., 1990). Concentraciones bajas y variadas de E2 plasmático han sido relacionadas durante la fase de crecimiento y regresión folicular ($<5\text{pg/mL}$) (Noseir, 2003). En el diestro la superficie de células epiteliales es dispersa y hay una alta y activa proliferación de glándulas uterinas y secreción de histótrofo (Mitko y cols., 2008). En bovinos se ha observado durante el metaestro y diestro, altos niveles de leucocitos en el lumen uterino, en comparación con otras fases del ciclo estral (Dhaliwal y cols., 2001).

Todos estos cambios tienen como finalidad establecer una receptividad del endometrio al embrión, ya sea por medio de secreciones de las glándulas uterinas, producción de hormonas, citoquinas y factores de crecimiento, que ayudan a mantener la homeostasis del tejido previo a la implantación (Gebhardt y cols., 2012; Henriët y cols., 2012). Si el embrión no está presente, los pulsos luteolíticos de $\text{PGF}2\alpha$ llevan a la regresión del CL después del día 18, resultando en una fuerte disminución en las concentraciones de P4 durante el proestro, que estimulan la apoptosis celular y extensa infiltración al epitelio luminal de granulocitos y macrófagos (Rivadeneira, 2013).

Los leucocitos desempeñan un papel importante en la remodelación del endometrio, generando una adecuada reparación, regeneración y remoción fagocitaria de los restos de tejido endometrial, para restablecer la integridad del endometrio (Salamonsen, 2003). La reparación temprana se produce mientras que los niveles circulantes de estrógeno son muy bajos y se requiere de la migración de las células epiteliales desde el tronco de las glándulas

basales hacia la superficie descubierta; evidenciándose a las 48 horas una superficie nuevamente epitelizada (Gargett y cols., 2012).

Los marcados cambios morfológicos y funcionales que se producen en el endometrio bovino durante el ciclo estral se ven reflejados en los estudios de análisis transcriptómico, en donde se han identificado 269 genes que mostraron cambios significativos en los niveles de transcripción a lo largo del ciclo, siendo mayor este cambio durante la fase estral y luteal (Mitko y cols., 2008). Otro estudio reveló un total de 133 genes que cambiaron su expresión en endometrio durante el ciclo estral, teniendo 65 de ellos una expresión mayor durante el estro y 68 en el diestro (Bauersachs y cols., 2008). Estos cambios en la expresión génica han sido relacionados con diversos procesos metabólicos, como por ejemplo, en el estro con la formación de adhesión focal, motilidad celular, citoesqueleto, matriz extracelular, remodelación de matrix extracelular y crecimiento celular, y durante la fase luteal, con la regulación negativa del crecimiento invasivo y procesos como la angiogénesis, remodelación vascular y regulación del flujo sanguíneo, que también podrían desempeñar un papel importante en la remodelación endometrial durante el ciclo estral (Bauersachs y Wolf, 2012). Estos cambios progesteronales en la morfología y funcionalidad del endometrio persisten y se intensifican en presencia de un embrión (Bauersachs y cols., 2008).

Durante la preñez y el parto, el endometrio se somete a una robusta destrucción y remodelación celular con cambios dramáticos en la morfología y funcionalidad del tejido, que en el postparto involucran procesos de reparación tisular con apoptosis, proliferación, degradación y reorganización de la matriz extracelular (Fazleabas y Strakova, 2002; Salamonsen, 2003). Es así como la preñez y el período postparto, han sido considerados como los períodos de mayor remodelación, reparación y regeneración endometrial (Cao y cols., 2015).

La gestación de la vaca dura 280-285 días, en donde el útero aumenta 15 veces su peso (Dyze y cols., 2015). Luego en el período postparto ocurre la involución uterina, la cual asegura que el útero recupere su estructura y función, haciéndose receptivo y apoyando un nuevo concepto (Chapwanya y cols., 2012). Este período en bovinos es relativamente rápido e involucra una reducción de al menos el 50% del tamaño uterino en 10-14 días, con culminación de la involución uterina a los 40 días postparto, aproximadamente (Okano y Tomizuka, 1996). Los más grandes cambios en el útero ocurren a los pocos días después del parto, e incluyen eventos macroscópicos, microscópicos y moleculares, como contracción y encogimiento físico, atrofia glandular y muscular, y posteriormente necrosis,

desprendimiento de carúnculas y regeneración del nuevo endometrio (Foley y cols., 2012). Inmediatamente después del parto, comienza la reparación endometrial experimentando cambios como maduración y colagenización de los placentomas, aplanamiento del epitelio de la cripta materna y aumento en la infiltración de leucocitos, con la consiguiente remodelación de carúnculas, regeneración del tejido endometrial y reducción en la vascularidad endometrial (Slama y cols., 1996). La regeneración del epitelio endometrial comienza rápidamente en el área intercaruncular dentro de los 8 días postparto y en el caso de zonas que fueron seriamente dañadas como carúnculas, el proceso es más lento (Noakes y cols., 1991). A pesar que a los 18 días postparto el epitelio glandular está presente en la zona basal del endometrio, no es hasta los días 46 a 54 en donde se recupera el diámetro externo e interno de las glándulas y su distribución en el tejido endometrial (Okano y Tomizuka, 1996). La reepitelización de las carúnculas se realiza en al menos 25 días, pero continúa su disminución en tamaño hasta los 40 a 60 días, esto debido a que el regreso del útero a un estado histológico normal después del parto requiere 20 días más que la involución anatómica (Dobson-Hill, 2009).

Endometritis postparto y alteración de la regeneración endometrial.

El endometrio puede verse afectado a lo largo de la vida reproductiva de la hembra bovina por la presentación de patologías uterinas, las cuales alteran la integridad del tejido y pueden afectar la normal regeneración endometrial (Sheldon y Dobson, 2004). Es durante el período del parto cuando existe un alto riesgo para el útero de adquirir infecciones, debido a la presencia de patógenos que pueden invadir el canal pélvico y cavidad uterina, generando con ello una inflamación del tejido durante el postparto y retrasando la involución uterina (Chapwanya y cols., 2012). Si bien durante esta etapa el útero se somete a una inflamación asociada con daño tisular e infección de la mucosa del endometrio, ésta es controlada eficazmente mediante la activación de mecanismos fisiológicos de defensa de la mucosa uterina como cambios de pH, alteraciones de la composición de las secreciones, cambios del nivel de anticuerpos, entre otros (Guzmán, 2013). En bovinos la involución uterina se ve seriamente afectada por las infecciones bacterianas, observándose que el 40% del ganado lechero presenta endometritis postparto. Este riesgo se incrementa al presentarse traumatismo de tejidos, retención de placenta, distocia, presencia de fetos muertos y/o parto gemelar (Healy y cols., 2014).

La endometritis es una inflamación del endometrio, provocada usualmente por la persistencia de una infección moderada, o al retraso en la involución uterina y que puede tener implicaciones en la aptitud reproductora futura de la hembra (Sheldon y cols., 2006). La endometritis puede causar enormes pérdidas económicas debido a un incrementado riesgo de descarte por fallas reproductivas posparto (anestro anovulatorio y fases luteínicas prolongadas) y aumento de los servicios por concepción (tasas de concepción más bajas, intervalos concepción-parto más prolongado) (Sheldon y cols., 2008).

A su vez, la endometritis puede ser clínica o subclínica, la primera se caracteriza por un flujo uterino purulento presente en la vagina a los 21 ó más días postparto, o de tipo mucopurulento detectable después de 26 días postparto (LeBlanc y cols., 2002). Por su parte, en la endometritis subclínica existe inflamación del endometrio en ausencia de secreción purulenta (Dubuc y cols., 2010). Durante la endometritis el tejido se ve afectado en diferentes grados. Por ejemplo, en las de tipo subclínica puede observarse desde infiltración de células mononucleares en el estroma, congestión de vasos sanguíneos, hemorragia y edema, hasta descamación celular y/o fibrosis y agregación periglandular. Por su parte, en la endometritis clínica existe una marcada infiltración de células mononucleares, fibroplasia, dilatación y/o reemplazo de glándulas endometriales (Singh y col., 2008).

La realización del diagnóstico de endometritis se realiza en base a anamnesis y palpación transrectal, lo que puede generar un número considerable de diagnósticos falsos positivos y que se reduce significativamente con el uso de vaginoscopía (LeBlanc y cols., 2002). Además, en el trabajo de terreno se utiliza ecografía para apoyar el diagnóstico de endometritis, pero ésta por si misma, no es lo suficientemente específica y por ello actualmente se utiliza el cytobrush como la prueba diagnóstica más confiable, además de su sencillez y bajo costo (Kasimanickam y cols., 2004). El cytobrush es el método más consistente y fiable de recolección de células inflamatorias, en donde los PMN predominan en la acumulación de líquido intrauterino y han demostrado ser un parámetro certero en el diagnóstico de endometritis (Dubuc y cols., 2010). Por lo tanto, es necesario combinar las pruebas diagnósticas de rutina con el método de cytobrush y así obtener una evaluación precisa del estado de endometritis (Barlund y cols., 2008). Es así, como Sheldon y cols. (2006) propusieron que una vaca con endometritis subclínica se define por >18% de neutrófilos en muestras citológicas uterinas recogidas a los 21-33 días después del parto, o >10% de neutrófilos a los 34-47 días en ausencia de endometritis clínica. Otro método de evaluación como la histología ha sido también utilizado para confirmar el diagnóstico de la

endometritis, de modo de apreciar directamente y en detalle la integridad de los tejidos, a partir de una biopsia endometrial (Meira y cols., 2012).

La infección uterina postparto produce cambios degenerativos del endometrio con lesiones histológicas como disrupción del epitelio, edema estromal, congestión vascular, migración e infiltración de células inflamatorias con pérdida parcial o total del tejido (Sheldon y Dobson, 2004). Estos eventos implican modificaciones en las propiedades físicas de las membranas celulares generando un severo daño tisular y/o necrosis celular, afectando así la capacidad regenerativa propia del tejido durante el postparto (Carneiro y cols., 2016). Se cree que la infección e inflamación pueden inhibir la regeneración del endometrio traumatizado mediante moléculas efectoras, que generan un daño sobre células residentes necesarias para la reparación y regeneración del tejido (Gargett y Ye, 2012).

Células madre en la regeneración endometrial

Células madre adultas

Las células madre se definen como células indiferenciadas, capaces de originar distintos tipos celulares específicos, de acuerdo a su potencia o capacidad de diferenciación (Weissman, 2000). Desde la formación del cigoto y durante las primeras divisiones celulares se presentan células madre totipotentes que son capaces de dar origen a todas las líneas celulares, necesarias para formar un organismo completamente funcional (Sterneckert y cols., 2012). Luego, en el desarrollo temprano del embrión, continúa la división celular produciéndose una disminución progresiva de la totipotencia, debido a la diferenciación a blastocisto (Eridani y Cova, 2003). Las células madre embrionarias o del macizo celular interno, se consideran como pluripotentes al conservar un amplio potencial de desarrollo para formar los tres linajes propios del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo) (Chagastelles y Nardi, 2011). Posterior a la gastrulación, las células embrionarias presentes son de tipo multipotentes y poseen la capacidad de desarrollarse a uno de los tres estirpes celulares de destino (Sterneckert y cols., 2012). Estas células persisten luego del nacimiento en la mayoría de los tejidos adultos en forma escasa, con un potencial limitado de proliferación y son denominadas células madre adultas, somáticas o específicas de tejido (Maruyama y cols., 2010).

Las células madre adultas poseen un rol clave en la homeostasis e integridad del tejido, ya que son capaces de mantener, generar y reemplazar células diferenciadas terminalmente,

como consecuencia de la renovación celular fisiológica o algún daño tisular ocasionado (Li y Xie, 2005). Se han identificado y caracterizado células madre en una amplia variedad de tejidos y órganos adultos durante los últimos años, como lo son la médula ósea, hígado, páncreas, intestino, epidermis, sangre periférica, entre otros (Kørbling y Strove, 2003; Gargett y Masuda, 2010). En el caso de tejidos altamente regenerativos, existe un suministro constante de células diferenciadas (Gargett, 2007). La mantención de una fuente de células madre disponible en los tejidos adultos se logra mediante la auto-renovación de estas células, las cuales experimentan una división asimétrica que da origen a una célula hija idéntica y una más diferenciada y comprometida a un tipo celular, llamada progenitora. Asimismo, la célula madre se somete al proceso de proliferación mediante una división simétrica, en donde genera células hijas progenitoras que originan a su vez células más diferenciadas denominadas de amplificación transitoria (Gargett, 2006) (Figura 2). Las células madre adultas presentan características funcionales propias, en donde se destaca un alto potencial proliferativo, una gran habilidad de auto-renovación y gran capacidad de diferenciación en al menos un tipo celular de la progeie funcional madura (Eckfeldt y cols., 2005). Además, se presentan en un estado quiescente o de inactividad celular (Fase G0 del ciclo celular) y poseen clonogenicidad o capacidad de formar colonias *in vitro* (Gargett, 2007).

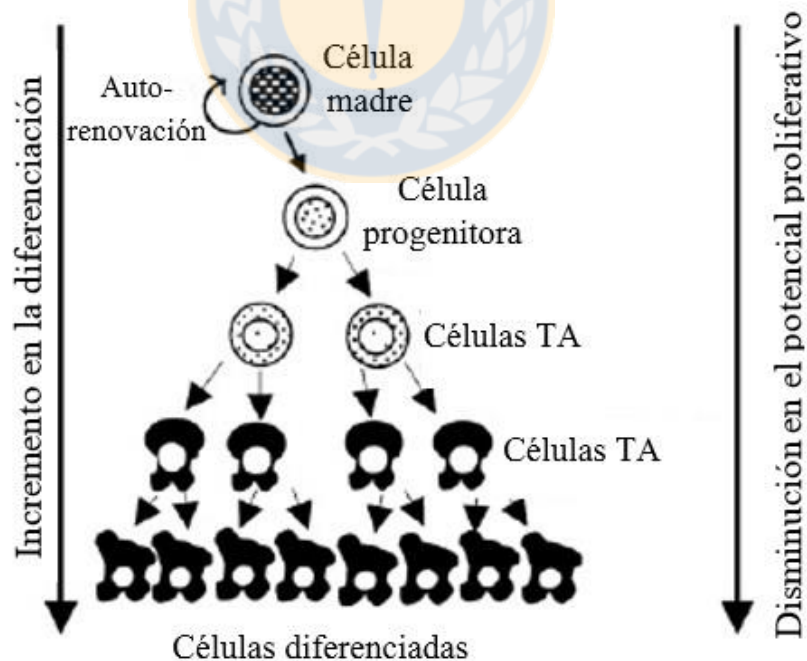


Figura 2. Organización de la diferenciación de células madre. Fuente: Adaptado de Chan y cols., 2004.

En la práctica, no todos los criterios de funcionalidad se pueden cumplir para todas las clases y tipos de células madre adultas (Maruyama y cols., 2010). Lo que es debido a la presencia de células más diferenciadas y la dificultad que se tiene para obtener poblaciones altamente puras de células madre (Ohlstein y cols., 2004). Es así como en la mayoría de los estudios se describe la presencia de varios subconjuntos de células madre en el tejido, que limitan la capacidad de autorenovación celular, potencial de diferenciación y vulneración a la senescencia, debido a la presencia de una progenie más madura (Weissman, 2000; Sethe y cols., 2006). Existe otra tendencia que define a las células madre aisladas como putativas, ya que se cree que la presencia de características funcionales *in vitro*, como por ejemplo una amplia autorenovación, no es concluyente para probar que la célula en cuestión es verdaderamente una célula madre *in vivo*, que produce descendencia de forma indefinida (Grompe, 2012). En el tejido las células madre residentes a menudo permanecen inactivas y se dividen con poca frecuencia. Sin embargo, una vez que las células madre son cultivadas con éxito *in vitro* es posible expandirlas hasta 40 generaciones, período en el que si bien mantienen su plasticidad, se reduce la tasa de crecimiento y presentan una vida útil finita (Deans y Moseley, 2000).

Las células madre que más han sido estudiadas en la mayoría de los tejidos son las MSCs, las cuales son conocidas como células madre mesenquimales o también como estromales mesenquimales y si bien el término mesenquimal abarca tejidos de origen mesodérmico o células estromales, en la práctica se considera que MSCs son derivadas de tejido conectivo y excluye células de la misma procedencia perteneciente al sistema músculo-esquelético, sanguíneo y urinogenital, como por ejemplo células madre hematopoyéticas (Sethe y cols., 2006). Las MSCs poseen características funcionales propias como adherencia en plástico y diferenciación al menos a condrocitos, osteocitos y adipocitos *in vitro*, además de la expresión de marcadores de superficie específicos (Dominici y cols., 2006). La capacidad de adherencia a el plástico que pueden tener estas células en condiciones estándar de cultivo *in vitro*, es una característica variable e inespecífica y por si sola no es suficiente para purificar y caracterizar MSCs (Riaño y cols., 2007). Es conocido que el estroma endometrial comprende una población heterogénea de células que pueden estar presentes e influir en las características de los cultivos celulares, por lo que es necesario realizar algunos manejos que permitan obtener una población más homogénea *in vitro* (Gargett y cols., 2009). Las condiciones estándar de cultivo excluyen subpoblaciones celulares hematopoyéticas derivadas de médula ósea y otros tipos celulares más diferenciados que pueden encontrarse en cultivos primarios de MSCs, ya que son incapaces de expandirse *in*

in vitro durante varios pases, resultando en un predominio de células madre al final del cultivo (Stewart y Stewart, 2011). Se ha observado *in vitro* en células endometriales, que al inicio del cultivo se presentan tanto células epiteliales como estromales y que luego experimentan un cambio en la morfología, adquiriendo un aspecto similar a fibroblastos y existiendo pérdida de células epiteliales alrededor de los días 7-8 de cultivo (Dimitrov y cols., 2008). Además, el cambio de medio a las 18 horas de iniciado el cultivo primario, permite obtener una población más homogénea de células con forma fibroblastoide y elimina posibles contaminantes como células muertas, epiteliales y eritrocitos (Fortier y cols., 1988).

Nicho de células madre

Las células madre residen durante un tiempo indefinido en un microambiente fisiológico específico del tejido llamado “nicho celular”, el cual varía en su naturaleza y ubicación dependiendo del tipo de tejido en el que se encuentren (Li y Xie, 2005). Se cree que el nicho celular es el que regula la participación de las células madre en la generación, mantenimiento y reparación de tejidos, de modo de conservar un adecuado equilibrio entre la sustitución de células madre y la provisión de suficientes células diferenciadas para el tejido y la consecuente funcionalidad del órgano (Lin, 2002; Scadden, 2006). De este modo, se evita una producción excesiva de células madre que podrían conducir a cáncer (Moore y cols., 2006). El nicho celular proporciona un entorno protector para la célula madre residente de forma de conservar su fidelidad genética a lo largo de su vida útil y mantener su capacidad de responder rápidamente a las necesidades del tejido para el reemplazo celular (Gargett y Masuda, 2010).

En el nicho, las células madre se encuentran en estrecha relación con una o más células circundantes diferenciadas, que junto con la matriz extracelular y diversas moléculas secretadas, proporcionan un microambiente clave para regular su funcionalidad (Moore y cols., 2006). Las interacciones adhesivas entre las células madre y la matriz extracelular se realizan mediante moléculas de adhesión, que agrupan a las integrinas y cadherinas (Scadden, 2006). Esta estrecha relación es la que mantiene a la célula madre en su lugar y la posiciona para recibir una o más señales intercelulares críticas (Ohlstein y cols., 2004). El nicho es capaz de mantener a las células madre en un estado latente y prevenir su diferenciación (Lin, 2002; Szotek y cols., 2007). Las vías de señalización involucradas son de tipo inhibitorias para el crecimiento y diferenciación, con la participación, a menudo, de los miembros de la familia de TGF β y BMP (Li y Xie, 2005). También se han implicado vías

de señalización en la regulación o mantención de la auto-renovación de las células madre como Wnt/ β -catenina, Notch, Hedgehog, BMP y otras (Eckfeldt y cols., 2005). Además, se ha observado en ciertos nichos la participación de VEGF, FGF-2 e IGF-1 (Gargett, 2007). En general, se describe que existen diversas vías de señalización que pueden controlar y regular la auto-renovación y proliferación de un tipo de célula madre, mientras que un sólo factor de crecimiento es capaz de controlar diferentes nichos celulares; y a pesar de la gran cantidad de moléculas que se han relacionado con la regulación del comportamiento de células madre, las vías de señalización BMP y Wnt han surgido como vías comunes para el control de la auto-renovación y destino del linaje celular en las diferentes especies (Li y Xie, 2005).

La localización e identificación de nichos de células madre ha sido difícil, debido a la compleja estructura anatómica. A pesar de esto se han descrito varios nichos celulares como el de células epiteliales localizado en el área de abultamiento de los folículos pilosos, el de células intestinales identificado cerca de la base de la cripta y el de las células hematopoyéticas en la médula ósea, entre otros (Li y Xie, 2005; Moore y cols., 2006). Además, han sido observados nichos celulares en tejido gonadal y epitelial, teniendo todos en común un nivel estructural de organización simple y mecanismos de señalización conocidos (Ohlstein y cols., 2004).

Rol de las células madre en la regeneración endometrial.

La naturaleza cíclica continua del endometrio a través de la vida reproductiva de la hembra implica una serie de cambios como la remodelación y regeneración del epitelio luminal y glandular, proliferación de células estromales, angiogénesis y el posterior retorno a un estado basal luego de cada ciclo reproductivo (Maruyama y cols., 2010). La gran capacidad de renovación celular presente en el tejido endometrial es similar a lo que ocurre en tejidos altamente regenerativos como la médula ósea hematopoyética, la epidermis y el epitelio intestinal, en donde las células madre son las responsables de la producción y regeneración celular continua (Gargett, 2007). Esto sugiere que la remodelación endometrial puede estar mediada por la acción de células especializadas, como las células madre que residan en los compartimentos del útero (Gargett y Masuda, 2010).

Se describe que la existencia de células madre endometriales humanas se propuso por primera vez a mediados del siglo XX (Cervelló y cols., 2013). Con posterioridad, se propuso la posible existencia de células germinales en la región basal del endometrio de primates y

que podrían ser las responsables de regenerar la capa funcional eliminada durante la menstruación (Pranishnikov, 1978; Padykula y cols., 1984; 1989). Su alto nivel de regeneración celular ha sido evidenciado en un estudio en primates, en que luego de una resección parcial del endometrio, se produjo una completa regeneración del tejido e incluso la hembra fue capaz de mantener una gestación hasta las 28 semanas de preñez (Wood y Rogers, 1993). Además, algunos autores proponen que la actividad mitótica de las células endometriales varía en función de las hormonas ováricas presentes a lo largo del ciclo menstrual (Cervelló y cols., 2013). La importancia de los estrógenos en la regeneración endometrial ha quedado demostrada en un estudio en mujeres postmenopáusicas con endometrio atrófico, que durante la terapia de reemplazo de estrógenos presentaron una regeneración del tejido. Esto sugiere que un grupo de posibles células madre permanecen preservadas y son responsables de la reconstrucción del endometrio en presencia de E2 (Schwab y cols., 2005).

Se describe que la reconstitución de tejidos *in vivo* por xenoinjertos de poblaciones de posibles células madre, es la prueba más rigurosa de la presencia y actividad de las células madre adultas en endometrio (Gargett y cols., 2012). A menudo se trasplantan células en sitios ectópicos tales como la cápsula del riñón o el tejido subcutáneo y aunque estos sitios no asemejan el microambiente del tejido del nicho celular, ellos proporcionan un rico suministro vascular y contienen a las células trasplantadas en una región confinada (Gargett, 2007). Se ha observado que el trasplante de suspensiones de células epiteliales y estromales de endometrio humano bajo la cápsula renal de ratones inmunodeficientes NOG ovariectomizados, indujo la formación de capas endometriales y miometriales bien organizadas, que comprendieron glándulas que proliferaron en respuesta a estrógeno, estroma que se diferenció a células deciduales con la administración de P4 y formación de grandes quistes sanguinolentos después del retiro de las hormonas, traducándose en un evento parecido a la menstruación en el tejido endometrial reconstituido (Masuda y cols., 2007). Se describe que posibles células madre presentes en estos injertos fueron capaces de generar vasculatura y migración de células endoteliales que a su vez expresaron ER β (80%), componentes estromales (13%) y de tipo glandular (8%) en el nuevo tejido generado (Masuda y cols., 2010).

Los cambios cíclicos del endometrio y las evidencias recopiladas que indican que células residentes del endometrio son probablemente responsables de la reparación y regeneración del tejido, señalan a las células madre como las encargados de cumplir este

rol el cual es crítico en la dinámica de la fisiología celular normal del endometrio (Gargett y cols., 2012).

Células madre en endometrio

Existen diversos estudios relacionados con la identificación de células madre en el endometrio y si bien son principalmente de humanos y/o modelos murinos, han entregado gran información para comprender y concluir los posibles mecanismos relacionados con las células madre en la regeneración endometrial en mamíferos (Gargett y cols., 2016). Pero actualmente no se puede definir si existe una célula madre en el endometrio que posea la capacidad de reemplazar a todas las células endometriales, o si bien se presentan varias células madre que colaboren en conjunto a la rápida regeneración del endometrio. Además, si bien la hipótesis acerca de la existencia de células madre en el endometrio uterino ha sido propuesta, su carácter, origen y ubicación anatómica exacta, ha sido difícil de determinar (Gargett, 2006).

Origen de células madre en endometrio

Se ha propuesto que las células madre endometriales pueden derivar de las células madre fetales residuales, que son capaces de persistir hasta el período postmenopáusico y tener una ubicación preferencial en el estroma de la capa basal del tejido (Cho y cols., 2004). Se cree también que las células madre hematopoyéticas podrían colonizar la capa del estroma durante la vida fetal y residir allí desde el nacimiento en adelante, de forma de poder migrar al tejido epitelial frente a alguna demanda celular (Bratincsák y cols., 2007).

Por otro lado, varios estudios se han centrado en la existencia de una fuente extrauterina de células madre adultas que presumiblemente son reclutadas hacia el tejido endometrial en cada ciclo. La ubicación vascular de poblaciones específicas de células madre endometriales y la localización perivascular de células madre mesenquimales, sugieren que el nicho de células madre de endometrio puede estar asociado con los vasos sanguíneos, siendo un posible portal de entrada para otras células como las derivadas de médula ósea (Du y Taylor, 2010; Gargett y Ye, 2012). También se ha postulado la existencia de un antepasado de las células madre mesenquimales que está asociado de forma nativa con la pared del vaso sanguíneo y que pertenece a un subconjunto de células perivasculares, siendo por si sólo o asociado a otros subgrupos celulares, una reserva de

células progenitoras y una posible fuente de células madre mesenquimales (Crisan y cols., 2008; da Silva Meirelles y cols., 2008).

Sin embargo, la mayoría de las líneas de investigación en humanos y roedores proponen a la médula ósea como el candidato más probable de fuente de células madre epiteliales y estromales del endometrio. Así, en un estudio realizado en mujeres sometidas a trasplante de médula ósea, se determinó tras una biopsia endometrial que existía la presencia de células provenientes desde el donante, observándose un quimerismo de 0,2 a 48% en células epiteliales y un 0,3 a 52% en las células del estroma (Taylor, 2004). Más tarde se determinó la presencia de células derivadas del donante masculino en un 1,7-2,6% del recuento total de células endometriales del paciente trasplantado, teniendo a su vez una menor contribución en el compartimento epitelial (0,45-0,85%) que a nivel de estroma (1-1,83%) (Cervelló y cols., 2011). Además se ha observado que células derivadas de médula ósea contribuyen a la formación de nuevos vasos sanguíneos en el endometrio humano y de ratón, identificándose un 14,2% de células endoteliales XY en el endometrio de mujeres a los dos años posteriores al trasplante de médula ósea, que disminuyó a un 9,6% al año siguiente. En el endometrio de ratones se evidenció un 6,2% de células endoteliales XY a los 40 días posteriores al trasplante de médula ósea (Mints y cols., 2008). Asimismo, se ha observado en ratones la presencia de células progenitoras hematopoyéticas del donante marcadas con GFP, en células del epitelio luminal del endometrio, llegando a colonizar un 82% del total de estas células en el caso de preñez y que a largo plazo se presentaron a nivel del endotelio vascular (Bratincsák y cols, 2007). Por otra parte, cuando se administró MSCs derivadas de tejido adiposo directamente en el útero de yeguas con endometriosis, se observó a los 7 y 21 días posteriores que estas células fueron capaces de incorporarse y proliferar en el tejido periglandular y glandular endometrial (Mambelli y cols., 2013). Si bien estos estudios evidencian la presencia de células derivadas de médula ósea en el endometrio luego de ser trasplantadas, es importante considerar que se trata de un pequeño número de células y que han sido observadas también en otros órganos como pulmón, hígado y tracto gastrointestinal, de modo de contribuir a la angiogénesis y/o diferenciación celular del nuevo tejido en el que residen (Du y Taylor, 2010).

Estos estudios sugieren que las células derivadas de la médula ósea pueden ser el origen de las células madre endometriales, pero no se puede asegurar que sean la fuente de células madre responsables de la regeneración endometrial durante cada ciclo (Cervelló y cols., 2011). Incluso se piensa que las células madre fetales residuales, podrían tener un

rol fundamental en la sustitución de este tejido (Gargett, 2007). Aunque aún no se ha podido llegar a definir el origen y fuente de estas células, se ha postulado que existen tres posibles candidatos de células madre endometriales, las células progenitoras epiteliales, células madre mesenquimales y células progenitoras endoteliales (Gargett y Masuda, 2010).

Identificación de células madre en endometrio

En general la presencia de células madre es poco frecuente en tejidos y órganos adultos, ya que carecen de características morfológicas distintivas, lo que hace que sean muy difíciles de localizar en los tejidos, y por lo tanto su identificación se basa principalmente en el estudio de sus propiedades funcionales (Eckfeldt y cols., 2005). En los ensayos *in vitro* generalmente se examinan funciones de clonogenicidad, potencial proliferativo, auto-renovación y diferenciación, mientras que en los ensayos *in vivo* se evalúan la auto-renovación y la reconstitución del tejido (Gargett, 2007).

Clonogenicidad y proliferación. Chan y cols. (2004), proporcionaron la primera evidencia de la existencia de células madre en endometrio humano, mediante la purificación de suspensiones de células epiteliales y estromales que cultivaron *in vitro* a una densidad de 300-500 células/cm², observando la formación de colonias dentro de 15 días, mostrando que células estromales poseen una capacidad clonogénica más pronunciada (1,25%) que células epiteliales endometriales (0,22%). La evaluación de clonogenicidad de células epiteliales y estromales en endometrio humano durante diferentes etapas del ciclo menstrual y actividad endometrial, no ha mostrado una variación significativa entre las fases proliferativa y secretora, ni en endometrio atrófico. Sin embargo, las células epiteliales y estromales mostraron una tendencia a un mayor número de células clonogénicas, en endometrio secretor y proliferativo, respectivamente (Schwab y cols., 2005). La capacidad clonogénica de células de endometrio humano se ha confirmado junto con su potencial de proliferación, en donde las UFC grandes, tanto para células epiteliales como estromales, fue mayor a 30 doblajes de la población y de 12 en el caso de UFC pequeñas (Gargett y cols., 2009). Se propone que una población escasa de células del estroma del endometrio con propiedades y fenotipo similar a MSCs de médula ósea o tejido adiposo, pueden encontrarse cerca de los vasos sanguíneos tanto en la capa basal como en la funcional (Gargett y Masuda, 2010). Se ha observado también que células estromales endometriales humanas cultivadas *in vitro* por más de 15 pasajes, poseen una eficacia promedio de

clonación de 15,4%, 11,6%, 2,1%, 0.2% y 1.3%, respecto al total de las células cultivadas a una densidad de 10, 20, 200, y 400 células/cm², respectivamente, y expresando características propias de MSCs (Dimitrov y cols., 2008).

En los ensayos de clonogenicidad, las MSCs generalmente se siembran *in vitro* a densidades bajas (10-1000 células/cm²) y/o extremadamente bajas (0,5-6 células/cm²) esto influye en las características de las colonias, ya que se ha observado que la pérdida de contacto célula a célula, permite que presenten una mayor tasa de proliferación, menor cantidad de células senescentes y mejor potencial tri-linaje en el cultivo durante la expansión (Balint y cols., 2015). MSCs se expandieron más rápidamente cuando se sembraron a densidades muy bajas (1,5-3 células/cm²) y al aumentar el número de células sembradas por cm² disminuyeron los porcentajes de eficiencia clonal, debido probablemente a que un número elevado de algunas colonias se vuelven confluentes y es difícil discriminar entre colonias individuales (Dimitrov y cols., 2008).

Diferenciación celular. En la mayoría de los tejidos adultos las células madre permanecen en forma escasa y con un potencial limitado de proliferación para generar células del tejido en el que residen (Maruyama y cols., 2010). Sin embargo, las células madre no son sólo unidades de organización biológica responsable del desarrollo y de la regeneración de los sistemas de órganos y tejidos, sino que también unidades de la evolución por selección natural (Weissman, 2000). Se ha observado que bajo ciertas condiciones microambientales estas células pueden cambiar su destino a otros tipos celulares distintos a los de su tejido, presentando una asombrosa capacidad de diferenciación o plasticidad celular (Lakshminpathy y Verfaillie, 2005). También se ha evidenciado que las células madre pueden convertirse a células de un linaje diferente al que pertenece, perdiendo marcadores y funcionalidad de su tejido de origen, y adquiriendo marcadores y función del nuevo tipo celular, sin someterse a una división celular, conociéndose este proceso como transdiferenciación (Tosh y Slack, 2002; Wagers y Weissman, 2004)

La plasticidad de las MSC endometriales ha sido analizada en diversos estudios, en donde ha quedado de manifiesto la capacidad de estas células de diferenciarse principalmente en linajes de tipo mesodérmico. Células estromales de endometrio humano fueron aisladas y cultivadas *in vitro*, observándose tiempo después una diferenciación a células adipogénicas, con presencia de típicas vacuolas ricas en lípidos (Dimitrov y cols., 2008). También se ha observado que estas células se diferencian a condrocitos con la expresión de glicosaminoglicanos sulfatados y colágeno tipo II, típico de cartílago articular humano (Wolff

y cols., 2007). Las células endometriales tipo MSCs pueden presentar, a la vez, capacidad de diferenciación a linaje mesodérmico, osteogénico, condrogénico y adipogénico (Schüring y cols., 2011). Se ha observado también que poblaciones específicas de células madre endometriales se diferenciaron en adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos y células endoteliales (Masuda y cols., 2012). Estas características de multipotencia también fueron observadas en células individuales clonogénicas de endometrio humano (Gargett y cols., 2009). Otros autores han demostrado que estas células endometriales han sido capaces de diferenciarse a 9 linajes celulares como, adipogénico, osteogénico, neural, endotelial, pancreático, hepático, células epiteliales respiratorias, cardiomiocitos y miocitos (Meng y cols., 2007). Incluso, células madre endometriales humana fueron diferenciadas *in vitro* en neuronas dopaminérgicas (Wolff y cols., 2010) y en ratona a células pancreáticas (Santamaría y cols., 2011). Poblaciones específicas de células epiteliales y estromales también pueden diferenciarse *in vitro* a linaje adipogénico y osteogénico (Cervelló y cols., 2010; 2011). Células endometriales cultivadas a partir de sangre menstrual, han mostrado una amplia capacidad de diferenciación a linajes condrogénico, adipogénico, osteogénico, neurogénico y cardiogénico (Patel y cols., 2008).

Las características de plasticidad demostradas en células endometriales MSC son similares a las de MSC de médula ósea y tejido adiposo, las cuales han sido utilizadas en diversos estudios de reconstrucción de tejido y se han sugerido como una alternativa a terapias regenerativas de tejidos (Schwab y Gargett, 2007). En general, los criterios utilizados para establecer la plasticidad en la mayoría de los estudios se han basado en la morfología y marcadores, y rara vez en la funcionalidad de las células diferenciadas (Lakshmiopathy y Verfaillie, 2005).

Marcadores moleculares de células madre en endometrio

Las investigaciones en curso acerca de la presencia de células madre en el endometrio se han centrado en la identificación de marcadores moleculares y debido a que poseen muy poca especificidad, se ha hecho necesario realizar estos ensayos en conjunto con estudios de funcionalidad de células madre (Gargett y Masuda, 2010). Actualmente el foco principal de atención es la identificación de marcadores moleculares de células madre estromales mesenquimales o MSCs endometriales (Gargett y Ye, 2012).

Se ha observado en humanos que UFC de células estromales obtenidas *in vitro*, expresaron marcadores típicos de células madre mesenquimales como CD29, CD44, CD73, CD90,

CD105, CD146 y PDGFR β (CD140b), pero no así para marcadores endoteliales y hematopoyéticos como CD31, CD34, CD45, HLA-DR y STRO-1 (Dimitrov y cols., 2008; Gargett y cols., 2009). Se ha demostrado que el útero de cerdas también contiene MSCs, en donde se expresaron marcadores como CD29, CD44, CD144, CD105 y PDGFR β , siendo negativas para CD34 y CD45 en células aisladas desde endometrio y miometrio, las cuales a su vez fueron capaces de diferenciarse *in vitro* en linajes adipogénicos y osteogénicos. Además, algunas células cultivadas a baja densidad formaron grandes colonias con una eficiencia de 0.035% (Miernik y Karasinski, 2012).

Se ha postulado que MSCs de endometrio humano pueden purificarse en base a la co-expresión de dos marcadores perivasculares, PDGFR β y CD146, observándose que en células CD146+PDGFR β + se expresaron marcadores de superficie típicos de MSCs, como CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, y carecieron de marcadores hematopoyéticos y endoteliales (Schwab y Gargett, 2007). Además, correspondieron al 1,5% de la población de células estromales obtenidas y demostraron poseer una mayor clonogenicidad que células CD146-PDGFR β - (7.7+1.7% y 0.7+0.2%, respectivamente), siendo también capaces de diferenciarse a linajes osteogénico, adipogénico, miogénico y condrogénico. Estas células residieron cerca de la vasculatura, tanto en la capa funcional y basal del endometrio humano, constituyendo un posible nicho perivascular de MSCs.

Al clasificar células estromales de endometrio humano en poblaciones de CD146+PDGFR β + (MSC), CD146-PDGFR β + (fibroblastos) y CD146-PDGFR β - (endoteliales), se observó que MSCs fueron clonogénicas y se diferenciaron en adipocitos, expresaron marcadores de pericitos y fueron inmunolocalizadas en el espacio perivascular de pequeños vasos endometriales. Además, expresaron genes implicados en la angiogénesis, vasculogénesis, inflamación, inmunomodulación, comunicación celular, proteólisis, inhibición, respuesta a hormonas esteroidales e hipoxia. También presentan un aumento en las vías de señalización Notch, TGF β , IGF, Hedgehog y del receptor acoplado a proteína G, lo cual es característico de los procesos de auto-renovación y multipotencia presentados en tejidos adultos de MSCs (Spitzer y cols., 2012). El uso de esta combinación de marcadores para la identificación de MSCs en endometrio, ha sido confirmado en múltiples órganos, donde se ha detectado la expresión de marcadores de MSCs en la superficie de células perivasculares nativas no cultivadas. Por lo tanto, se sugiere que la pared de los vasos sanguíneos albergan una reserva de células progenitoras que puede ser integral con el origen de la MSCs y otras células madre adultas, y que pueden estar asociadas con una subpoblación de pericitos (Crisan y cols., 2008). Si bien estos estudios

arrojan importante información acerca de las características y posible ubicación de las células madre endometriales, en la práctica se requiere de procedimientos complejos, en el que las células se ven expuestas más de una vez a un sistema de clasificación o purificación, que puede causar efectos perjudiciales sobre la viabilidad celular (Masuda y cols., 2012).

Así es como un nuevo marcador W5C5 ha sido propuesto para la identificación de MSCs de endometrio humano, el cual permite obtener células *in vitro* con propiedades similares a células CD146+PDGFR β + y que al trasplantar células estromales W5C5+ bajo la cápsula renal de ratones inmunodeprimidos NOD/Scid/g, se produce una reconstrucción del tejido estromal endometrial humano. Se observó que el 4,2% de las células estromales aisladas correspondieron a células W5C5+, las cuales presentaron una clonogenicidad significativamente más alta que células W5C5- y fueron capaces de diferenciarse a adipocitos, osteocitos, condrocitos, miocitos y células endoteliales. Además, se determinó que gran parte de ellas residen en la periferia de los vasos sanguíneos en la capa basal y funcional del endometrio (Masuda y cols., 2012)

Se ha evaluado también la presencia de otros marcadores moleculares en el endometrio de ratón y humanos, como OCT4 que es un marcador nuclear de pluripotencia presente en células madre embrionarias y algunas células madre adultas (Gargett y Masuda, 2010). Mediante inmuhostoquímica se ha observado que el 42% de las muestras obtenidas desde endometrio humano y equivalentes al 44% de los pacientes, fueron positivas para OCT4, y que a nivel de ARNm todas las muestras fueron positivas para este gen (Matthai y cols., 2006). En ratonas se demostró que el 10% de una población específica de células madre estromales endometriales, fue positiva a marcadores de indiferenciación celular como OCT4, lo que sugiere un posible rol de esta molécula en las células madre de endometrio (Cervelló y cols., 2007). Asimismo, se ha evidenciado OCT4 en varias líneas de células sanguíneas menstruales (Patel y cols., 2008) y en algunas células madre del miometrio uterino humano, a través de ARNm de OCT4 y proteína que mostró una ubicación limitada al núcleo celular (Ono y cols., 2010). Si bien aún no está clara la función que desempeña OCT4 en los tejidos adultos, se ha relacionado con la reprogramación de células somáticas asignándole un posible doble rol, ya sea en la mantención de la pluripotencia de células madre adultas y en la diferenciación celular, en donde es capaz de dirigir el destino de las células madre somáticas de acuerdo a un efecto de dosis génica (Stefanovic y Pucéat, 2010). Además, se ha visto la presencia de OCT4 junto a otro marcador de pluripotencia NANOG en endometrio humano y se ha considerado una fuente propicia de células para

inducir pluripotencia (Park y cols., 2011). Se ha visto que Musashi-1, un marcador de células progenitoras epiteliales que regula las vías de señalización de auto-renovación, se localizó en células individuales epiteliales de las glándulas endometriales y en pequeños grupos de células del estroma, demostrando en el endometrio proliferativo un aumento significativo de estas células en la capa basal, en comparación con la capa funcional (Götte y cols., 2008). Es importante considerar que la expresión de un marcador de células madre no necesariamente implica actividad de estas células, ya que es conocido que marcadores de células madre adultas también se expresan en células maduras (por ejemplo, CD34 es un marcador de células madre hematopoyéticas y de células endoteliales maduras), por lo que la identificación y caracterización de células madre en base a marcadores moleculares, debe estar acompañado por al menos un ensayo funcional de células madre (Gargett, 2007).

Células madre de endometrio bovino

Existen diversos estudios realizados para la identificación de células madre en endometrio principalmente en la especie humana o modelos murinos, siendo muy poca la información publicada en animales de granja. Sin embargo, estas células han podido ser aisladas en las especies porcina, ovina, caprina y bovina (Tabla 1).

La gran capacidad de regeneración del endometrio bovino durante las diferentes etapas de la vida reproductiva de la hembra, permitió postular, al igual que en humanos, la existencia de células madre residentes en el tejido. Es así como hace menos de una década se realizó el primer reporte de células madre en endometrio bovino, en donde se aislaron y cultivaron células estromales que a los 18 días de cultivo presentaron un cambio morfológico espontáneo, similar al fenotipo de células estromales de médula ósea bovina. Además mostraron capacidad de diferenciación a linaje osteogénico (Donofrio y cols., 2008). Posteriormente varios autores se enfocaron en el aislamiento e identificación de MSCs, que han sido establecidas como atractivos candidatos para la terapia celular (Darzi y cols., 2016). Las MSCs de endometrio bovino crecen adheridas al plástico, forman colonias, poseen una alta proliferación, así como capacidad de diferenciarse a linajes mesodérmicos como condrogénico y osteogénico (Cabezas y cols., 2014). Se ha observado también que el endometrio de vaquillas contiene MSCs con capacidad de diferenciarse a linaje adipogénico, una alta cinética de crecimiento debido al corto tiempo que se requirió para que las células duplicaran su población (Mehrabani y cols., 2015). Poblaciones celulares

homogéneas de MSCs de endometrio bovino han mostrado una gran eficiencia de clonogenicidad, las cuales expresan altos niveles de marcadores moleculares como CD29, CD44 y vimentina, y bajos niveles de expresión para CD34 y sin MHC-II (de Moraes y cols., 2016).

Tabla 1. Resumen de estudios que han identificado posibles candidatos de células madre endometriales en animales de granja.

Especie	Candidatos de células madre endometriales		Referencia
	Tipo	Características	
Porcina	MSCs	Expresión de marcadores de MSCs. Diferenciación osteogénica y adipogénica.	Miernik y Karasinki (2012)
Porcina	SD	Expresión de marcadores embrionarios y mesenquimales. Diferenciación condrogénica y osteogénica.	Bodek y cols. (2015)
Ovina	MSCs	Población CD271+ CD49f- con alta eficiencia clonogénica, capacidad clonogénica seriada y diferenciación linaje adipogénico, muscular, condrogénico y osteogénico	Letouzey y cols. (2015)
Caprina	MSCs	Alto potencial de proliferación y diferenciación a linaje adipogénico, condrogénico y osteogénico	Tamadon y cols. (2017)
Bovina	Estromal	Fenotipo similar a células mesenquimales derivadas de médula ósea. Capacidad de diferenciación a linaje osteogénico.	Donofrio y cols. (2008)
Bovina	MSCs	Expresión de marcadores de pluripotencia y multipotencia. Capacidad de diferenciación a multilinaje. Clonogenicidad y alta proliferación.	Cabezas y cols. (2014)
Bovina	MSCs	Expresión de marcador CD73+. Alta capacidad proliferativa. Diferenciación a linaje adipogénico.	Mehrabani y cols. (2015)
Bovina	Pluripotente	Expresión de marcadores de pluripotencia. Diferenciación a multilinaje.	Łupicka y cols. (2015a)
Bovina	MSCs	Expresión de marcadores mesenquimales. Clonogenicidad. Diferenciación a linaje osteogénico y adipogénico.	de Moraes y cols. (2016)

SD: Población lateral; MSC: Células madre mesenquimales. Fuente: Elaboración propia

En endometrio bovino se han investigado diversos marcadores que no necesariamente son los postulados en humanos para MSCs, ya que en general la identificación de marcadores moleculares de células madre es muy poco específico (Gargett y Masuda. 2010). Además, la limitada disponibilidad de anticuerpos especie-específico permite probar sólo algunos marcadores moleculares que están reportados previamente en literatura para la identificación de células madre en endometrio u otro tejido bovino. Es así como en el endometrio de vacas se ha evaluado la presencia de marcadores de pluripotencia Oct3/4, Sox2 y Nanog, postulando al endometrio como el principal sitio de células que expresan marcadores de pluripotencia en el útero bovino, las cuales se cree son más abundantes en el útero de los animales más jóvenes, debido a los altos niveles observados en la expresión de estos marcadores (Łupicka y cols., 2015a). Estos mismos autores indican que la expresión de los marcadores fue más alta en el cuerno ipsilateral en comparación con el contralateral al CL, sugiriendo que la actividad de las células madre uterinas es influenciada por las hormonas ováricas presentes a nivel local. Los marcadores de pluripotencia también han sido observados en útero bovino con adenomiosis, pero con cambios significativos en comparación con el útero normal. Esto sugiere que las alteraciones en las variaciones de esteroides ováricos puede afectar directamente el funcionamiento y proliferación de células madre endometriales, con el consecuente desarrollo de patologías uterinas (Łupicka y cols., 2015b).

La especie bovina ha sido utilizada frecuentemente en investigación biomédica y biotecnológica, ya que es un animal de importancia agrícola con un valor comercial significativo y que podría utilizarse como modelo en humanos o grandes animales para la aplicación de terapia celular regenerativa (Rossi y cols., 2014). En bovinos las infecciones uterinas como la endometritis son muy comunes durante el postparto, principalmente en el ganado lechero, en donde se ha relacionado con importantes pérdidas reproductivas (Hill y Gilbert, 2008). Además, se considera una fuente accesible para la obtención de muestras, debido a la gran disponibilidad de tejidos postmortem en mataderos locales y presentación de casos clínicos de endometritis. La gran capacidad regenerativa del endometrio bovino sugiere la participación de células madre presentes en el tejido y si bien existen registros en la literatura acerca de su identificación; estos son escasos y entregan una información limitada. Las variaciones hormonales durante el ciclo estral influyen y modifican el comportamiento de las células endometriales, lo que podría afectar también la presencia y/o características de las células madre residentes en las diferentes fases. Asimismo, la gran regeneración y remodelación del tejido durante el postparto bovino puede verse

alterada por la presencia de patologías inflamatorias como endometritis subclínica y clínica, que en diferente grado afectan la integridad y posterior regeneración del endometrio. Estos cambios pueden afectar directamente la presencia de células madre en endometrio, o quizás de algún modo modificar las características funcionales de ellas para reestablecer la homeostasis tisular y llevar a cabo la regeneración del tejido durante el postparto bovino. Es por ello que en el siguiente estudio se consideraron estos períodos críticos en la regeneración endometrial para identificar MSCs, las cuales han sido de elección en el uso de terapias regenerativas. La evaluación de la funcionalidad e identificación de marcadores moleculares permitirá caracterizar las MSCs en diferentes etapas, lo que es de gran importancia al considerarse el endometrio bovino como una posible fuente celular accesible y renovable.



HIPÓTESIS

La funcionalidad y presencia de marcadores de células madre mesenquimales en el endometrio bovino cambian a lo largo del ciclo estral y difieren en el endometrio postparto entre vacas sanas y con endometritis.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar y caracterizar células madre mesenquimales en endometrio bovino a través del ciclo estral y en el postparto de vacas sanas y con endometritis.

Objetivos específicos

1. Establecer un modelo experimental *ex vivo* a partir de tejido endometrial bovino, para la identificación de células madre mesenquimales y sus marcadores a lo largo del ciclo estral, y postparto bovino.
2. Evaluar marcadores de multipotencia y pluripotencia a nivel proteico y de ARN mensajero en tejido de endometrio durante la fase folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral y en el postparto de vacas sanas y con endometritis clínica y subclínica.
3. Identificar células madre mesenquimales a partir de cultivos primarios de endometrio durante las fases folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral y en el postparto de vacas sana y con endometritis clínica y subclínica.
4. Evaluar marcadores de multipotencia y pluripotencia a nivel proteico y de ARN mensajero en las células madre mesenquimales de endometrio durante las fases folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral y en el postparto de vacas sana y con endometritis clínica y subclínica.
5. Evaluar la funcionalidad de las células madre identificadas mediante ensayos biológicos de clonogenicidad, proliferación y diferenciación *in vitro* a estirpes mesodérmicas condrogénica, osteogénica y adipogénica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño Experimental

El estudio fue dividido en dos grandes experimentos de forma de identificar y caracterizar las MSCs y sus marcadores moleculares en endometrio bovino, tanto en el ciclo estral, como durante el postparto de vacas sanas y con endometritis (Figura 3).

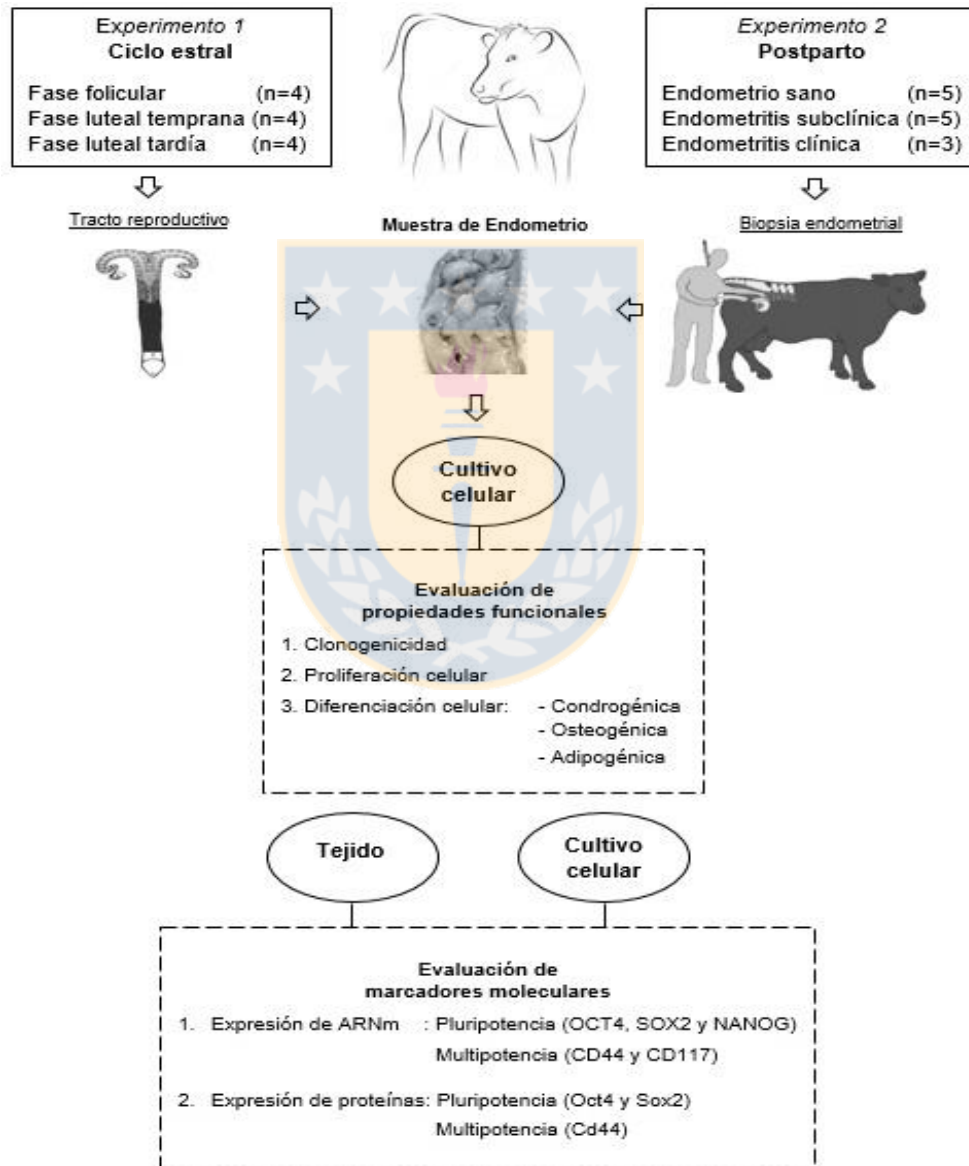


Figura 3. Diseño experimental del estudio de Células madre mesenquimales en endometrio bovino. Fuente: Elaboración propia.

En el Experimento 1 se seleccionaron 4 tractos reproductivos postmortem para cada una de las etapas del ciclo estral: fase folicular, luteal temprana y luteal tardía, los cuales fueron clasificados en base a la identificación visual de las estructuras de ambos ovarios, tonicidad, secreción presente en el genital, y se realizó la medición de las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol desde sangre periférica. A partir de estos tractos reproductivos se obtuvo la muestra de endometrio para cada una de las fases del ciclo estral.

Para el Experimento 2, se seleccionaron 5 biopsias endometriales para cada uno de los estados clínicos del endometrio durante el postparto: sano, endometritis subclínica y clínica. La clasificación de las muestras fue en base a un exámen clínico veterinario y evaluación citológica del endometrio.

En ambos experimentos se derivaron cultivos primarios de endometrio bovino y se evaluaron características funcionales y presencia de marcadores moleculares de modo de identificar *in vitro* la presencia de células madre mesenquimales. Las características propias de estas células que fueron evaluadas son apariencia fibroblastoide, capacidad de crecer en plástico y de formar colonias, proliferar y diferenciarse a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. Se analizó la presencia de marcadores de multipotencia y pluripotencia en tejido y células de cultivo primario, a nivel de ARNm y proteínas.

Obtención y selección de muestras.

Experimento 1. Los tractos reproductivos bovinos fueron obtenidos en la planta faenadora local Frigosur, a partir de hembras bovinas adultas de entre 1 a 2 años de edad, no preñadas, sanas y con apariencia normal del útero. Los tractos genitales se colectaron después del sacrificio de los animales e inmediatamente después se tomó una muestra de sangre en tubo limpio con heparina sódica 1% (Laboratorio Sanderson, Chile), desde la arteria carótida una vez realizada la decapitación de la hembra. Los tractos reproductivos y las muestras de sangre fueron mantenidos y transportados en un recipiente con hielo para su posterior procesamiento. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 185 g x 5 minutos a temperatura ambiente (Heraeus Megafuge 16, Thermo Scientific, Alemania), de modo de obtener el plasma sanguíneo.

Los tractos reproductivos fueron clasificados en cada fase del ciclo estral considerando la ovulación como día 0. De este modo, la fase folicular fue establecida a partir del día 18 hasta el día 0, la fase luteal temprana entre los días 1 y 4, y la fase luteal tardía entre los

días 11 y 14 del ciclo. La clasificación de los tractos genitales en base a la identificación visual de las estructuras de ambos ovarios, tonicidad y secreción del genital, y medición de las concentraciones plasmáticas de progesterona y estradiol circulante, fue realizada de acuerdo a los criterios descritos en literatura por varios autores (Ireland y cols., 1980; Kastelic y cols, 1990; Fernández, 2008).

De este modo, para la fase folicular se seleccionaron tractos genitales que presentaron ovarios con un CL no destacable, menor a 2 cm de diámetro, consistencia dura y con un folículo prominente mayor a 10 mm, genital con gran tonicidad, alta vascularización y abundante presencia de mucus cristalino y filante y concentración plasmática de estradiol mayor a 8 pg/mL y progesterona menor a 1 ng/mL. Para la fase luteal temprana se seleccionaron tractos reproductivos que presentaban un CL no destacable, con tamaño de 1-2 cm de diámetro, de consistencia blanda y varios folículos de diferentes tamaños menor a 5 mm, o folículos apenas perceptibles, con superficie ovárica lisa o con pequeñas depresiones, tonicidad, vascularización y secreción del genital fue moderada y se presentó una secreción mucosa e incluso sanguinolenta en baja cantidad. Las concentraciones de estradiol fluctuaron entre 1,8-7,5 pg/mL y la progesterona fue mayor a 1 ng/mL. Por su parte, en la fase luteal tardía se contempló un CL destacable mayor a 2 cm de diámetro, de consistencia dura, y folículos apenas perceptibles o destacables con presencia de variados tamaños y que llegaron hasta los 10 mm, tonicidad e irrigación baja del genital y con muy poca secreción y de tipo mucosa color amarillento, progesterona en altas concentraciones mayor a 3 ng/mL y estradiol con una concentración máxima fue de 2,5 pg/mL.

Los tractos reproductivos seleccionados fueron lavados tres veces con una solución salina estéril (NaCl 0,9%) y se procedió a abrirlos longitudinalmente con tijeras desde el oviducto hacia el cérvix, a través del cuerno uterino ipsilateral a la estructura predominante en el ovario, según la fase del ciclo estral. Las muestras de endometrio fueron obtenidas mediante un corte de 2 cm² aproximadamente, abarcando tanto la región caruncular como la intercaruncular.

Experimento 2. Las muestras de tejido endometrial fueron obtenidas desde hembras bovinas adultas de raza Holstein, de 3 a 6 años de edad, con un período postparto de entre 20 a 60 días. Cada animal fue sometido a un examen clínico veterinario mediante palpación transrectal, vaginoscopía y ecografía transrectal (HS-2100V, Honda, Japón), de forma de evaluar aspecto de la mucosa vaginal y pared uterina, presencia y tipo de secreción a nivel vaginal, útero y/o cuernos, y morfología ovárica. En base al diagnóstico del estado clínico del endometrio realizado en terreno, se tomaron muestras para vacas sanas, con

endometritis subclínica y clínica. Sin embargo, la clasificación definitiva de las muestras fue en base al análisis citológico y bacteriológico realizado en laboratorio. Para ello se tomó muestra de citología endometrial mediante la técnica de Cytobrush™, la cual emplea un pequeño cepillo protegido por una camisa de inseminación, que es insertado a través del cérvix y vagina hasta el útero, colectándose por rotación parte de la superficie del endometrio. El cepillo fue extendido directamente sobre un portaobjeto para el posterior recuento de PMN y el resto de la muestra fue suspendida en un tubo estéril de 15 mL de caldo triptona de soya (Merck Millipore®) para el cultivo microbiológico y evaluación de la presencia de algunos agentes patógenos como *Streptococcus bovis* y *pyogenes*, *Escherichia coli* y *Bacterias difteroides*. La clasificación de las muestras en base a la citología endometrial fue realizada según criterios descritos por Sheldon y cols. (2006) y Le Blanc y cols. (2002). La toma de muestra de endometrio se realizó mediante dos biopsias extraídas con una pinza de biopsia tipo tischler, obteniéndose un trozo de 1 x 0,4 cm aproximadamente para cada una de ellas.

En ambos experimentos las muestras obtenidas fueron procesadas en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Ciencia Animal, siendo divididas y separadas en tubos estériles de 15 mL con una solución PBS y AAM (HyClone®, Thermo Scientific) para cultivo celular primario, o con formalina tamponada al 10% por 48 horas para su fijación y posterior análisis de inmunohistoquímica. Las muestras de tejido fueron transferidas a un tubo estéril y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido, siendo almacenadas posteriormente a -80°C para la extracción de ARNm y proteínas.

Cultivo celular primario.

Las muestras obtenidas de endometrio de ambos experimentos fueron procesadas en base a una disrupción mecánica para facilitar la digestión enzimática, mediante fragmentación con pinzas y tijeras del tejido en trozos pequeños, los cuales fueron lavados 5 veces con solución de PBS y AAM. Estos fragmentos se depositaron en tubos de 15 mL con 3,5 mL de medio DMEM-F12 (Gibco™®) y 3,5 mg de colagenasa tipo I (Gibco®), y fueron incubados a 37°C en baño maría con agitación constante durante 2 horas, para lisar el tejido y aislar las células. Cada muestra fue homogenizada mediante pipeteo intenso y luego se dejó decantar durante 10 minutos los fragmentos de tejido que no fueron digeridos por la colagenasa. Finalmente, el lisado se centrifugó a 416 g por 10 minutos a temperatura ambiente y el precipitado resultante se depositó en placas de cultivo de 100 mm de

diámetro, con medio estándar DMEM-F12, suplementado con 10% SFB (HyClone®, Thermo Scientific), 1 mM de piruvato (Sigma-Aldrich®), 2 mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich®) y AAM. Las células fueron incubadas en condiciones estándar a 39°C con una atmósfera de 5% CO₂ y humedad relativa de 95% (MCO-18AC, Panasonic, Japón), con cambio de medio de cultivo a las 18 horas posteriores, para eliminar las células epiteliales que tienen un pegaje más tardío y luego cada dos días, siendo observadas diariamente en microscopio invertido (CKX41, Olympus, Japón), de forma de evaluar su morfología y adherencia, hasta alcanzar un 80 a 90% de confluencia. Luego las células fueron congeladas, retirando primero el medio desde las placas de cultivo celular y realizando tres lavados con PBS, para luego agregar 1 mL de tripsina (Gibco®) y desprender las células desde la placa durante 4 minutos a 39°C. La adición de medio de cultivo DMEM-F12 suplementado detuvo el efecto de la tripsina, por lo que se homogenizó y colectó todo el medio con células y se centrifugó a 416 g por 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado obtenido fue resuspendido en medio de criopreservación con dimetilsulfóxido 10% (Sigma-Aldrich®), SFB al 20% y medio de cultivo DMEM-F12 suplementado, considerando al menos 2 millones de células en cada vial de congelación de 1 mL (Thermo Scientific), los cuales en primera instancia, fueron puestos en un recipiente de congelación Frosty (Thermo Scientific) durante 3 días a -80°C, para ir disminuyendo la temperatura en forma gradual y luego se trasladaron a nitrógeno líquido para su almacenamiento final.

Evaluación de propiedades funcionales de MSCs.

Para la identificación de MSCs se evaluó en cultivo *in vitro* la morfología, adherencia al plástico y propiedades funcionales, mediante ensayos de clonogenicidad, proliferación y diferenciación celular. Todos estos ensayos fueron realizados en triplicado con células de cultivo primario en pase 3. Para ello las células almacenadas en viales fueron descongeladas y cultivadas en condiciones estándar, con cambio de medio cada dos días, hasta alcanzar un 80 a 90% de confluencia, ser tripsinizada y nuevamente cultivadas hasta el pase de interés. El recuento celular se realizó mediante cámara de Neubauer (Precicolor, Hamburgo, Alemania), considerando al menos 5 cuadrados en ambos lados de la cámara sin diferir en más del 10%. El cálculo de la cantidad total de células presentes en la suspensión celular se realizó en base a la cantidad de células contadas sobre el volumen de la cuadrícula y el factor de dilución utilizado.

Clonogenicidad.

Las células de cada muestra fueron sembradas en pase 3 en placas de cultivo de 60 mm a una baja densidad de 30 células/cm² y cultivadas durante un mes en las mismas condiciones estándar que para células de cultivo primario, con cambio de medio cada 15 días. Cada placa fue examinada dos veces por semana para verificar que cada colonia fue originada de una única célula. Pasado el tiempo en cultivo, se eliminó el medio y las células fueron fijadas mediante paraformaldehído 2% y teñidas con giemsa para visualizar las colonias, las cuales fueron consideradas como tales conteniendo más de 20 células. La habilidad de las células para formar colonias fue calculada mediante la fórmula descrita por Chan y cols. (2004):

$$\text{Eficiencia clonogénica (\%)} = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Número de células sembradas}} \times 100$$

Se evaluó, además, la funcionalidad de las colonias mediante tinción para fosfatasa alcalina (Vector® Red substrate; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), en donde las colonias positivas a la tinción mostraron una coloración roja, observada mediante microscopio digital invertido fluorescente EVOS FL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Este es un atributo de células madre mesenquimales y permite descartar que las colonias sean de origen fibroblástico.

Proliferación celular.

Las células fueron sembradas en pase 3 en placas de 60 mm a una densidad de 2.000 células/cm², y cultivadas en las mismas condiciones estándar que para células de cultivo primario, con cambio de medio cada dos días hasta que alcanzaron un 100% de confluencia. El tiempo de doblaje celular fue calculado usando según la fórmula decrita por Vidal y cols. (2006):

$$TDC = \frac{TC}{DC}$$

TDC = Tiempo de doblaje celular

DC = Número de doblaje celular

TC = Tiempo en cultivo

$$CD = \frac{\ln \left(\frac{N_f}{N_i} \right)}{\ln 2}$$

Nf = Número final de células

Ni = Número inicial de células sembradas

Diferenciación celular.

Se utilizaron dos líneas de cultivo primario al azar de cada fase del ciclo estral (FFol2 y FFol3, FLTemp1 y FLTemp2, FLTard3 y FLTard4) y del estado patológico del endometrio bovino (PPESano1 y PPESano4, PPESubcl3 y PPESubcl4, PPEClin2 y PPEClin3). Estas células fueron sembradas en pase 3 en placas de 6 pocillos a una densidad de 4×10^4 por pocillo en triplicado y se cultivaron en las mismas condiciones estándar que para células de cultivo primario, con cambio de medio cada dos días, hasta que alcanzaron un 90% de confluencia. Luego, el medio de cultivo estándar se reemplazó por medio de diferenciación, ya sea condrogénico, osteogénico o adipogénico, con cambio cada tres días. En cada ensayo de diferenciación se mantuvieron células controles sin inducir, que fueron mantenidas en DMEM low glucose (HyClone®, Thermo Scientific), 10% SFB, 1 mM de N-Piruvato, 2 mM de L-glutamina, AAM, sin suplemento o inductores. La determinación de la capacidad de diferenciación celular se realizó a los 7 y 14 días de iniciado el cambio de medio condicionado, mediante tinción y evaluación de la presencia de genes y proteínas específica en células control e inducidas.

Diferenciación condrogénica:

El medio de cultivo consistió en DMEM low glucose, 10% SFB, 1 mM de N-Piruvato, 2 mM de L-glutamina, AAM y suplementado con 100 nM de Dexametasona (Sigma-Aldrich®), 35 ug/mL Ácido Ascórbico (Sigma-Aldrich®) y 1x Insulina-transferrina-selenio (Gibco®). La evaluación de la diferenciación condrogénica se realizó mediante tinción con azul de Alcian (Sigma-Aldrich®), en donde primeramente las células fueron fijadas en etanol al 100% (Sigma-Aldrich®) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se añadió a cada pocillo 1 mL de azul de Alcian al 0,02% con pH 1, dejándolos por 3 horas en agitación (VRN-360, Gemmy, Taiwan). Luego se realizó tres lavados con 1 mL de etanol al 100% durante 5 minutos, en agitación y se retiró el exceso de etanol con glicerol al 80% (Sigma-Aldrich®). El azul de Alcian permitió teñir los hidratos de carbono asociados a grupos sulfato o carboxilos permitiendo detectar la presencia de glicosaminoglicanos, glicoproteínas

sulfatadas o carboxiladas, que son muy comunes en la matriz extracelular y abundante en los tejidos de cartílago.

Diferenciación osteogénica:

El medio constó de DMEM low glucose, 10% SFB, 1 mM de N-Piruvato, 2 mM de L-glutamina, AAM y suplementado con 50,9 μ M de Dexametasona, 10 mM de β -Glicerol Fosfato (Sigma-Aldrich®) y 0,1 mM de Ácido Ascórbico. Por su parte, la evaluación de la diferenciación condrogénica se realizó mediante tinción con rojo de alizarina (Sigma-Aldrich®), previa fijación de las células con formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich®) por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadió a cada pocillo 1 mL de rojo de alizarina al 2% con pH 4,1-4,3, siendo incubados durante 20 minutos en agitación y posteriormente las células fueron lavadas 4 veces con PBS al 1% por 5 minutos en agitación. El rojo de alizarina se une al calcio y otros cationes, permitiendo teñir los cristales de hidroxiapatita de calcio y otros cristales de fosfato, que son abundantes a nivel de tejido óseo.

Diferenciación adipogénica

El medio constó de DMEM low glucose 10% SFB, 1 mM de N-Piruvato, 2 mM de L-glutamina, AAM, y suplementado con 1 μ M de Dexametasona, 1x insulina-transferrina-selenio, 0,25 mM 3-isobutyl-1methylxanthine (3-IBM) y 100 mM indometacina. La evaluación de la diferenciación adipogénica se realizó mediante tinción con aceite rojo (Sigma-Aldrich®), previa fijación primero de las células con paramormaldehído 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego las células se tiñeron con aceite rojo por 20 minutos en agitación. La tinción se eliminó mediante lavados de PBS y se aclaró con glicerol al 80%. La tinción permitió teñir y observar acumulación intracelular de lípidos y/o vacuolas lipídicas.

Además de la evaluación visual mediante tinción celular en las diferenciaciones, se determinó paralelamente la presencia de genes y proteínas propias de cada linaje celular, para lo cual las células fueron cultivadas en triplicado y procesadas por separado para el análisis de ARNm y en conjunto para el caso de proteínas. Los genes y proteínas evaluados son detallados en la siguiente sección.

Evaluación de marcadores moleculares de MSCs.

Para caracterizar las MSCs de endometrio bovino, se determinó la expresión de marcadores de pluripotencia (OCT4, SOX2 y NANOG) y multipotencia (CD44 y CD117), a nivel de genes y algunos también de proteínas, tanto en tejido como en células derivadas

de cultivo primario, para todas las muestras del estudio. En el caso de evaluar la diferenciación celular a multilinaje, se determinó la expresión de los genes AGGRECAN y SOX9 y la proteína Aggrecan para la inducción condrogénica. En el caso de osteogénesis los genes fueron SPARC y RUNX2, y la proteína Sparc. Finalmente se evaluó el gen PPAF1 y la proteína Ppar γ en la diferenciación adipogénica. La expresión de ARN de los genes mencionados fue analizada mediante RT-qPCR y las proteínas mediante inmunohistoquímica en tejido y western blot en tejido y células.

En las células en cultivo en pase 3 el medio fue retirado, con posteriores lavados con PBS y las células fueron desprendidas mediante raspado de la placa. Luego las muestras obtenidas se centrifugaron a 416 g x 10 minutos a 4°C (CT15RE, Hitachi, Japón), de modo de obtener un precipitado de células que fue utilizado posteriormente en la extracción de ARN y proteínas.

Extracción de ARN.

El ARN de tejido y de células se obtuvo siguiendo las instrucciones del kit de extracción Trireagent (Sigma-Aldrich®). Las muestras fueron resuspendidas en 1 mL de solución Trireagent por cada 50-100 mg de tejido y 5×10^6 de células, siendo el tejido fragmentado completamente con un homogeneizador de rotor (Pro200, Proscientific, EEUU) y las células homogeneizadas por pipeteo intenso. Para completar la disociación de los complejos de nucleoproteínas, se dejaron las muestras a temperatura ambiente por 5 minutos y se agregó 0,2 mL de cloroformo por cada mL de trireagent utilizado originalmente. Se agitó en vórtex, se dejó reposar 2-15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 2-8°C. Tras la centrifugación se evidenciaron tres fases, una superior que correspondió a la fase acuosa que contiene el ARN, una fase intermedia de ADN y una fase orgánica inferior con proteínas. La fase acuosa fue apartada y procesada según las instrucciones del kit para la extracción de ARN, resuspendiendo en un volumen final de 20 μ L, que se almacenó a -80°C hasta su evaluación.

Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real.

Para la evaluación de los genes a nivel de ARN, se realizó previamente una transcripción reversa de modo de obtener ADNc, el que luego fue analizado y cuantificado por qPCR. Primeramente, se tomaron 2 μ L de cada muestra para cuantificar el ARN presente y se depositó en un pocillo de microplaca para ser leído mediante espectrofotometría (Epoch™, BioTek, EE.UU.). En cada procedimiento de transcripción reversa se consideró un control

negativo y positivo, tanto para el gen como para la enzima. De esta forma 500 ng de ARN fueron sometidos a un tratamiento con ADNasa para eliminar el posible ADN genómico presente en la muestra, siguiendo los pasos del kit Revertaid H. Minus first strand ADNc synthesis (Thermo Scientific). A cada muestra obtenida se le añadió 1 μ L de random primer y se llevó a un volumen final de 12 μ L con agua DEPC (Mo Bio Laboratories, Inc). Luego se agregó a cada muestra 8 μ L de la mezcla de reacción que contuvo: 4 μ L de buffer de reacción 5X, 2 μ L de dNTP mix (10mM cada uno), 1 μ L de inhibidor ARNsa riboblock y 1 μ L de la enzima transcriptasa reversa H Minus M-MuLV (Moloney- Murine Leucemia Virus). Se generó un volumen final de 20 μ L que se incubó en un termociclador (MG-96, Ronbio Scientific, China) durante 5 minutos a 25°C, 60 minutos a 42°C y finalmente 5 minutos a 70°C para detener la reacción y detener la actividad enzimática. El producto final fue almacenado a -20°C hasta su análisis.

El qPCR o reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, permitió obtener múltiples copias desde un fragmento de ADNc y cuantificar los niveles de expresión de los marcadores de interés, mediante el método de curva estándar. Para ello se tomó una muestra del control positivo de cada gen y se sometió a la reacción de PCR, la cual se realizó con el kit SensiMix™ SYBR Hi-ROX (Bioline, Berlin, Alemania), en un volumen final de 10 μ L (mezcla: 5 μ L de Sensimix 5x, 2,5 μ L de agua estéril DEPC, 10 pmoles de cada partidor y 2 μ L de ADNc).

Los partidores fueron diseñados utilizando el programa PrimerQuestSM (IDT, EEUU), a partir de las secuencias publicadas en GenBank (NCBI secuencia de referencia) y se sintetizaron en IDT (Integrated ADN Technologies, Inc) (Tabla 2). Se diseñaron partidores considerando sólo exones o regiones que flanqueaban e incluían a los mismos y al menos un 50% de uniones GC. Además, se utilizaron sólo aquellos partidores que mostraron una eficiencia de amplificación de entre 90-110%.

Las reacciones fueron corridas en PCR a tiempo real (Stratagene-Mx3000P, Stratagene, Grand Island, NY, NY, EEUU) y el producto final fue de 10 μ L, el cual se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 60 minutos a 80V, comprobando por luz ultravioleta la presencia y talla de la banda de cada gen. Este procedimiento fue utilizado además para evaluar la presencia o ausencia de genes específicos de los ensayos de diferenciación celular. Cada banda fue extraída desde el gel de acuerdo a las instrucciones del Kit E.Z.N.A.® Gel Extraction (Omega Bio-Tek) y posteriormente se determinó la concentración de ADNc extraído.

Tabla 2. Secuencia de partidores y temperaturas de alineamiento para la amplificación de los genes mediante PCR tiempo real.

Gen	Secuencia de partidores	TA (°C)	Tamaño (pb)	Identificador NCBI
OCT4	F: 5'GGAGAGCATGTTCCCTGCAGTGC3' R: 5'ACACTCGGACCACGTCCTTCTC3'	58	95	NM_174580
SOX2	F: 5'CGAGTGGAACTTTTGTCCG3' R: 5'GGTATTTATAATCCGGGTGTT3'	55	101	NM_001105463
NANOG	F: 5'TTCCCTCCTCCATGGATCTG3' R: 5'ATTTGCTGGAGACTGAGGTA3'	58	219	NM_001025344
CD44	F: 5'GACTGTACATCGGTCACGGACC3' R: 5'GGTATAACGGGTGCCATCACGG3'	58	84	S63418.1
CD117	F: 5'TCCAAACTCATCTGTCTCACC3' R: 5'CCCACATCGTTATAAGCCCTG3'	58	112	AF263827.1
AGGRECAN	F: 5'CGCATTTCCAAGGAGAAGGAG3' R: 5'GAGCGCATGTTCTGGATTTTC3'	62	146	XM_018251445
SOX9	F: 5'AAGTTCCCCGTGTGCATC3' R: 5'TGCGGCTTGTTCTTGCTC3'	63	109	AF278703.1
SPARC	F: 5'ATCCACGAGAATGAGAAGCG3' R: 5'GCACAGGGAAGATGTACATGT3'	62	100	NM_174464
RUNX2	F: 5'TGTGGTACTGTCATGGCG3' R: 5'TCGTTGAACCTGGCTACTTG3'	62	129	XM_010799141
PPAF1	F: 5'ACCAGTGCCTGACCTTTC3' R: 5'AGCCGTCCTTGACAGATG3'	62	75	AB009278.1
ACTB	F: 5'GGCCAACCGTGAGAAGATGACC3' R: 5'GAGGCATACAGGGACAGCACAG3'	58	96	BT030480.1

TA: temperatura de alineamiento. Fuente: Elaboración propia.

La curva estándar se realizó con al menos 8 diluciones seriadas (1:10) que fueron cargadas en duplicado al igual que las muestras y control negativo, de modo que fueron consideradas como réplicas técnicas. El CP fue calculado por el software apropiado incorporado en el

equipo y se utilizó β -actina como gen de referencia para normalizar los CP y determinar las diferencias en los niveles de expresión entre las muestras estudiadas. La normalización se realizó utilizando los niveles de expresión de β -actina obtenidos por curva estándar, como cociente de los valores obtenidos para cada gen.

Extracción de proteínas.

Las proteínas de células y tejido fueron extraídas mediante buffer de lisis RIPA (Sigma-Aldrich®). Las células en suspensión (2×10^6) fueron lavadas con PBS enfriado en hielo y centrifugadas a 2000 g durante 5-7 minutos a 4°C, luego se agregó el buffer de lisis, se agitó en vórtex durante 30 min a 4°C, se centrifugó a 14000 g durante 20 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante que contuvo a las proteínas extraídas. En el caso del tejido, a 5 mg se añadieron 300 μ L de tampón de lisis enfriado con hielo y la mezcla se homogeneizó con vórtex, añadiendo 300-600 μ L más de buffer de lisis, para luego dejar agitándolo por 2 h a 4°C y centrifugar a 14000 g durante 20 minutos a 4°C, para recoger el sobrenadante con las proteínas contenidas. Posteriormente, las proteínas extraídas en ambas muestras fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en microplacas (Epoch™, BioTek, EE.UU.) y almacenadas a -20°C.

SDS-PAGE y Western blot.

Las muestras de proteína total fueron analizadas para determinar la presencia de marcadores específicos, mediante la técnica de Western blot. Se tomaron 20-40 μ g de proteína total y se mezclaron con buffer de carga 6x, para ser cargadas en cada pocillo del gel. El gel utilizado fue de poliacrilamida y la concentración utilizada fue de 10%, de modo de separar las bandas proteicas de entre 21-200 kDa, que es donde se ubican las proteínas de interés. Las muestras fueron corridas mediante SDS-PAGE durante 2 horas a 100V (Mini-Protean®, Biorad, EE.UU.). Luego se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (Thermo Scientific 0,45 μ m), mediante un equipo de transferencia semiseco (TE70X, Hoefer, Alemania) a 15V durante 40 minutos. Se realizó un bloqueo de los sitios no específicos de las proteínas, incubando la membrana con leche descremada al 5% en TBS-T, en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con TBS-T, se incubó la membrana con el anticuerpo primario durante toda la noche, en una dilución que se estandarizó en función de la proteína evaluada, considerando una concentración inicial de 1:100 (Tabla 3). Se realizaron tres lavados de TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, durante 1

hora a temperatura ambiente en agitación. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron obtenidos desde Santa Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA) y se detallan en Tabla 4. Luego de tres lavados con TBS-T se agregó el sustrato de quimioluminiscencia (SuperSignal West Pico, Thermo Scietific), que se unió al anticuerpo secundario emitiendo una señal, la cual fue captada por una película radiográfica y visible luego del revelado del film. La presencia de la proteína en cada muestra se determinó mediante la señal de las bandas observadas a una misma altura de peso molecular. A su vez, la membrana fue reutilizada mediante la técnica de stripping (Abcam®), desprendiendo los anticuerpos primarios y secundarios desde la membrana para evaluar la presencia de la proteína constitutiva β -actina en las mismas muestras, actuando como control interno de la técnica.

Tabla 3. Descripción y dilución de anticuerpos primarios utilizados en Western blot (WB).

Proteína	Anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Peso molecular	Dilución en WB
Oct4	PA1-16943, Thermo	Policlonal (conejo)	40 kDa	1:200
Sox2	PA5-17282, Thermo	Policlonal (conejo)	35 kDa	1:200
Cd44	sc-31043, Santa Cruz	Policlonal (cabra)	90-95 kDa	1:200
Aggrecan	sc-25674, Santa Cruz	Policlonal (conejo)	200 kDa	1:200
Sparc	sc-33645, Santa Cruz	Monoclonal (ratón)	43 kDa	1:100
Ppar γ	sc-1981, Santa Cruz	Policlonal (cabra)	54/57 kDa	1:100
B-actina	sc-47778, Santa Cruz	Monoclonal (ratón)	43 kDa	1:1000

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4. Descripción y dilución de anticuerpos secundarios utilizados en Western blot (WB).

Anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Dilución en WB
sc-2030, Santa Cruz	Cabra anti-conejo IgG-HRP	1:10000
sc-2033, Santa Cruz	Burro anti-cabra IgG-HRP	1:10000
sc-2318, Santa Cruz	Burro anti-ratón IgG-HRP	1:20000

Fuente: Elaboración propia.

Inmunohistoquímica.

Las muestras de tejido fueron almacenadas y fijadas en formalina tamponada al 10% durante 48 horas, y procesadas según protocolo para inmunohistoquímica (Abcam®). Se lavaron con alcohol 70% y fueron embebidas en parafina en un procesador automático

(Shandon citadel 1000, Thermo Fisher Scientific, Santiago de Chile, Chile), donde las muestras fueron sometidas a una deshidratación en baños sucesivos de soluciones en concentración crecientes de etanol. Luego se aclararon mediante xilol y se pusieron en parafina en un centro de inclusión (AP280, Microm, Berlín, Alemania), de forma de generar un bloque homogéneo en dureza y consistencia. Posteriormente se realizaron cortes de 4 μm del tejido, los cuales se sometieron a los procesos de desparafinación e hidratación con varios lavados con xilol y etanol, bloqueo de peroxidasa endógena, recuperación y exposición de antígenos por medio de citrato de sodio pH 6 o EDTA pH 8 y se realizaron lavados con PBS, bloqueo proteico con suero normal de cabra al 10% e incubación a 4°C durante toda la noche, en una dilución que se estandarizó en función de la proteína de interés, pero que considerará una concentración inicial de 1:100. Una vez incubadas las muestras fueron secadas a temperatura ambiente, lavadas e incubadas con un polímero conjugado con peroxidasa (ImmPRESS Reagent kit peroxidase, Vector Laboratories), emitiéndose una señal la cual fue captada por el cromógeno DAB (ImmPACTtm DAB peroxidase sustate kit, Vector Laboratories, Bethesda, MA, Estados Unidos); siendo después contrateñidas, deshidratadas, aclaradas y montadas para ser observadas por microscopía óptica (Axioskop 40, Carl Zeiss, Zeiss, Alemania).

Las proteínas que fueron evaluadas en tejido mediante inmunohistoquímica fueron, Oct4, Sox2 y Cd44. A su vez, la inmunoreactividad de las muestras fue demostrada mediante la evaluación de citoqueratina y vimentina, en donde las muestras fueron incubadas con los respectivos anticuerpos en una concentración de 1:200 a 37°C por una hora.

Análisis estadístico

Cada ensayo para evaluar las propiedades funcionales y marcadores moleculares de MSCs, fueron realizados en triplicado, de forma de observar la variabilidad técnica en los procedimientos. Los parámetros evaluados como n° de colonias, eficiencia clonogénica y tiempo de doblaje celular, fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Por su parte, la actividad de fosfatasa alcalina de las colonias y capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos, fue evaluada visualmente según la presencia o ausencia de coloración y/o estructuras y genes específicos de cada diferenciación. En el caso de los ensayos de marcadores moleculares, la expresión génica obtenida por qPCR fue expresada como promedio \pm desviación estándar. Para proteínas se determinó la presencia o ausencia de señal o coloración para western blot e inmunohistoquímica, respectivamente.

El análisis estadístico de los parámetros cuantitativos evaluados fue realizado mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis en el programa estadístico Infostat (Córdoba, Argentina, 2016), considerando diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$. Los grupos de cada experimento fueron comparados entre si, de modo de evaluar las diferencias entre las fases folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral y entre endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica durante el postparto bovino.



3. RESULTADOS

Experimento 1: Identificación y caracterización de MSCs y sus marcadores moleculares en endometrio durante el ciclo estral bovino.

Muestras seleccionadas

Se seleccionaron 4 tractos reproductivos obtenidos en matadero, para cada una de las fases del ciclo estral: folicular, luteal temprana y luteal tardía (Figura 4).

	Fase folicular (día 18 po - ovulación)				Fase luteal temprana (día 1 - 4 po)				Fase luteal tardía (día 11 - 14 po)			
	FFol1	FFol2	FFol3	FFol4	FLTemp1	FLTemp2	FLTemp3	FLTemp4	FLTard1	FLTard2	FLTard3	FLTard4
Tracto reproductivo												
Ovario derecho												
Ovario izquierdo												
Estradiol (pg/mL)	8,3	9,7	12	10	7,5	5,8	1,8	5,1	2,5	2,2	1,5	2,4
Progesterona (ng/mL)	0,8	0,9	0,2	0,3	1,0	1,6	2,3	1,8	4,0	3,2	4,4	3,9

Figura 4. Tractos reproductivos, morfología ovárica y concentraciones plasmáticas sanguíneas de estradiol y progesterona de hembras bovinas seleccionadas para fase folicular (FFol), luteal temprana (FLTemp) y tardía (FLTard) del ciclo estral. po: posterior a la ovulación. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 1.1 Evaluación de propiedades funcionales de MSCs.

Cultivo primario de células *in vitro*

Los cultivos primarios de endometrio bovino durante la fase folicular, luteal temprana y luteal tardía, fueron mantenidos *in vitro* en condiciones estándar de medio de cultivo y se observó que todas las células tuvieron la capacidad de adherirse a plástico y mostrar una morfología

de aspecto fibroblastoide (Figura 5). Además, dentro de los 5-7 días de iniciado el cultivo las células alcanzaron una confluencia total.

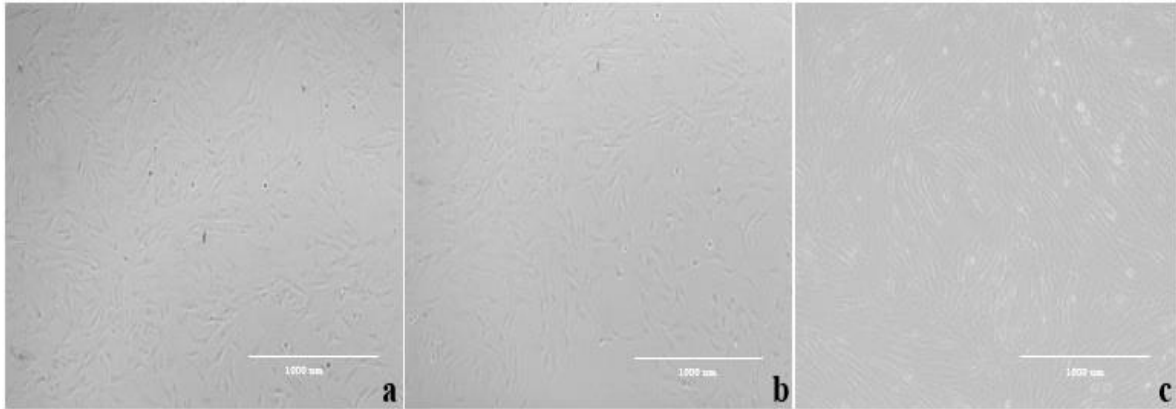


Figura 5. Imágenes representativas de la morfología *in vitro* de células de cultivo primario derivadas de endometrio bovino en fase folicular (a), fase luteal temprana (b) y tardía (c) del ciclo estral con aumento de 40x. Fuente: Elaboración propia.

Clonogenicidad y proliferación celular

Cuando las células fueron sembradas a baja confluencia (30 células/cm^2) todas las líneas celulares fueron capaces de proliferar y formar colonias, las cuales presentaron actividad de fosfatasa alcalina positiva (Figura 6). En cada línea celular las colonias mostraron una variedad en tamaño y número de células, pero la mayoría de las colonias fueron grandes conteniendo más de 50 células.

Se realizó un seguimiento de cada cultivo *in vitro* de forma de asegurarse que cada colonia fue formada a partir de una única célula. El recuento total de colonias fue similar entre líneas celulares independiente de la fase del ciclo estral, con un rango de entre 3 a 6 colonias observadas por pocillo sembrado. De este modo, entre el $0,5 \pm 0,1$ y $0,6 \pm 0,1\%$ de las células cultivadas mostraron habilidad para dividirse y formar colonias. El tiempo en cultivo que se demoraron las células en duplicar la cantidad inicial de siembra fue similar entre la fase folicular y luteal tardía con un promedio de $33,2 \pm 4,5$ y $34,5 \pm 5,6$ horas, respectivamente; tiempos que fueron significativamente menores al tiempo de doblaje observado para células de la fase luteal temprana con $40,6 \pm 5,8$ horas (Tabla 5).

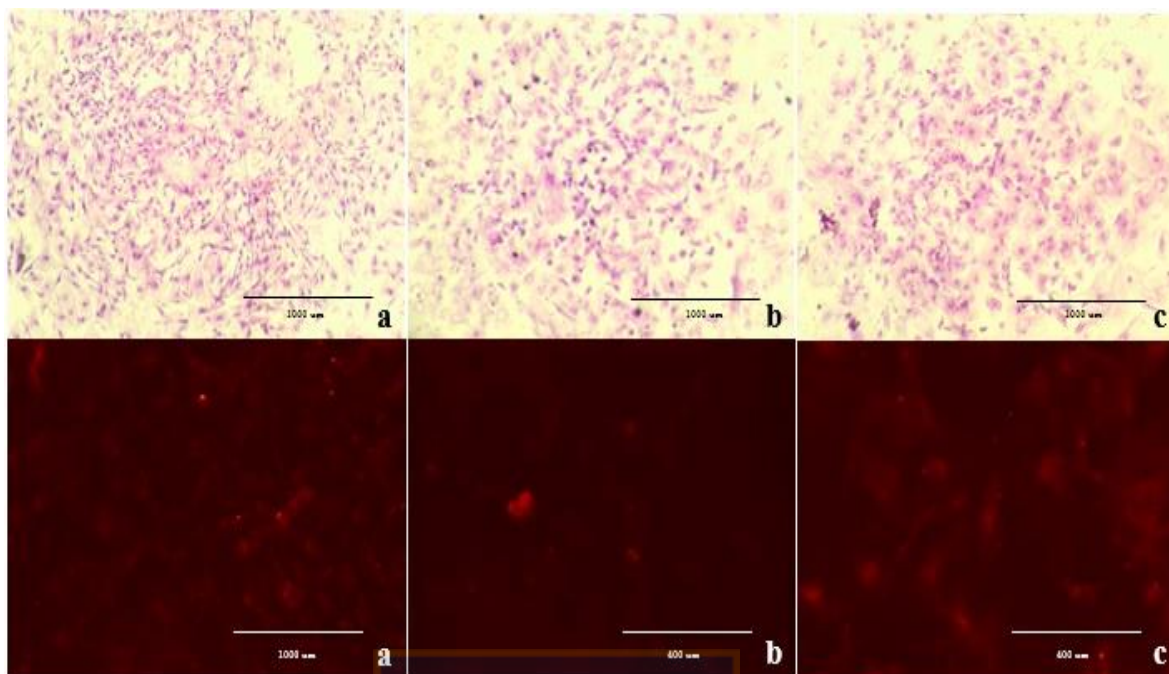


Figura 6. Imágenes representativas de la formación de colonias *in vitro* de cultivos primarios de endometrio bovino. Panel superior: Tinción giemsa de núcleos celulares con aumento 40x; panel inferior: Actividad fosfatasa alcalina positiva con aumento 100x, en fase folicular (a), luteal temprana (b) y luteal tardía (c) del ciclo estral. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 5. Eficiencia clonogénica (EC) y tiempo de doblaje celular (TDC) de células de cultivo primario *in vitro* de endometrio durante el ciclo estral bovino. Cada ensayo fue realizado en triplicado para todas las líneas celulares de cada fase.

Línea celular	N° Colonias (\bar{x})	EC (%)	TDC (hrs)
FFol ($\bar{x} \pm D.E.$)	4,2±1,3 ^a	0,5±0,1 ^a	33,2±4,5 ^a
FLTemp ($\bar{x} \pm D.E.$)	5,1±0,7 ^a	0,6±0,1 ^a	40,6±5,8 ^b
FLTard ($\bar{x} \pm D.E.$)	4,6±1,1 ^a	0,5±0,1 ^a	34,5±5,6 ^a

FFol: Fase folicular, FLTemp: Fase luteal temprana, FLTard: Fase luteal tardía. ^(a,b)Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas entre grupos con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Diferenciación celular a linajes mesodérmicos

Las células de cada fase del ciclo estral fueron cultivadas y diferenciadas a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico (Figura 7).

Fase folicular y luteal tardía:

Las líneas de cultivo primario de fase folicular y luteal tardía mostraron una respuesta temprana a los medios de inducción, ya que a los 7 días de diferenciación se observó la presencia de células teñidas y/o estructuras específicas en cada uno de los linajes inducidos, variando aparentemente en base a los días de inducción y tipo celular utilizado. En general, subjetivamente la intensidad de marcaje fue mayor a los 14 días que a los 7 días de iniciada cada diferenciación celular. Los cultivos de células pertenecientes a la fase luteal tardía mostraron una mayor cantidad de células teñidas y se observaron estructuras más definidas en comparación con los de fase folicular, para todos los linajes mesodérmicos evaluados. Además, las células diferenciadas a linaje adipogénico mostraron gran desprendimiento de células a partir de los primeros días de haberse realizado el cambio a medio de inducción; observándose a simple vista una menor cantidad de células teñidas respecto a células de linaje condrogénico y osteogénico. No se observó marcaje en los controles de células que no fueron inducidas durante el cultivo.

Fase luteal temprana

Las células pertenecientes a la fase luteal temprana se mantuvieron hasta el final del cultivo, pero no mostraron tinción para los linajes evaluados, tampoco se observó un cambio evidente en la morfología de las células y se asemejó a lo encontrado en células al inicio del cultivo y en controles de células no inducidas.

En las células que mostraron diferenciación mediante tinción, como en fase folicular y luteal tardía, se evaluó la presencia de genes y proteínas específicas para cada linaje al que las células fueron inducidas. Así, se pudo detectar la expresión de los genes AGGREGAN y SOX9 en las muestras de células diferenciadas a linaje condrogénico a los 7 y 14 días; SPARC y RUNX2 en inducción a linaje osteogénico y PPAR-1 para linaje adipogénico, siendo las respectivas células controles negativas para la presencia de estos genes.

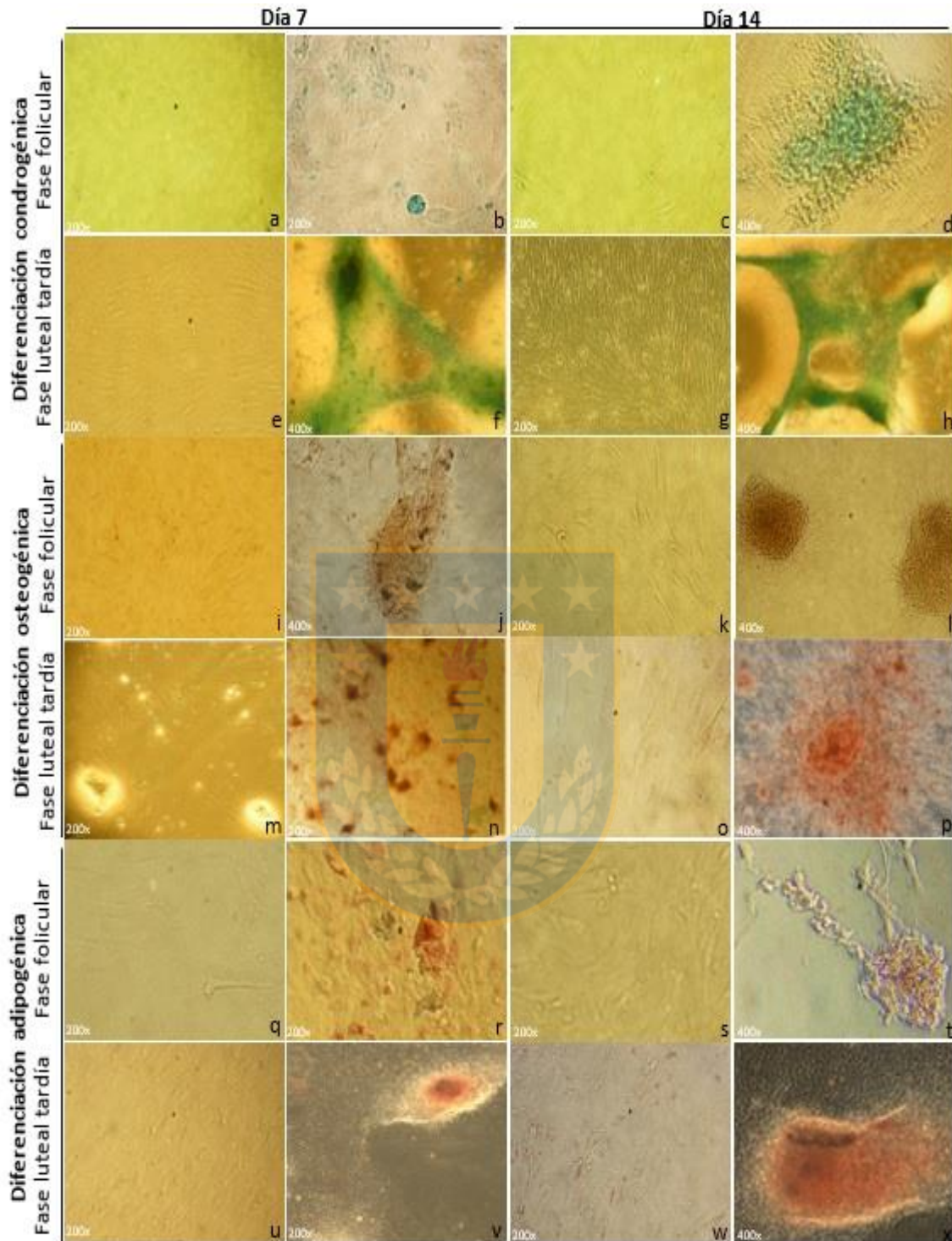


Figura 7. Imágenes representativas de la diferenciación *in vitro* condrogénica (b,d,f,h), osteogénica (j,l,n,p) y adipogénica (r,t,v,x) a los 7 y 14 días, de células endometriales bovinas de fase folicular y luteal tardía durante el ciclo estral. Controles de células no inducidas (a,c,e,g,i,k,m,o,q,s,u,w). Fuente: Elaboración propia.

Además, mediante western blot se estableció la presencia de bandas de Aggrecan y Sparc en las muestras de fase folicular y luteal tardía, así como en sus respectivos controles positivos. En el caso de células de fase folicular, Aggrecan mostró una doble banda para los días 7 y 14 de diferenciación celular. Sin embargo, en células de la fase luteal tardía y en los controles positivos para la proteína en cuestión se observó una única banda. Por su parte Ppar γ fue identificado sólo el día 7 de diferenciación en células de fase folicular, no así en fase luteal tardía y en los controles positivos para ambas líneas de células de cultivo primario. Cuando el símbolo del marcador se encuentra en mayúsculas se refiere a la detección de transcritos por qPCR, el mismo símbolo en letra minúscula se refiere a la proteína detectada por Western blot. Esta nomenclatura es consecuente a lo largo de todo el documento (Figura 8).

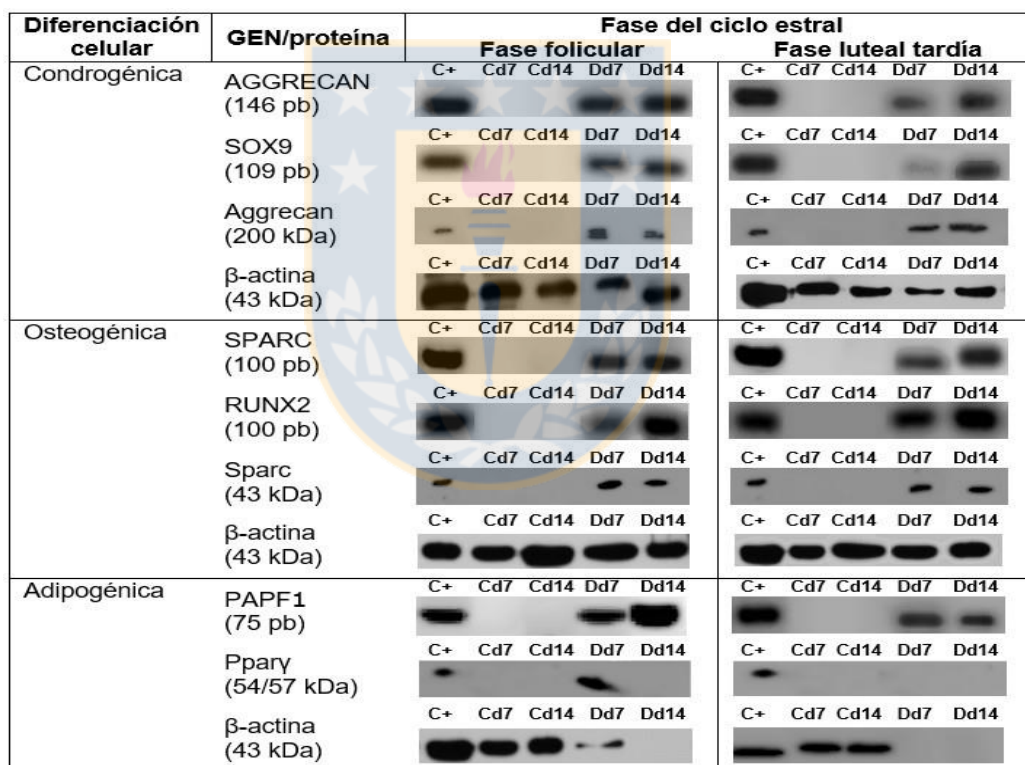


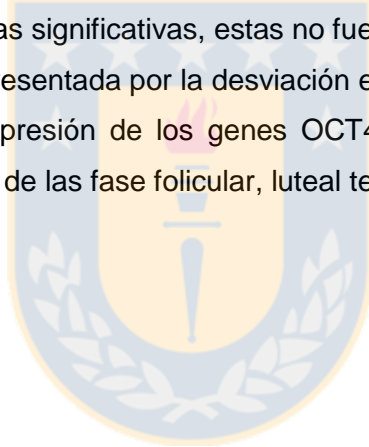
Figura 8. Imágenes representativas de la presencia o ausencia de banda de genes y proteínas para diferenciación condrogénica, osteogénica y adipogénica en células endometriales bovinas de fase folicular y luteal tardía del ciclo estral, inducidas *in vitro* durante 7 y 14 días. C+: Control positivo del gen o proteína; Cd7: Células control día 7; Cd14: Células control día 14; Dd7: Células diferenciadas al día 7; Dd14: Células diferenciadas al día 14. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 1.2. Evaluación de marcadores moleculares de MSCs

A continuación, se presenta la expresión de marcadores moleculares de pluripotencia (OCT4, SOX2 Y NANOG) y multipotencia (CD44 Y CD117) a nivel de genes y proteínas, tanto en tejido, como en células derivadas de cultivo primario de endometrio bovino en las fases folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral.

Expresión de marcadores moleculares a nivel de ARN

Los niveles de ARN de cada gen fueron evaluados mediante PCR en tiempo real, con método de curva estándar y normalizados con el gen constitutivo β -ACTINA. Cada resultado representado como promedio \pm desviación estándar, contempla el total de muestras obtenidas en cada fase (n=4) en triplicado. Si bien se realizó estadísticas de los resultados arrojando algunas diferencias significativas, estas no fueron consideradas debido a la gran dispersión de los datos representada por la desviación estándar (Figura 9). De este modo, se determinó que hubo expresión de los genes OCT4, SOX2, CD44 y CD117, no así NANOG, en células y tejido de las fase folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral.



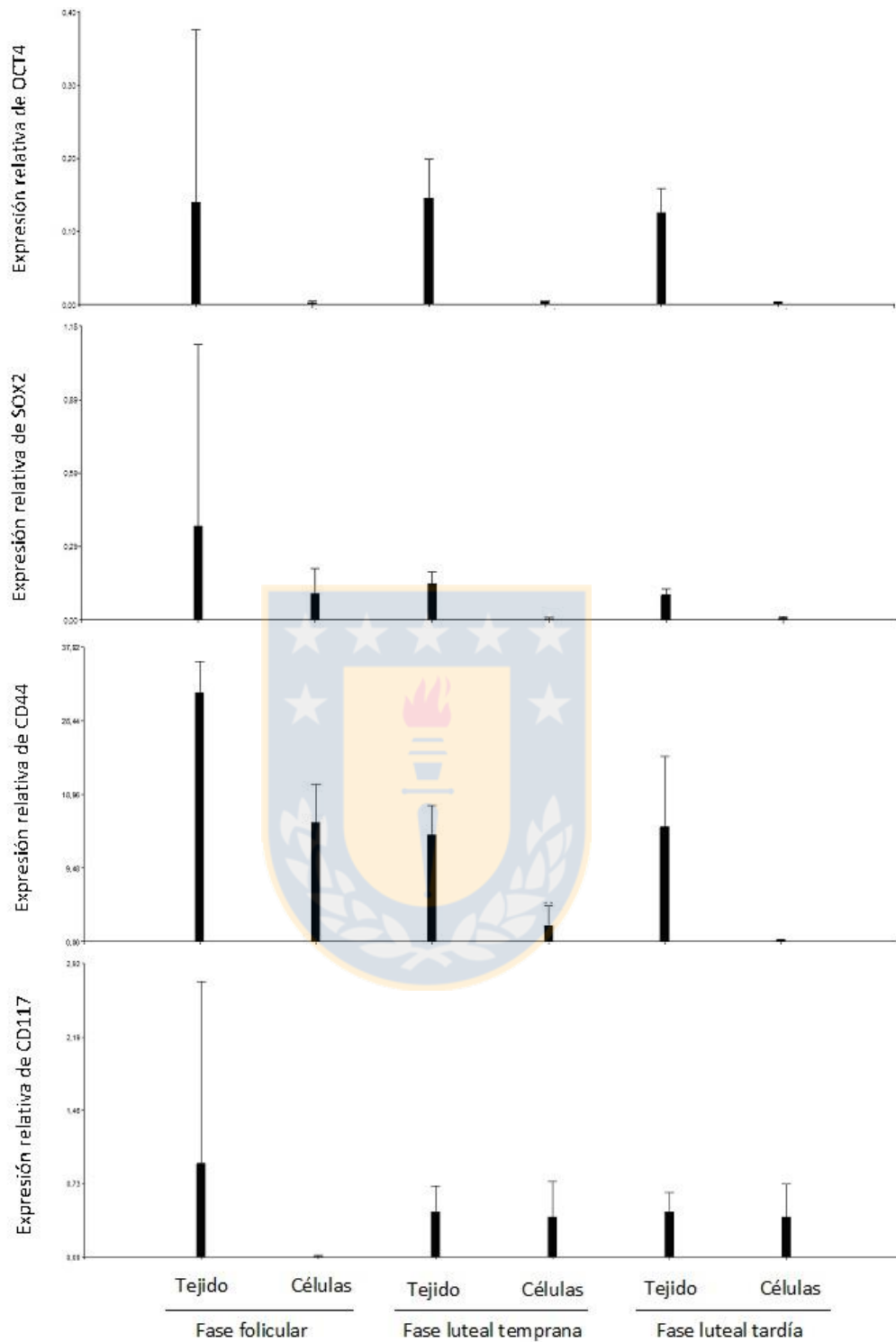


Figura 9. Análisis de la expresión de marcadores OCT4, SOX2, CD44 y CD117 a través de PCR a tiempo real, en tejido y células derivadas de cultivos primarios de endometrio bovino durante la fase folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral. Resultados se muestran como promedio \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

Expresión de marcadores moleculares a nivel de proteínas

La expresión de proteínas de cada marcador en células y tejido fue evaluada mediante western blot, y además por inmunohistoquímica en tejido. Los ensayos de western blot fueron normalizados con la proteína constitutiva β -actina y los de inmunohistoquímica mediante anticuerpos de citoqueratina y vimentina. En ambas técnicas se utilizaron los mismos anticuerpos primarios para detectar la presencia de las proteínas de interés.

Las proteínas Sox2 y Oct4 fueron observadas en tejido endometrial a través del ciclo estral, durante la fase luteal temprana y tardía, encontrándose con una localización nuclear en células estromales y glandulares. En el caso de la fase folicular, estas proteínas se localizaron además del núcleo, en el área perinuclear y de transmembrana de las células estromales y glandulares. La proteína Cd44 tuvo una localización difusa en el epitelio glandular y una marcada expresión en el tejido estromal, durante las fases luteal temprana y tardía. Para el caso de la fase folicular, no se detectó la presencia de Cd44 mediante inmunohistoquímica (Figura 10). A pesar de ello, los ensayos de western blot arrojaron positividad a todas las proteínas evaluadas (Sox2, Oct4 y Cd44) en tejido durante las tres fases del ciclo estral. Por su parte, la expresión de proteínas en las células derivadas de los tejidos anteriormente estudiados, demostró presencia de Sox2 en todas las fases evaluadas, pero no así Oct4, y en el caso de Cd44 fue detectado solamente en las fases luteal temprana y tardía (Figura 11).

La evaluación de las proteínas tanto en tejido como en células, tuvieron el mismo patrón de peso molecular esperado para cada una de ellas. Oct4 y Sox2: 34 kDa y Cd44:38-40 kDa. Una de las líneas celulares y su respectivo tejido perteneciente a fase luteal temprana, fueron descartados para el ensayo de western blot, debido a pérdida de integridad de las muestras, por error técnico.

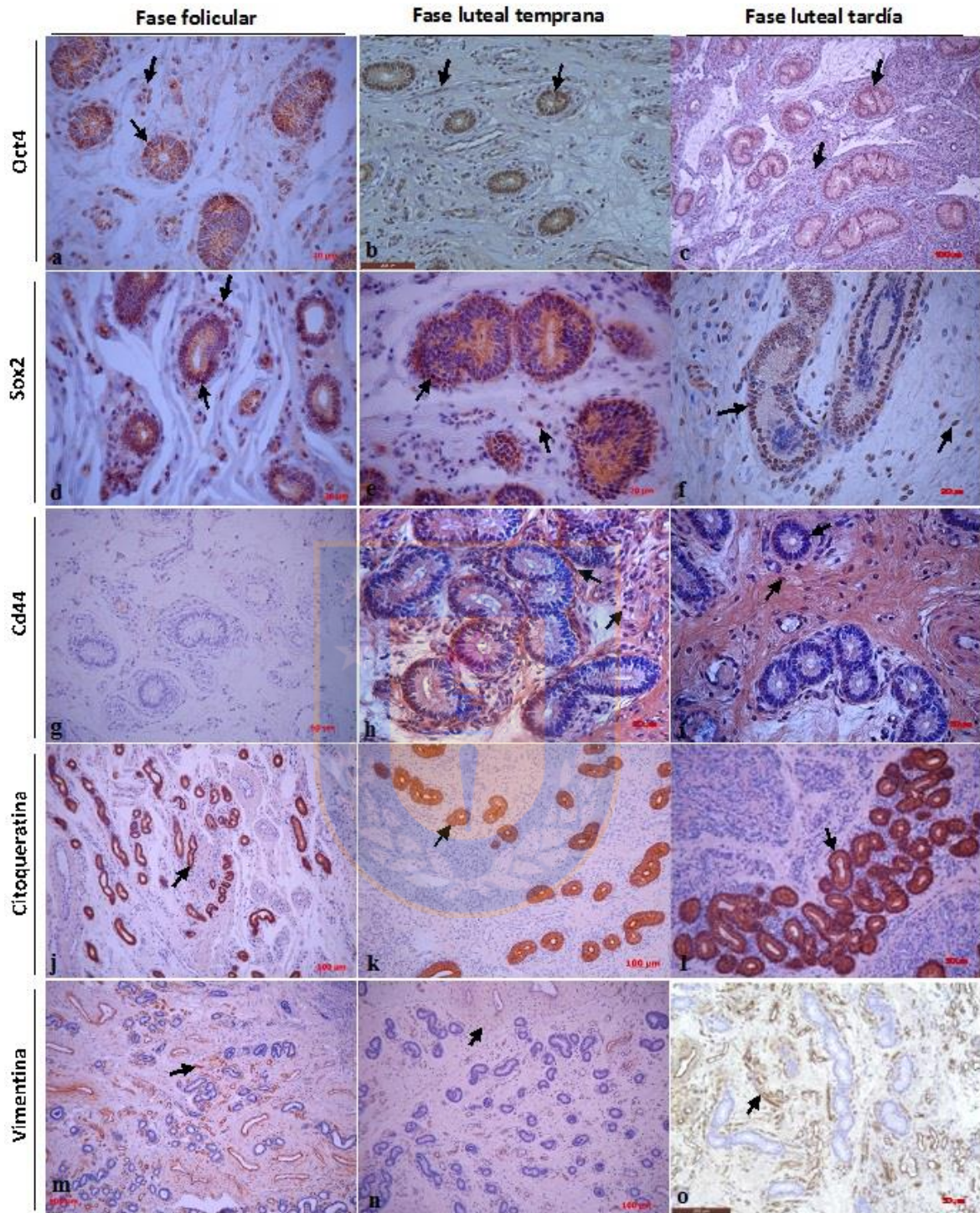


Figura 10. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de biopsias de tejido endometrial en fase folicular y luteal temprana y tardía para la detección de Oct4 (a,b,c), Sox2 (d,e,f), y Cd44 (g,h,i). Normalización de reacciones con citoqueratina (j,k,l) y vimentina (m,n,o). Flechas indican ubicación de cada proteína evaluada. Fuente: Elaboración propia.

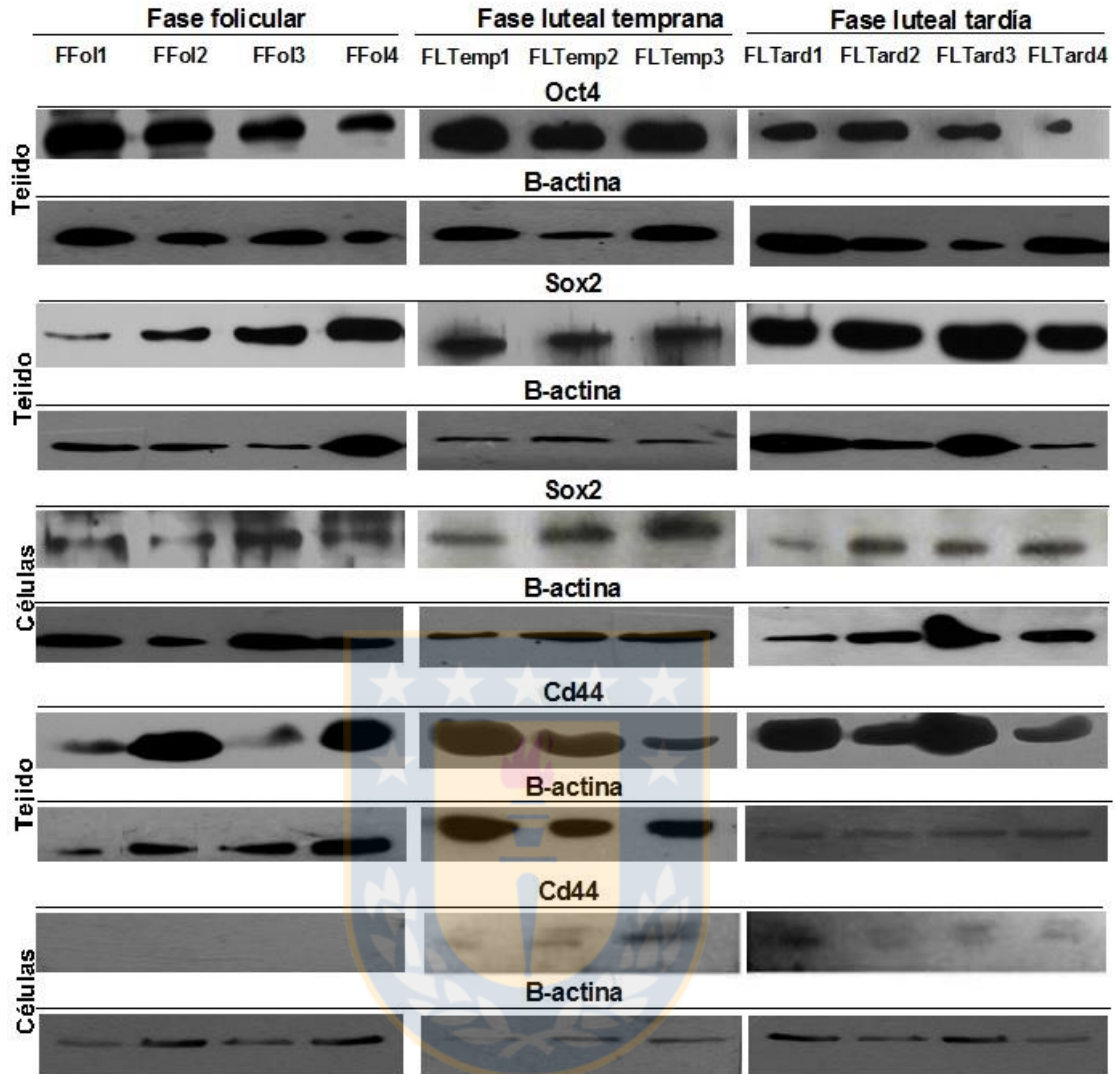


Figura 11. Expresión de proteínas Oct4, Sox2 y Cd44 mediante western blot en tejido endometrial (Tej) y células derivadas de cultivo primario (Cel) durante las fases del ciclo estral bovino. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2: Identificación y caracterización de MSCs y sus marcadores moleculares en endometrio durante el postparto de vacas sanas y con endometritis.

Muestras seleccionadas

Para este experimento se seleccionaron 5 biopsias de endometrio de vacas sanas y con endometritis subclínica, y 3 para endometritis clínica durante el postparto bovino (Tabla 6).

En las vacas sanas no se observó presencia de loquias y la citología endometrial arrojó un recuento de PMN menor al 10% y ausencia de agentes patógenos en cultivo microbiológico. En el caso de las hembras con endometritis subclínica, al exámen clínico hubo presencia de inflamación uterina con y sin secreción uterina o descarga vaginal, que en laboratorio presentaron un recuento de PMN mayor al 18% en los días 21-33 posterior al parto o mayor al 10% en los días 34-47, con existencia o no de patógenos en el cultivo microbiológico. Finalmente para endometritis clínica, la inflamación uterina al exámen clínico fue evidente con presentación de secreción vaginal purulenta y en donde el recuento de PMN fue mayor a 48% y patógenos estuvieron presentes en todas las muestras.

Muestra	Diagnóstico examen clínico	Días post-parto	Microorganismo en cultivo	% de células PMN	Diagnóstico citológico
PPESano1	Subclínica	61	-	3,3	Sano
PPESano2	Sana	51	-	3,6	Sano
PPESano3	Sana	66	-	8,5	Sano
PPESano4	Sana	25	-	1,2	Sano
PPESano5	Sana	35	-	3,2	Sano
PPESubcl1	Subclínica	39	-	11,5	Subclínica
PPESubcl2	Subclínica	21	-	35,2	Subclínica
PPESubcl3	Subclínica	21	+ (<i>Str. Bovis</i>)	41,2	Subclínica
PPESubcl4	Subclínica	24	-	35,3	Subclínica
PPESubcl5	Subclínica	22	+ (<i>Str. Pyogenes</i>)	30	Subclínica
PPEClin1	Clínica	51	+ (<i>Bac. Difteroides</i>)	59,3	Clínica
PPEClin2	Clínica	30	+ (<i>E. Coli</i>)	87,5	Clínica
PPEClin3	Clínica	26	+ (<i>E. Coli</i>)	48,8	Clínica

Tabla 6. Muestras seleccionadas durante el postparto bovino en endometrio sano (PPESano) y con endometritis subclínica (PPESubcl) y clínica (PPEClin). PMN: Polimorfonucleares. Fuente: Elaboración propia.

Además, se realizó corte histológico y tinción de hematoxilina y eosina de las muestras de endometrio destinadas para el análisis de inmunohistoquímica, de modo de evaluar directamente y en detalle la integridad de los tejidos. En el endometrio sano postparto, se observó que el tejido poseía una adecuada organización del epitelio y estroma, con estructuras glándulares definidas. En el caso de endometritis subclínica, el tejido mostró una desorganización incipiente de su estructura a nivel de epitelio, estroma y glándulas. Estos hallazgos fueron más evidentes en el caso de endometritis clínica, en donde también se presentó infiltración celular (Figura 12).

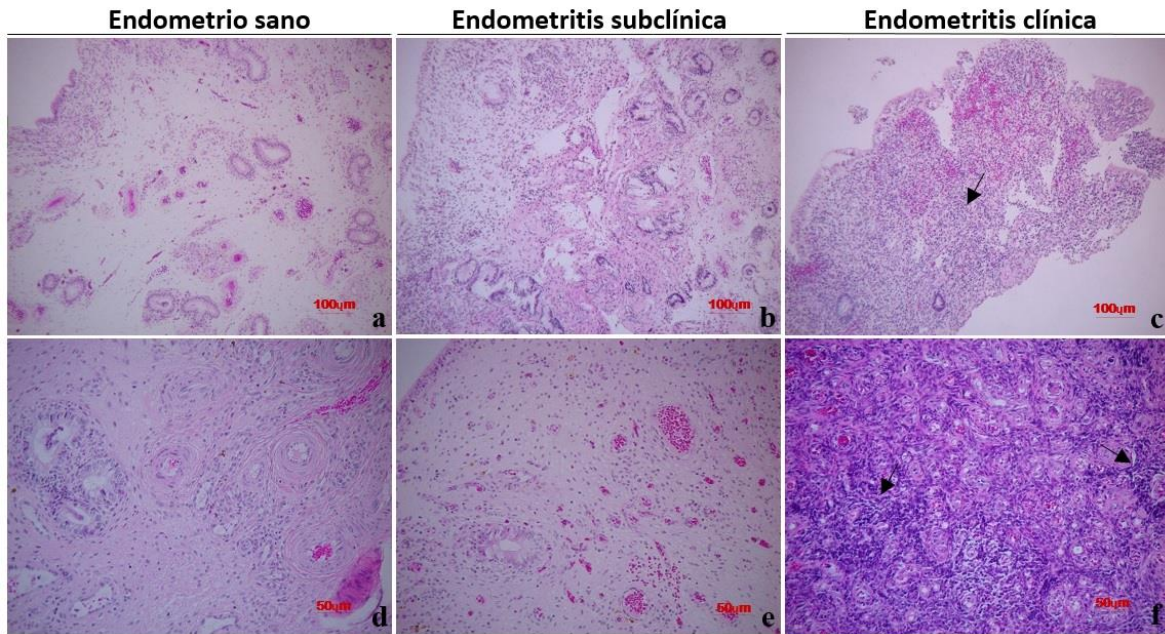


Figura 12. Corte histológico y tinción hematoxilina y eosina de biopsias de endometrio postparto en vacas sanas (a y d), con endometritis subclínica (b y e) y clínica (c y f) a 100x y 200x, respectivamente. Flechas indican infiltración de polimorfonucleares. Fuente: Elaboración propia.

Experimento 2.1 Evaluación de propiedades funcionales de MSCs

Al igual que en el Experimento 1, de las muestras seleccionadas de endometrio bovino postparto se derivaron cultivos primarios de células en pase 3, en donde fueron evaluadas propiedades funcionales típicas de MSCs, mediante ensayos *in vitro* de clonogenicidad, proliferación y diferenciación.

Cultivo primario de células in vitro

Las células de cultivo primario *in vitro* derivadas de endometrio sano, endometritis subclínica y clínica, se mantuvieron en condiciones estándar de medio de cultivo siendo capaces de adherirse a plástico y mostrar un aspecto fibroblastoide (Figura 13).

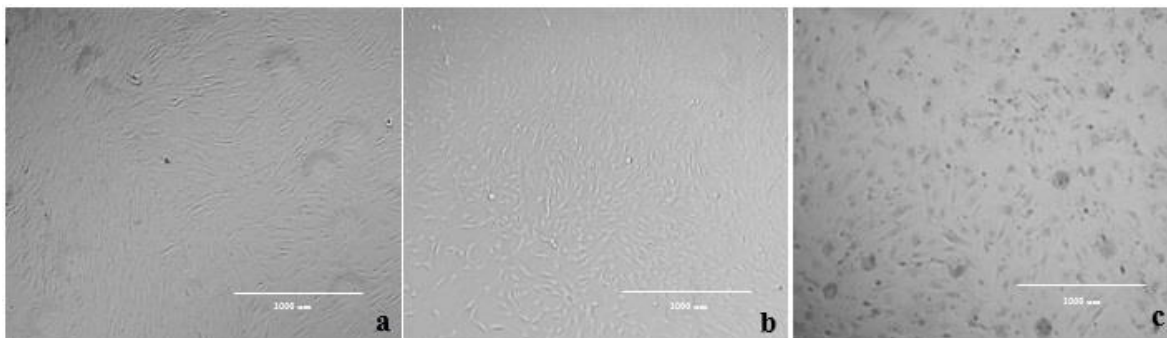


Figura 13. Imágenes representativas de la morfología *in vitro* de células de cultivo primario derivadas de biopsia endometrial en el postparto en vacas sanas (a), con endometritis subclínica (b) y clínica (c), con aumento de 40x. Fuente: Elaboración propia.

Clonogenicidad y proliferación celular

Al sembrar las células en baja densidad (30 células/cm²) se observó que todas las líneas de cultivo primario *in vitro* fueron capaces de proliferar y formar colonias a partir de una única célula, variando en tamaño y número de células, presentándose mayoritariamente en el caso de las muestras de endometritis, colonias pequeñas con menos de 50 células (Figura 14). En general las células procedentes de animales con endometritis, particularmente de endometritis clínica, tendían a separarse de las placas de cultivo, siendo células más difíciles de cultivar *in vitro*.

Dentro de los 5-7 días de iniciado el cultivo las células de endometrio sano alcanzaron la confluencia total, mientras las de endometritis subclínica lo lograron entre los 8-10 días y las de endometritis clínica a los 10-12 días.

El recuento total de colonias fue significativamente mayor en células de endometrio de vacas sanas que en la de endometritis clínica, con un promedio total de $5,4 \pm 0,7$ colonias observadas por pocillo sembrado y un $0,6 \pm 0,1\%$ de estas células mostraron habilidad para dividirse y formar colonias, en contraste con un $0,1 \pm 0,1\%$ en endometritis clínica. El tiempo en cultivo que se demoraron las células en duplicar la cantidad inicial de siembra fue significativamente menor en endometrio sano postparto que en endometritis clínica, con un valor de $30 \pm 0,4$ versus $42 \pm 1,4$ horas. Si bien, no hubo diferencias significativas en los parámetros evaluados entre endometrio sano y con endometritis subclínica, los valores obtenidos siempre fueron más bajos para esta última estado patológico del endometrio (Tabla 7).

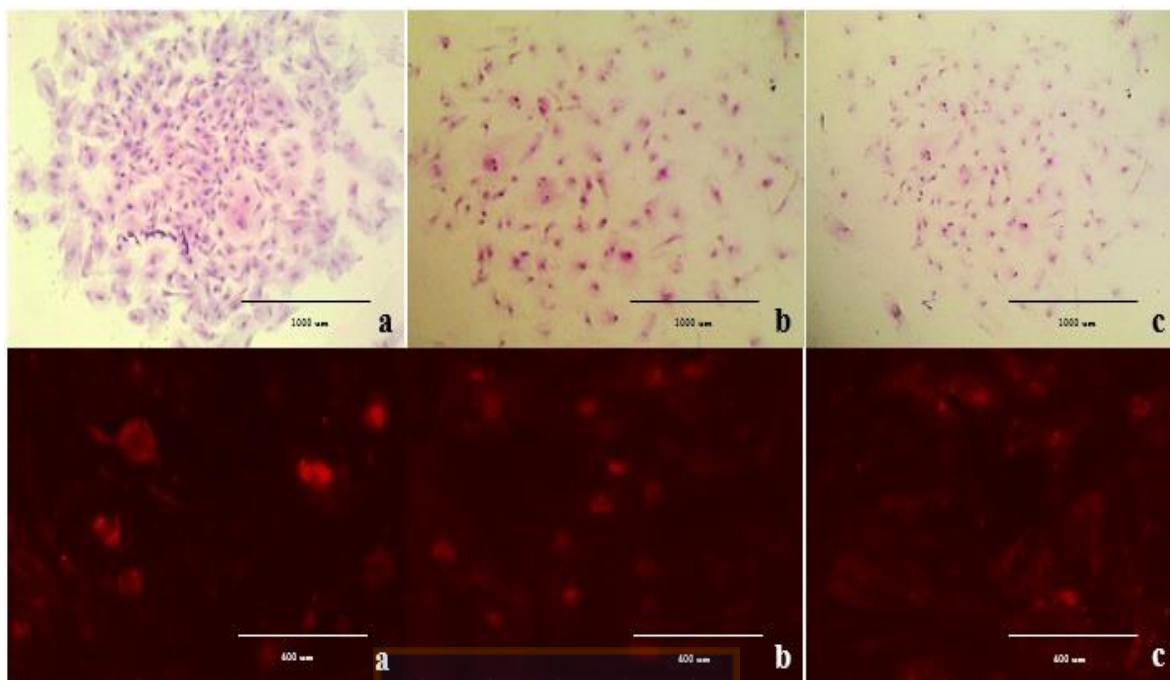


Figura 14. Imágenes representativas de la formación de colonias *in vitro* de cultivos primarios de endometrio bovino sano (a), endometritis subclínica (b) y clínica (c) en el postparto bovino. Panel superior: Tinción giemsa de núcleos celulares con aumento 40x; panel inferior: Actividad fosfatasa alcalina positiva con aumento 100x. Fuente: Elaboración propia.

Tabla 7. Eficiencia clonogénica (EC) y tiempo de doblaje celular (TDC) de células de cultivo primario *in vitro* de endometrio de postparto de vacas sanas, con endometritis subclínica y clínica. Los ensayos fueron realizados en triplicado para cada línea celular según el estado patológico del endometrio.

Línea celular	N° Colonias(\bar{x})	EC (%)	TDC (hrs)
PPESano ($\bar{x} \pm D.E.$)	5,4±0,7 ^a	0,6±0,1 ^a	30±0,4 ^a
PPESubcl ($\bar{x} \pm D.E.$)	4,1±0,3 ^{ab}	0,5±0,1 ^{ab}	34,7±0,7 ^{ab}
PPEClin ($\bar{x} \pm D.E.$)	0,8±0,8 ^b	0,1±0,1 ^b	42±1,4 ^b

PPESano: Postparto endometrio sano, PPESubcl: Postparto endometritis subclínica, PPEClin: Postparto endometritis clínica. ^(a,b)Letras distintas en cada columna indican diferencias significativas con $p < 0,05$. Fuente: Elaboración propia.

Diferenciación celular a linajes mesodérmicos

Las células de cada estado patológico del endometrio bovino postparto fueron cultivadas y diferenciadas a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico (Figura 15).

Diferenciación condrogénica y osteogénica:

Las líneas de células de cultivo primario de endometrio postparto bovino sano, con endometritis subclínica y clínica, mostraron un notorio marcaje y/o formación de estructuras específicas a partir de los 7 días de inducción de diferenciación condrogénica y osteogénica, mediante tinción de azul de alcian y rojo de alizarina, respectivamente. Subjetivamente se observó que la intensidad de marcaje fue similar a los 7 y 14 días de diferenciación celular.

Diferenciación adipogénica:

Se pudo observar que sólo las células de endometrio sano y con endometritis subclínica mostraron una tinción positiva muy leve para esta diferenciación, con gran desprendimiento de células durante los primeros días de haberse realizado el cambio a medio de inducción. Los controles para cada célula y día de diferenciación no mostraron marcaje alguno. Las células de endometritis clínica no fueron capaces de mostrar tinción para dicho linaje y el desprendimiento de células fue mucho mayor que en las otras líneas de cultivo primario, por lo que en el momento de la tinción y evaluación las células presentes en la placa eran casi inexistentes. Los respectivos controles también mostraron desprendimiento de células, pero en menor grado. Pese a ello fueron capaces de mantenerse hasta el final del cultivo, sin mostrar tinción adipogénica.

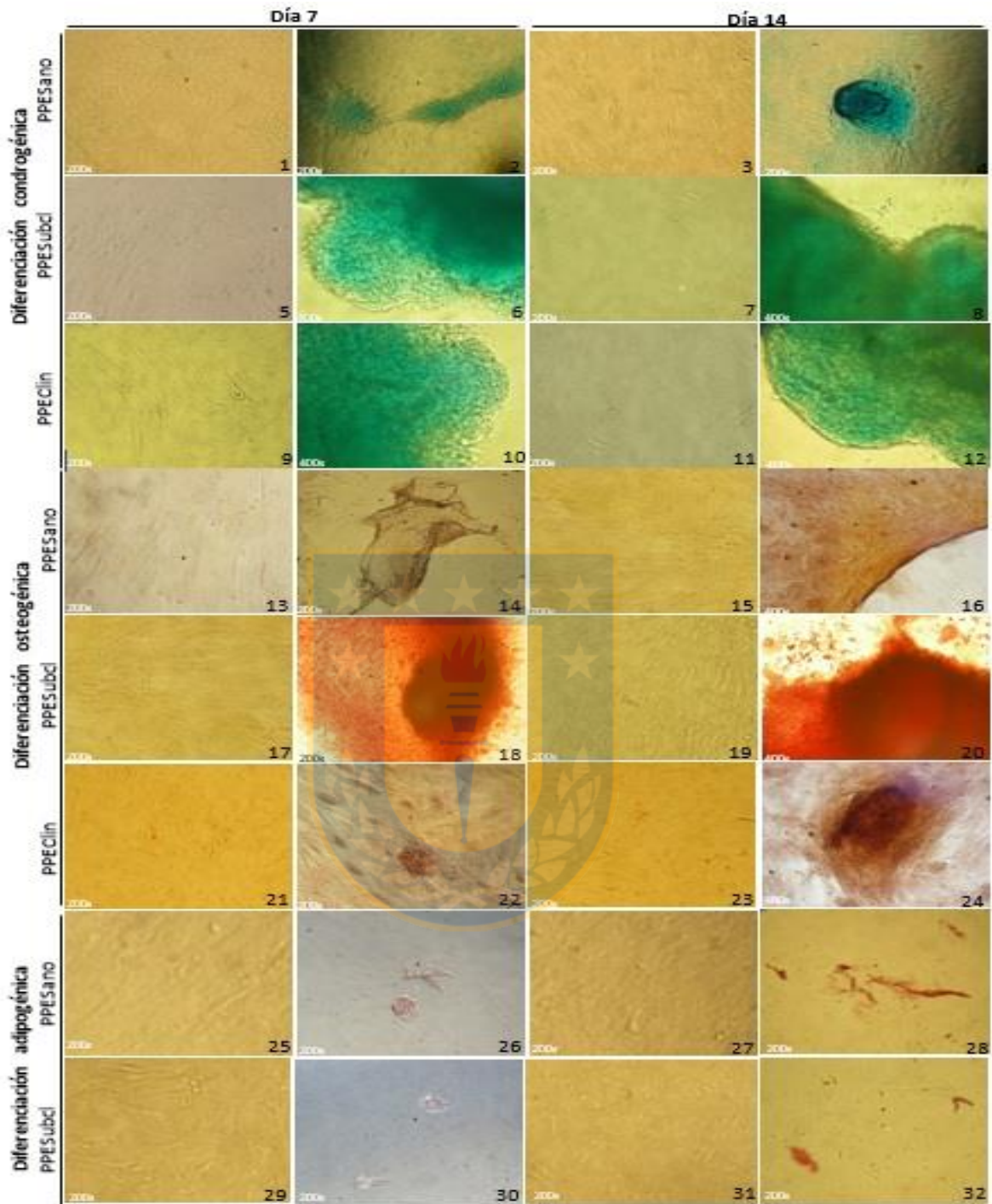


Figura 15. Imágenes representativas de la diferenciación *in vitro* de células de endometrio sano (PPESano) y con endometritis subclínica (PPESubcl) y clínica (PPEClin) durante el postparto bovino a los 7 y 14 días. Diferenciación condrogénica (2,4,6,8,10,12), osteogénica (14,16,18,20,22,24) y adipogénica (26,28,30,32) en células inducidas; y controles de células no inducidas (1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27,29,31). Fuente: Elaboración propia.

Para confirmar la diferenciación observada en las líneas de cultivo primario de endometrio, se evaluó la presencia de genes y proteínas específicas para cada linaje al que las células fueron inducidas. Se observó la expresión de los genes AGGRECAN y SOX9 en las muestras de células diferenciadas a linaje condrogénico a los 7 y 14 días, y SPARC y RUNX2 en inducción a linaje osteogénico en células de endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica. El gen PPAF1 fue expresado a los 7 y 14 días en células de endometrio sano y endometritis subclínica, no así en endometritis clínica, donde el gen no fue observado en ningún día. Los controles celulares para cada diferenciación fueron negativos al gen y el control positivo permitió identificar y ratificar la presencia del gen de interés para cada linaje (Figura 16).

Diferenciación celular	GEN/proteína	Células de endometrio bovino		
		PPESano	PPESubcl	PPEClin
Condrogénica	AGGRECAN (146 pb)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	SOX9 (109 pb)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	Aggrecan (200 kDa)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	β-actina (43 kDa)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
Osteogénica	SPARC (100 pb)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	RUNX2 (100 pb)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	Sparc (43 kDa)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	β-actina (43 kDa)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
Adipogénica	PAPF1 (75 pb)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	Pparγ (54/57 kDa)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14
	β-actina (43 kDa)	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14	C+ Cd7 Cd14 Dd7 Dd14

Figura 16. Imágenes representativas de la presencia o ausencia de banda de genes y proteínas para diferenciación condrogénica, osteogénica y adipogénica en células de endometrio postparto bovino en vacas sanas, con endometritis suclínica y clínica, inducidas in vitro durante 7 y 14 días. PPESano: Postparto endometrio sano, PPESubcl: Postparto endometritis subclínica, PPEClin: Postparto endometritis clínica, C+: Control positivo del gen o proteína; Cd7: Células control día 7; Cd14: Células control día 14; Dd7: Células diferenciadas al día 7; Dd14: Células diferenciadas al día 14. Fuente: Elaboración propia.

Por su parte, la expresión de proteínas mediante western blot arrojó la presencia de bandas a los 7 y 14 días de diferenciación condrogénica para Aggreccan e inducción osteogénica para Sparc, en endometrio sano y con endometritis subclínica. En células de endometritis clínica, no se observó expresión de proteínas como Aggreccan, Sparc y Ppar γ y al utilizar el anticuerpo de β -actina tampoco se observó presencia de la proteína en todas las células pertenecientes a este estado patológico del endometrio postparto. Ppar γ no estuvo presente en las muestras de células diferenciadas a linaje adipogénico, sólo en el control positivo.

Experimento 2.2. Evaluación de marcadores moleculares de MSCs

Se evaluó la expresión de marcadores moleculares OCT4, SOX2, NANOG, CD44 y CD117, en genes y proteínas en tejido y células derivadas de cultivo primario de endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica en el postparto bovino.

Expresión de marcadores moleculares a nivel de ARN

Los niveles de ARN fueron evaluados por PCR a tiempo real con método de curva estándar y fueron normalizados mediante el gen constitutivo β -ACTINA. Cada resultado representado como promedio \pm desviación estándar, contempla el total de muestras obtenidas en cada condición patológica del endometrio postparto en triplicado (Figura 17). Si bien se realizó estadísticas de los resultados arrojando algunas diferencias significativas, estas no fueron consideradas debido a la gran dispersión de los datos representada por la desviación estándar. Por lo tanto, se determinó la expresión de los genes OCT4, SOX2, CD44 y CD117, no así NANOG, en células y tejido de endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica durante el postparto bovino.

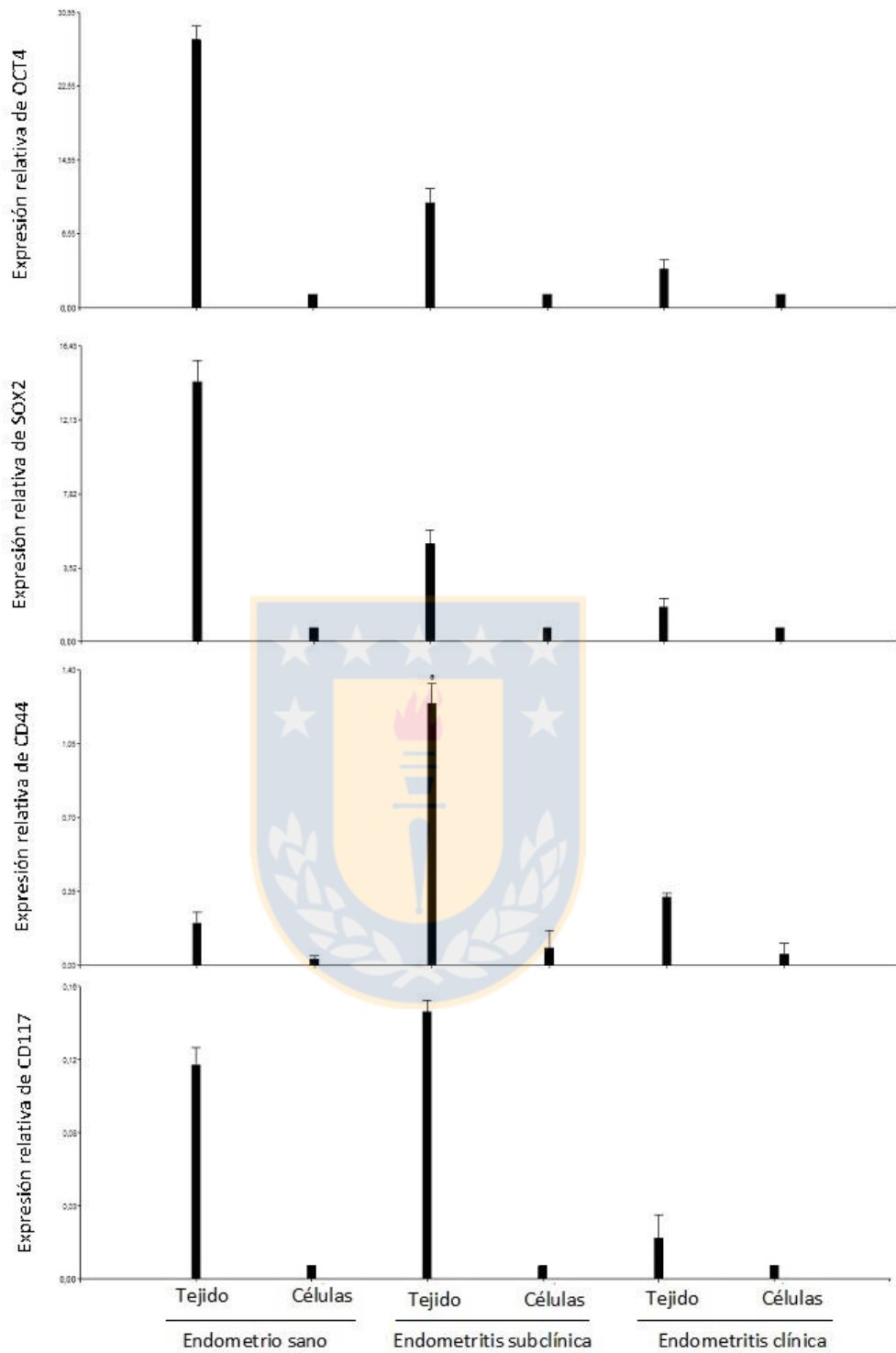


Figura 17. Expresión relativa (promedio \pm desviación estándar) de genes OCT4, SOX2, CD44 y CD117 a través de PCR a tiempo real, en tejido y células derivadas de cultivos primarios durante el postparto bovino en endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica. Fuente: Elaboración propia.

En el caso de la expresión de proteínas, fueron evaluadas Sox2, Oct4 y Cd44 en tejido por inmunohistoquímica, y además en células derivadas de cultivo primario mediante western blot. Las proteínas Oct4 y Sox2 se presentaron en tejido en endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica, con una localización nuclear en células estromales y algunas glandulares. No se detectó la presencia de Cd44 en endometrio durante el postparto bovino y todas las tinciones de inmunohistoquímica fueron normalizadas con los anticuerpos citoqueratina y vimentina (Figura 18).

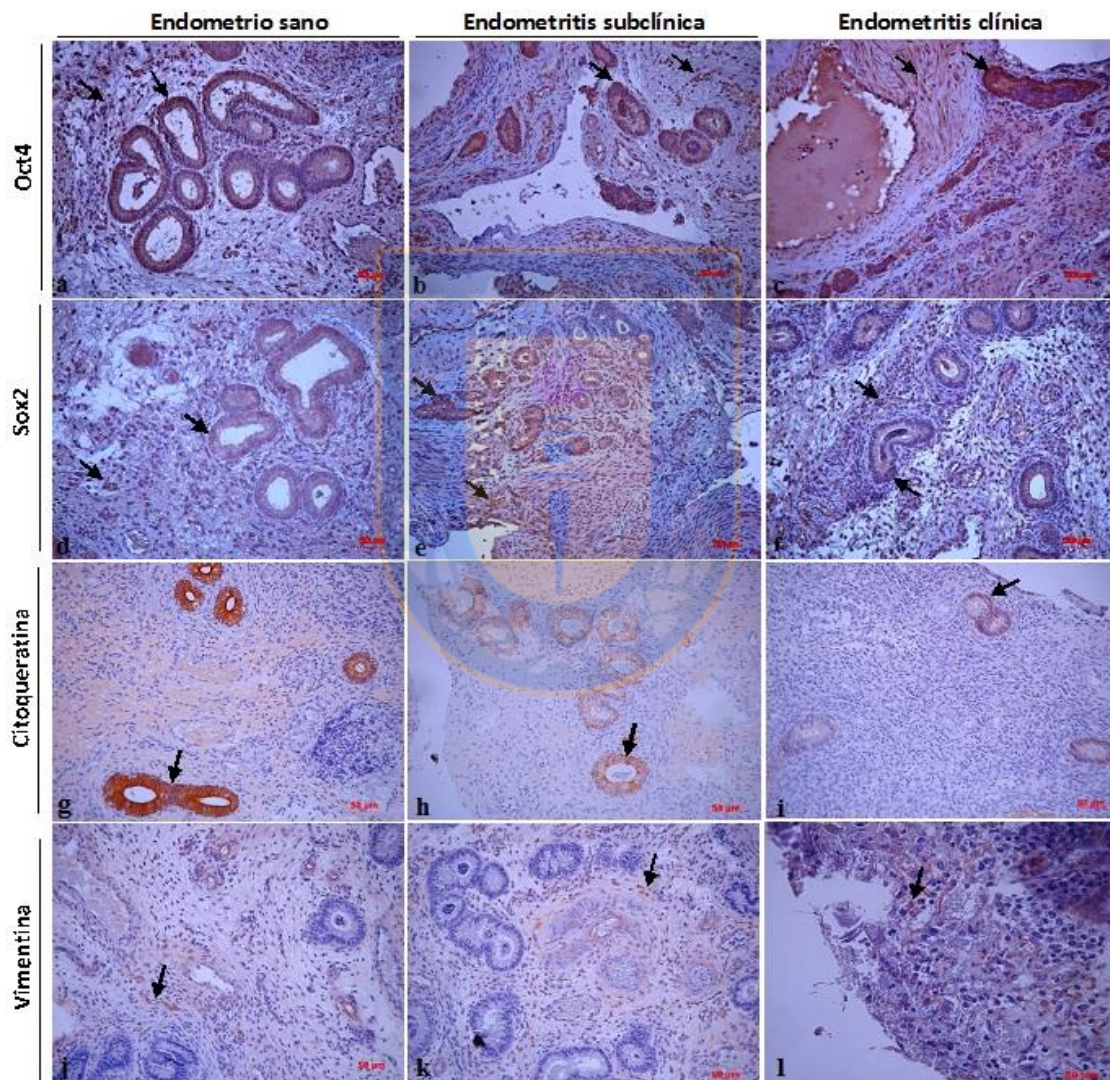


Figura 18. Imágenes representativas de inmunohistoquímica de biopsias de endometrio sano, endometritis subclínica y clínica para la detección de Oct4 (a-c) y Sox2 (d-f) a 20x. Normalización de reacciones con citoqueratina (g-i) y vimentina (j-l) a 20x.). Flechas indican ubicación de cada proteína evaluada. Fuente: Elaboración propia.

En western blot se observó la presencia de proteínas Oct4 y Sox2 en la mayoría de las líneas celulares perteneciente a endometrio sano, con endometritis subclínica y clínica (Figura 19). Las bandas presentes en western blot para cada proteína evaluada fueron encontradas a un mismo peso molecular para todas las muestras y fue similar entre Oct4 y Sox2: 34 kDa. Cd44 no mostró expresión en ninguna de las muestras de endometrio postparto.

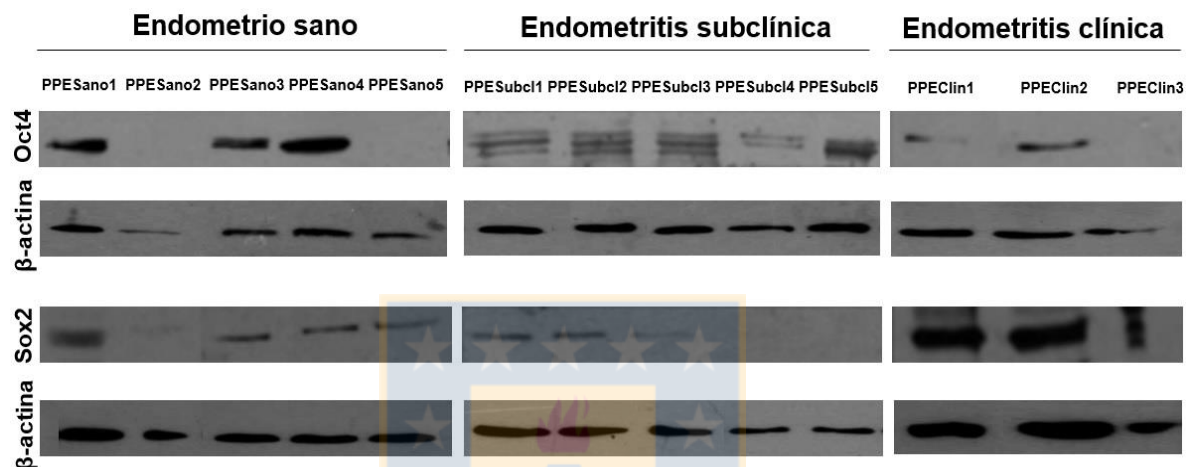


Figura 19. Expresión de las proteínas Oct4 y Sox2 mediante western blot en células derivadas de cultivo primario de endometrio postparto bovino. Fuente: Elaboración propia.

A continuación, se resumen los resultados encontrados en la evaluación de las propiedades funcionales e identificación de marcadores moleculares de MSCs en endometrio bovino a través de la fase folicular, luteal temprana y tardía del ciclo estral y durante el postparto en endometrio sano y con endometritis subclínica y clínica (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de resultados de ensayos funcionales e identificación de marcadores de células madre mesenquimales en endometrio bovino durante el ciclo estral y postparto.

Estado del endometrio bovino		Funcionalidad de MSCs					Marcadores moleculares de MSCs				
		Clonogenicidad	Proliferación	Diferenciación			Pluripotencia		Multipotencia		
				Condrogénica	Osteogénica	Adipogénica	OCT4/Oct4	SOX2/Sox2	NANOG	CD44/Cd44	CD117
Ciclo estral	FFol	+	+	+	+	+	+/-	+/+	-	+/-	+
	FLTemp	+	+	-	-	-	+/-	+/+	-	+/+	+
	FLTard	+	+	+	+	+	+/-	+/+	-	+/+	+
Postparto	PPESano	+	+	+	+	+	+/+	+/+	-	+/-	+
	PPESubcl	+	+	+	+	+	+/+	+/+	-	+/-	+
	PPEClin	+	+	+	+	-	+/+	+/+	-	+/-	+

FFol: Fase folicular, FLTemp: Fase luteal temprana, FLTard: Fase luteal tardía, PPESano: Postparto endometrio sano, PPESubcl: Postparto endometritis subclínica, PPEClin: Postparto endometritis clínica. Fuente: Elaboración propia.

4. DISCUSIÓN

Se ha postulado que células madre residentes en epitelio y estroma del endometrio son responsables de la regeneración celular cíclica del tejido (Chan y cols., 2004). A partir de ello se abrió una nueva ventana de investigación científica y actualmente se han publicado más de un centenar de artículos científicos enfocados en el uso de estas células en terapias regenerativas de diversas enfermedades. La mayoría de los estudios que han identificado y caracterizado MSCs desde endometrio han sido realizados en humanos y roedores, siendo en el área de medicina veterinaria poca la información registrada y ha incluido especies como caninos, porcinos, ovinos, caprinos y bovinos (Miernik y Karasinski, 2012; Mehrabani y cols., 2014; Letouzey y cols., 2015; de Moraes y cols., 2016, De Cesaris y cols., 2017, Tamadon y cols., 2017).

El presente estudio permitió identificar la presencia de MSCs en endometrio bovino, mediante la evaluación de sus propiedades funcionales y caracterización de sus marcadores moleculares en tejido endometrial y células de cultivo primario *in vitro*, durante el ciclo estral y en el postparto. Con anterioridad, sólo Donofrio y cols. en el año 2008, reportaron la presencia de células endometriales bovinas, con capacidad de diferenciarse a osteoblastos *in vitro*, pero no ensayaron su potencialidad de diferenciación a las tres líneas canónicamente usadas: osteoblasto, condrocitos y adipocitos. Es por ello que este estudio es novedoso ya que por primera vez se describió la presencia de células tipo mesenquimales en endometrio bovino. Además, se abarcaron etapas claves en la regeneración endometrial, como las fases del ciclo estral y el postparto de vacas con endometrio sano y endometritis subclínica y clínica (Cabezas y cols., 2014; Lara y cols., 2017). Actualmente existen tres trabajos adicionales que describen la presencia de células madre en el tejido endometrial bovino, y si bien se detalla la etapa cíclica a la que corresponden sus muestras, ninguno abarca una nueva fase del ciclo estral u otras etapas de la vida reproductiva de la hembra, de éstos en 2 se aíslan y caracterizan MSCs (Mehrabani y cols., 2015; de Moraes y cols., 2016), mientras que el tercero describe la presencia de células madre pluripotentes en endometrio (Łupicka y cols., 2015a).

Para la identificación de MSCs en endometrio bovino se evaluaron características funcionales propias de estas células, mediante ensayos *in vitro* como clonogenicidad, proliferación y diferenciación a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico, en células a partir del pase 3. En todos los cultivos primarios de células aisladas desde muestras de endometrio de ambos experimentos, se observó una población celular homogénea con

capacidad de adherirse al plástico, mostrar un aspecto fibroblastoide, alta proliferación, formar colonias y diferenciarse a linajes mesodérmicos. En nuestros experimentos no se purificaron las poblaciones de MSC por ningún método de separación (cell sorting, magnética u otro), por lo que no se puede descartar la existencia de alguna contaminación celular con fibroblastos. No obstante, de existir, la misma no influyó en la potencia de diferenciación a tri-linaje de las células mesenquimales aisladas, ni en la capacidad de formar colonias positivas a fosfatasa alcalina. No hay dudas de que bajo ciertas circunstancias los fibroblastos pueden formar colonias pequeñas, las cuales son negativas a la actividad fosfatasa alcalina (Halfon y cols., 2011; Martins y cols., 2014).

Uno de los ensayos de funcionalidad para la identificación inicial de células madre en tejido adulto, es la clonogenicidad que ha sido ampliamente utilizado para identificar y caracterizar células madre en tejido y se basa en sus características como formación de clones de sí misma y/o autorenovación, las cuales son propias y se mantienen en las células hijas (Cervelló y cols., 2013). En el presente estudio las células de ambos experimentos fueron sembradas a baja densidad (30 células/cm²) y todas formaron colonias, las cuales fueron definidas como un grupo de más de 20 células visibles macroscópicamente mediante tinción nuclear. En todas las muestras las colonias variaron en tamaño y número de células, observándose mayoritariamente colonias grandes con más de 50 células; a excepción de endometritis subclínica y clínica, en donde las colonias fueron pequeñas y las células se mostraron más separadas entre sí, como en el caso de endometrio sano. Esto ha sido relacionado al tipo de célula madre presente en el cultivo y se ha definido que probablemente colonias grandes son iniciadas por células madre o progenitora putativas que poseen un alto potencial proliferativo y a su vez colonias pequeñas son generadas por células más diferenciadas como las de amplificación transitoria, que tienen una limitada capacidad proliferativa y de autorenovación (Chan y cols., 2004).

A partir del recuento de colonias, se determinó la eficiencia clonogénica, siendo esta similar en las células de endometrio entre las fases del ciclo estral (0,5-0,6%). Se ha descrito en varios estudios que la actividad clonogénica de células de endometrio humano y porcino no varía entre las fases del ciclo reproductivo, sugiriendo que es independiente de las hormonas ováricas presentes (Schwab y cols., 2005; Miernik y Karasinski, 2012). En el caso del postparto bovino el rango de células que fueron capaces de formar colonia varió entre 0,1-0,6%; siendo significativamente menor en endometritis clínica respecto a endometrio sano. En ambos experimentos los valores de eficiencia clonogénica fueron inferiores a los reportados para células madre y progenitoras estromales de endometrio humano, las cuales

han mostrado una eficiencia clonogénica de entre 1,23-2,1%, pero en este estudio se comenzó con una densidad mucho mayor de siembra de 300-500 células/cm², lo que pudo haber influido en la mayor cantidad de colonias presentes considerando que son originadas a partir de una sola célula (Chan y cols., 2004; Dimitrov y cols., 2008). Pero debido a que las poblaciones de células clonogénicas son muy raras de encontrar, se ha reportado en células estromales de endometrio humano, valores bajos de eficiencia clonogénica de 0,02% para colonias grandes (Schwab y cols., 2005; Gargett, 2006). Incluso, en MSCs de endometrio porcino se ha registrado una eficiencia clonogénica de hasta un 0.035% (Miernik y Karasinski, 2012). A pesar que exista una baja eficiencia clonogénica de células de endometritis clínica, se demostró que todas las células en ambos experimentos fueron capaces de formar colonias, lo que soporta la idea de un posible nicho de MSCs presente en el endometrio (Chan y cols., 2004).

Adicionalmente, para evaluar la funcionalidad de las colonias presentes en el cultivo *in vitro*, se realizó tinción para la enzima FA, en donde todas las células de ambos experimentos mostraron actividad positiva. La presencia de colonias pequeñas con menos de 50 células en endometritis subclínica y clínica, puede ser debido a que contienen células que no son viables y por lo tanto, no presentan actividad enzimática (Franken y cols., 2006). La evaluación de la actividad de FA ha sido frecuentemente utilizada para verificar las características de células madre pluripotentes en embriones y en la identificación de células germinales primordiales (de Souza y cols., 2016). Varias MSCs han mostrado una alta expresión de FA, junto con el marcador MSCA-1 a nivel perivascular y que ha sido relacionado con la identificación de MSC de endometrio humano (Gargett y Masuda, 2010). Se cree que FA influye en el comportamiento celular, como la proliferación o migración, participando a través de la síntesis de GABA, el cual es producido por las células para la regulación de su proliferación y autorenovación, además del efecto mitogénico de la adenosina generada por FA a través de la hidrolización de nucleósidos trifosfatos y difosfatos (Štefková y cols., 2015).

La capacidad de proliferación de las células también fue evaluada mediante el TDC en donde fueron sembradas a una densidad de 2000 células/cm². En ambos experimentos los valores estuvieron entre el rango promedio de 30-42 horas, así como en el tiempo de demora en el cual las células de cultivos primarios llegaron a ser completamente confluentes entre 5-12 días. El TDC fue significativamente mayor en la fase luteal temprana en comparación con la fase folicular y luteal tardía. Asimismo, en el caso de células de endometritis clínica en comparación con endometrio sano. Se ha observado en MSCs

aisladas de decidua basal humana que forman colonias en cultivo *in vitro*, un tiempo de duplicación de $2,21 \pm 0,21$ días y se han clasificado como células con alto potencial proliferativo (Lu y cols., 2011). Por otro lado, una pequeña población de células estromales CD271+ CD49f- de dos líneas celulares de endometrio ovino, presentaron una rápida proliferación con un tiempo de duplicación de población celular de 18,7 horas, pero se desconoce la cantidad inicial de células que fueron sembradas en este estudio (Letouzey y cols., 2015). En el caso de MSCs de endometrio de novillas, se observó un corto tiempo de duplicación de la población con 37 horas, al sembrarse en una densidad de 20.000 células/cm² (Mehrabani y cols., 2015). Dicho resultado es similar a lo encontrado en este estudio, pero los autores consideran una densidad de siembra 10 veces mayor de células iniciales, por lo que el tiempo requerido para que las células lleguen a confluencia total presuntamente debería ser mucho menor, debido a la menor superficie inicial que deben repletar las células. Por lo tanto, independiente de las diferencias significativas encontradas en el experimento 1 y 2, todas las células del presente estudio fueron capaces de proliferar en un rango de tiempo corto.

Otro estudio de propiedades funcionales que se realiza para identificar la presencia de células madre en los tejidos es la diferenciación a tri-linaje, en donde se ha visto que sólo algunas de las células del estroma endometrial parecen diferenciarse (Gargett y cols., 2009). Las células madre poseen una facilidad de respuesta al medio ambiente tanto por la interacción entre células como con la matriz extracelular, quien tiene un papel potencial en la diferenciación directa de las células madre en linajes específicos, y que *in vitro* esta dado por las condiciones del medio de cultivo celular (Navaei-Nigjeh y cols., 2014).

En el presente estudio se observó que las células eran capaces de diferenciarse *in vitro* a condrocitos, osteoblastos y adipocitos, siendo positivas a la tinción y expresión de genes específicos según linaje, a partir de los 7 días bajo condiciones específicas de cultivo. Esto es indicativo de que las células poseen una respuesta temprana a los medios de inducción y por lo tanto el período utilizado en este estudio, es un tiempo razonable para poder determinar la capacidad de diferenciación y de algún modo también optimizar recursos. Se ha descrito incluso que estímulos breves de 15 minutos con moléculas y condiciones de cultivo específicas, es suficiente para inducir diferenciación y generar un cambio en el fenotipo de las células madre (Overman y cols., 2013). Otros grupos han presentado resultados similares, usando otras especies, ya que como se ha comentado existen pocos reportes de MSC de endometrio bovino. Por ejemplo, MSCs de endometrio humano fueron diferenciadas a linaje condrogénico a los 3, 14 y 21 días y la proporción de células con

características de condrocitos aumentó con el tiempo, alcanzando aproximadamente el 3% a los 14 días de cultivo. Sin embargo, no se observó ningún aumento adicional en el número de condrocitos después de 21 días (Wolff y cols., 2007). La diferenciación osteogénica de células madre de médula ósea de cerdos mostró que a los diez días de cultivo comienzan a hacerse más evidente los cambios de forma en las células, y esto aumentó a medida que avanzó el tiempo en cultivo (Carretero y cols., 2009). Por otra parte, se ha observado en una población de células de endometrio derivadas de sangre menstrual, la presencia de vacuolas lipídicas a los 10 días de cultivo en medio de diferenciación adipogénico (Meng y cols., 2007).

Con respecto a la capacidad de diferenciación de las MSCs de nuestro estudio, en función de la etapa del ciclo o del estado patológico del endometrio postparto, las células pertenecientes a la fase folicular y luteal tardía del ciclo estral mostraron diferenciación condrogénica, osteogénica y adipogénica, evaluadas mediante tinción celular y presencia de marcadores específicos para cada linaje, no así las células derivadas de la fase luteal temprana. En cuanto a los marcadores de diferenciación, la señal de la proteína Aggrecan en el día 7 y 14 de diferenciación condrogénica se apreció mediante western blot una doble banda en células de la fase folicular (~200 kDa), la cual no apareció en fase luteal tardía y en el control positivo de cartílago articular bovino para este marcador. Aggrecan posee un gran polimorfismo con variaciones de tamaño, patrón de sulfatación y densidad de carga de las cadenas laterales de glicosaminoglicanos (BuzÁs y cols., 1996). El anticuerpo utilizado en este estudio para detectar Aggrecan fue de tipo policlonal y existe sólo un registro en la literatura de su uso en western blot reportando una banda única de 200 kDa (Guo y cols., 2013). Sin embargo, mediante el uso de otros anticuerpos anti Aggrecan se ha observado la presencia de doble banda por western blot, como lo es en tejido después de una injuria, ya que esta proteína de gran tamaño fue fragmentada por proteasas y se generaron nuevos epítopes que fueron reconocidos por el anticuerpo (Lemons y cols., 2001). Asimismo, en bovinos la digestión con condroitinasa del tejido articular generó un doblete de proteínas para un proteoglicano de condroitina-sulfato similar a Aggrecan (Vogel y cols., 1994). Puede ser posible que en la diferenciación condrogénica de células de fase folicular del ciclo, existe una mayor cantidad de proteasas en las células endometriales que fragmentan e inactivan a Aggrecan afectando el proceso de condrogénesis.

En el caso de la proteína Ppar- γ se pudo detectar en este estudio solamente el día 7 de la diferenciación adipogénica de células de fase folicular. En general todas las células presentaron gran desprendimiento desde la placa los primeros días de cultivo con medio

de inducción y luego a los 7 y 14 días muy pocas células mostraron tinción positiva con Oil Red indicativa de diferenciación adipogénica. Esto conllevó a que la concentración total de proteínas obtenidas desde los cultivos celulares fuera muy baja e insuficiente para incluso detectar la presencia de β -actina en casi todas las muestras. Se han descrito cambios desfavorables a nivel de la monocapa de cultivo a partir del segundo día con medio de diferenciación adipogénico como, desprendimiento, plegamiento, alteraciones en la uniformidad y pérdida severa de la adherencia de las células a la placa de cultivo, lo que puede alterar la interpretación de los resultados en ensayos posteriores (Domínguez, 2011). La ausencia de proteína Ppar γ en este estudio no implica necesariamente que las células no sean capaces de diferenciarse a linaje adipogénico, ya que hay que considerar que se observó la presencia del gen PPF-1 en todas las células positivas a tinción, el cual ha sido observado previo al inicio del proceso de adipogénesis (Karagianni y cols., 2013).

Las células endometriales de postparto bovino pertenecientes al Experimento 2 también se diferenciaron a linaje condrogénico, osteogénico y adipogénico. En general, todas las células diferenciadas mostraron marcaje a la tinción para los respectivos linajes y fue similar entre los 7 y 14 días de diferenciación. En el caso de la diferenciación adipogénica, las células de endometritis clínica no mostraron tinción. Se ha descrito que células provenientes de tejidos inflamados puedan ver afectada su plasticidad en el proceso de diferenciación *in vitro* (Alongi y cols., 2010). A pesar de ello no se puede afirmar que las células de endometritis clínica sean incapaces de diferenciarse a linaje adipogénico, ya que durante el cultivo las células se desprendieron y en el momento de la tinción las células presentes eran muy escasas. Esto puede deberse al fenómeno al que se someten las células durante la diferenciación adipogénica descrito previamente, y que se ve potenciado por las características propias del tejido del cual son derivadas estas células, afectando la viabilidad de las células en cultivo. El daño a nivel nuclear de células de endometrio durante la endometritis, genera restricciones en la capacidad de proliferar y/o en la viabilidad de las células madre adultas en cultivo *in vitro* (Alongi y cols., 2010). Esto pudo haber afectado también la respuesta a la presencia de marcadores moleculares, ya que a pesar que en células de endometritis clínica que presentaron diferenciación mediante tinción, no fue posible observar las proteínas Aggrecan, Sparc y Ppar γ , ni β -actina en las muestras de interés a los 7 y 14 días. La recuperación y cuantificación de proteínas totales desde células diferenciadas fue baja e insuficiente para poder visualizar bandas proteicas específicas mediante western blot. Según los datos obtenidos en el Experimento 2, se puede plantear que el estado patológico del endometrio puede afectar las características funcionales de

células de cultivo primario, disminuyendo su potencial proliferativo, clonogénico y de diferenciación celular.

En general, los resultados aquí mostrados permiten afirmar que las características funcionales de las células endometriales son similares, pero no idénticas. Las variaciones observadas pueden deberse a la presencia de tipos celulares del tejido que poseen diferentes grados de diferenciación y que en cultivo *in vitro* se someten a senescencia, perdiendo la capacidad de replicarse sin descartarse que este proceso también ocurra *in vivo* (Snyder y Loring, 2005). Es así que en el caso de células de la fase luteal temprana del ciclo estral que si bien mostraron una gran capacidad de proliferación y de formar colonias, al poseer tienen un potencial de diferenciación limitado y no pueden ser definidas como MSCs ya que pueden representar una población de células más diferenciadas presentes en el endometrio (Dimitrov y cols., 2008). Además, las diferencias encontradas en el tiempo de doblaje y diferenciación celular durante la fase luteal temprana, hace suponer que las células endometriales poseen cierta respuesta a las variaciones hormonales propias de esta etapa. Por ello, la correcta denominación para las células de esa etapa del ciclo estral bovino sería de células progenitoras endometriales estromales, mientras que durante las fases folicular y luteal tardía, las características biológicas de las mismas, permiten asignarlas a la categoría de células madre mesenquimales endometriales.

De manera similar, en el Experimento 2 el comportamiento en cultivo *in vitro* de las células procedentes de vacas con endometritis podría estar relacionado con la inflamación, ya que no se encontró contaminación alguna con bacterias, hongos o levaduras en estas u otras células. La endometritis clínica fuerza una tasa de crecimiento más lenta y una eficiencia de clonación menor, lo que puede ser indicativo de una viabilidad reducida de las células o debido a la presencia de células más diferenciadas de la progenie. Por lo que se sugiere que durante el postparto bovino el endometrio sano y con endometritis subclínica posee MSCs y que en el caso de endometritis clínica debido a su diferenciación a algunos linajes mesodérmicos puedan ser llamadas como células progenitoras estromales.

La caracterización funcional de las células presentes en el endometrio es una de las principales variables que se evalúan, ya que algunas de las inconsistencias que rodean la identificación de MSCs surgen del hecho de que todavía no se han acordado marcadores moleculares específicos de tejido (Sethe y cols., 2006). Es importante considerar que la expresión de un marcador de células madre no necesariamente implican actividad de estas células, por lo que la identificación y caracterización de células madre en base a marcadores

de superficie celular, debe estar acompañado por al menos un ensayo funcional de células madre (Gargett, 2007). Es así como la identificación de algunos marcadores propuestos se ha determinado necesaria para demostrar la ubicación de células madre en tejidos y una potencial herramienta para aislar poblaciones puras de estas células, para luego caracterizar sus propiedades funcionales y eventual uso en aplicaciones médicas en terapia celular (Gurung y cols., 2015).

Si bien en humanos se ha descrito un fenotipo característico de MSCs, se han utilizado otros marcadores que han permitido aislar de igual forma MSCs de diferentes tejidos (Cervelló y cols., 2007; 2010). En el endometrio humano se ha propuesto una amplia gama de marcadores, ya sea de tipo mesenquimal, hematopoyético, perivascular, pluripotencia, de adhesión molecular y progenitor endotelial (Indumathi y cols., 2013). Debido a ello, en este trabajo se seleccionaron marcadores previamente descritos en la literatura para la identificación de MSCs de endometrio y/o de tejido bovino, como marcadores de pluripotencia OCT4, SOX2 y NANOG, de adhesión molecular CD44 y hematopoyético C-KIT, o también descritos como marcadores de multipotencia (Matthai y cols., 2006; Ono y cols., 2010; Pacchiarotti y cols., 2011; Götte y cols., 2011; Miernik y Karasinski, 2012; Rossi y cols., 2014; Bodek y cols., 2015; Letouzey y cols., 2015).

Para llevar a cabo, la evaluación de estos marcadores se realizó un estudio mediante RT-PCR y proteínas tanto en tejido como en células de cultivo primario de las muestras de ambos experimentos, evidenciándose la expresión de OCT4, SOX2, CD44 y C-KIT, no así NANOG. Se priorizó la detección de mensajeros de ARN en lugar de proteínas debido a la baja (casi nula) disponibilidad de anticuerpos específicos contra marcadores de superficie para bovinos en el mercado. Además, en experimentos propios por citometría de flujo se pudo constatar la ausencia de reactividad cruzada de anticuerpos comerciales contra marcadores de superficie de MSCs humanas, en las células bovinas del experimento (datos no mostrados). En el experimento 1, los niveles de OCT4 durante las tres fases del ciclo estral fueron significativamente mayores en tejido que en células y la expresión de SOX2 fue mayor en fase folicular que en fase luteal temprana y tardía. Asimismo, la expresión de las proteínas Oct4 y Sox2 fue observado en tejido con una localización nuclear en estroma y epitelio glandular durante la fase luteal temprana y tardía y además Oct4 se ubicó en el área perinuclear y de trans-membrana en estroma y epitelio glandular para el caso de la fase folicular. Solamente la proteína Sox2 fue observada en cultivo primario de células mediante western blot. Oct4 y Sox2 son factores de transcripción y OCT4 es un gen maestro en la regulación de la diferenciación embrionaria, por lo que la ubicación de ambos se ha

descrito principalmente a nivel nuclear (Zangrossi y cols., 2007). Sin embargo, similar a lo observado en fase folicular del ciclo estral se ha reportado en MSCs de mamíferos, la expresión de Oct4 no sólo en el núcleo sino también en una localización perinuclear y en un amplio rango de conexiones intercelulares. Esto puede ser indicativo de una posible expansión de un nicho de células madre residente, mediante la inducción de pluripotencia en nicho de células circundantes, con transferencia de factores de transcripción a través de conexiones intercelulares (Rolf y cols., 2012).

En el Experimento 2, de forma general todos los genes mostraron niveles significativamente mayores en tejido que en células para los tres estados patológicos del endometrio postparto. En el caso de SOX2, su expresión fue mayor en endometrio sano que en endometritis clínica, las proteínas fueron observadas en tejido con una localización nuclear en estroma y epitelio glandular, presentándose en células de cultivo primario en la mayoría de las muestras. Se ha observado la presencia de células madre que expresan marcadores de pluripotencia en varios tejidos adultos, pero inmediatamente surge la duda sobre la real pluripotencia de estas células y lo más probable es que los marcadores, aunque presentes, jueguen otro rol biológico que aún no se ha determinado. Se cree que la expresión de Oct4, Sox2 y Nanog es específica de las células pluripotentes y su regulación es clave para la capacidad de las células madre embrionarias de auto-renovarse y mantenerse en un estado indiferenciado (Young, 2011). Asimismo, la transcripción de Nanog es necesaria para la inducción de pluripotencia, pero puede ser regulada a través de una interacción entre Oct4 y Sox2 ó un nuevo factor pluripotente de unión a elementos Sox y que es prominente en células madre embrionarias (Kuroda y cols., 2005; Sumer y cols., 2011). La pérdida de expresión de NANOG en este estudio puede ser debido a que no existe una interacción de Oct4 y Sox2, generando posiblemente un mayor control sobre el mantenimiento y auto-renovación de las células pluripotentes presentes en el endometrio. Existen mecanismos fisiológicos implicados en mantener estas células quiescentes en el tejido, impidiendo su "proliferación desencadenada" para evitar el riesgo de formación de teratomas y además, desempeñar un papel en el rejuvenecimiento del grupo de células madre comprometidas con los tejidos más diferenciados y participando en la regeneración de órganos (Ratajczak y cols., 2011). Pese a ello, se ha observado la expresión conjunta de Oct4, Sox2 y Nanog en endometrio y miometrio en mujeres y en cultivo *in vitro* de células estromales de endometrio porcino (Götte y cols., 2011; Bodek y cols., 2015). Se ha observado una mayor expresión de OCT4 y NANOG en útero con adenomiosis que en tejido sano y en el cultivo *in vitro* células estromales endometriales la expresión de SOX2 y NANOG fue menor en

adenomiosis, sugiriendo que su potencial de diferenciación en el endometrio puede estar reducido (Łupicka y cols., 2015b). Además, las células madres encontradas en endometrio bovino, expresaron marcadores de pluripotencia, lo que las hace ser un posible candidato para la reprogramación a células madre pluripotentes inducidas, ya que se ha observado que la expresión endógena de factores de pluripotencia genera una fácil, eficiente y acelerada producción de estas células (Park y cols., 2011).

La presencia de marcadores de superficie varió en el ciclo estral con una expresión mayor de CD44 y menor de CD117 en fase folicular en comparación con la fase luteal temprana y luteal tardía. A su vez en el postparto bovino, la expresión de CD44 fue menor en tejido y células de endometrio sano en comparación con las de endometritis. En cuanto a la proteína Cd44 se observó, mediante western blot, que fue expresada en tejido durante el ciclo estral y en células de las fases luteal temprana y tardía. En el experimento 2 queda la incertidumbre si realmente la proteína de Cd44 está presente en tejido a pesar de no ser detectada en inmunohistoquímica y células, ya que el mismo caso se observó en tejido de fase folicular en donde sólo mediante western blot se evidenció la presencia de Cd44 en tejido. La baja disponibilidad de tejido de biopsia endometrial postparto no permitió realizar ambos ensayos, lo cual hubiese sido oportuno, debido a las variaciones en la respuesta que se presentan en algunas ocasiones en ambas técnicas y que está relacionada con la integridad del sitio de unión al anticuerpo, el cual puede ser alterado durante los procesos técnicos de fijación, cambios de pH o preparación del gel de electroforesis (Calderón, 2007). Es por ello que las muestras descritas como positivas a Cd44 en tejido fueron determinadas en base a la presencia de señal en western blot, a pesar de no obtenerse información acerca de su localización *in situ* mediante inmunohistoquímica.

CD44 ha sido utilizado como marcador de superficie de MSCs pero también se ha expresado en cultivos *in vitro* contaminados con otros tipos de células maduras, incluyendo fibroblastos; sin embargo estos no son capaces de formar colonias y tener un potencial de diferenciación como MSCs (Alt y cols., 2011; Halfon y cols., 2011). Asimismo, CD117 se ha utilizado como marcador de células madre y junto con varios factores de crecimiento hematopoyético juegan un papel importante en la migración celular, proliferación y supervivencia en el estroma decidual del endometrio humano durante el embarazo temprano (Kauma y cols., 1996). En bovinos, CD117 ha sido expresado en células epiteliales y estromales de endometrio y en células uterinas de miometrio, donde se le ha descrito como un marcador de células madre multipotentes que migran desde la médula ósea hacia el útero a lo largo de toda la vida de la hembra, independiente de la edad y del

estado hormonal ovárico (Łupicka y cols., 2015a). Algo similar se ha descrito en humanos, donde se propone a Cd117 como uno de los marcadores de células madre con localización en estroma de la capa basal de endometrio, estando presentes continuamente desde el período fetal e independientes de la regulación hormonal durante el ciclo menstrual (Cho y cols., 2004).

En general, algunos marcadores en células de cultivo *in vitro* mostraron expresión a nivel de ARNm, pero no así en proteínas, como es el caso de OCT4 durante el ciclo estral y CD44 en fase folicular. La expresión relativa de estos genes fue posible detectarla mediante PCR a tiempo real, pero en bajas cantidades, lo que se puede traducir a una menor concentración de las proteínas codificadas, presentes en el cultivo que puedan ser detectadas para un marcador en específico. Además puede ser que el ARNm sea afectado por mecanismos reguladores que modifican y/o inhiben la iniciación de la traducción a proteínas (Altmann y Trachsel, 1993). Alternativamente, puede haber modificaciones postraduccionales de las proteínas, que dan lugar a diferentes patrones de expresión cuando se compara con ARNm (Łupicka y cols., 2015b). La diferencia en la expresión de la mayoría de los marcadores en células, comparado con tejido, ha sido relacionado con un posible cambio en las características de la célula en cultivo *in vitro* que generan una pérdida de algunos marcadores, o debido a que algunas células tales como células epiteliales y endoteliales se excluyen selectivamente durante el cultivo en placas plásticas (Yoshimura y cols., 2006). En este estudio se pudo demostrar la presencia *in situ* de Oct4 y Sox2 en células epiteliales glandulares y estromales del tejido, además de Cd44 que fue expresado principalmente en estroma. Varios estudios han observado la presencia *in situ* de marcadores de células madre en endometrio, los cuales han sido localizados en epitelio luminal y glandular, y en estroma en células endoteliales y perivasculares (Cervelló y cols., 2007; Schwab y cols., 2008; Wang y cols., 2012; Łupicka y cols., 2015a).

El endometrio bovino presenta marcadores de pluripotencia y multipotencia que se ven afectados por las variaciones de las hormonas ováricas durante el ciclo estral y el estado patológico del endometrio postparto. Además, la identificación de marcadores moleculares planteó la duda acerca del posible origen de estas poblaciones celulares de endometrio bovino. Todos los marcadores identificados han sido expresados en médula ósea (Indumathi y cols., 2013), lo que puede indicar que las células madre endometriales deriven directamente de este tejido y posean un potencial rol en la regeneración o reparación del tejido después de la lesión (Du y Taylor, 2007). Algunos marcadores como CD44 han sido relacionados con células perivasculares y se sugiere que MSCs tienen un posible origen

perivascular, las cuales provendrían predominantemente de pericitos liberados desde vasos sanguíneos dañados e inflamados (Crisan y cols., 2008; Caplan y Hariri, 2015). Además, la presencia de marcadores de indiferenciación puede indicar que las células derivan de células madre fetales residuales que se depositan en diversos órganos y se mantienen durante la vida de los mamíferos (Cho y cols., 2004; Ratajczak y cols., 2011). Quizás también, puedan derivarse desde células madre presentes a nivel de oviducto que expresan marcadores de pluripotencia y poseen propiedades similares a la de células madre de endometrio, pudiendo diferenciarse a distintos linajes celulares y experimentar cambios cíclicos como el crecimiento y regeneración celular (Wang y cols., 2012; Indumathi y cols., 2013). Todas estas teorías pueden ser aplicables, ya que debido a los marcadores encontrados en este estudio hace presumir la existencia de varias poblaciones de células madre en el endometrio bovino.

Hacia un modelo integrativo de la presencia y función de MSCs en endometrio bovino.

La presencia de células madre más diferenciadas sugerida durante la etapa luteal temprana, puede ser debido a un estímulo de E2 y P4 para la proliferación de células estromales. La regulación hormonal puede ser mediada a través de señales paracrinias resultantes de la interacción de P4 y E2 con el nicho de células progenitoras (Janzen y cols., 2013). Las células perdidas durante el ciclo estral son reemplazadas por nuevas células generadas a partir de células madre, que aún permanecen en los mismos compartimentos celulares de modo de mantener la homeostasis del tejido (Huang y cols., 2012). Por su parte, la presencia de células MSCs fue determinada en fase folicular y luteal tardía y que puede ser debido a la intensa mitosis de células estromales frente al aumento en las concentraciones de P4 o de E2, estimule una división asimétrica en el nicho celular y con ello la auto-renovación de células madre y generación de células progenitoras que entreguen células diferenciadas terminalmente. En bovinos se cree que la proliferación de células endometriales está mediada por factores de crecimiento estimulados por E2 (Arai y cols., 2013). La P4 actúa a través de receptores estromales y epiteliales para inhibir la proliferación epitelial inducida por E2 e inducir la proliferación del estroma subyacente, lo cual es mediado por numerosos genes diana (Zhang y cols., 2013). Es así como en bovinos se ha observado un aumento drástico en la expresión génica de TNF α en células del CL, desde la etapa luteal media hasta la tardía, la que disminuye luego de este período (Sakumoto y cols., 2000).

Se ha establecido que P4 y no E2, es capaz de regular *in vitro* la expresión de agreganasas en células estromales de endometrio humano, lo que puede jugar un papel importante durante la deciduización del endometrio humano (Wen y cols., 2013). Quizás la mayor concentración de E2 ó la baja concentración de P4 presente en la fase folicular no es capaz de controlar la expresión de las agreganasas en las células estromales, generando una alteración en la formación de condrocitos y con ella una posible proteólisis y/o fragmentación de la proteína Aggrecan. Se ha asociado que alteraciones en las variaciones de esteroides ováricos durante el ciclo estral bovino pueden afectar directamente el funcionamiento y proliferación de células madre uterinas, desarrollando patologías como la adenomiosis (Łupicka y cols., 2015b). Todas estas evidencias respaldan que las células madre presentes en el endometrio responden en función de las hormonas ováricas y que durante el ciclo estral bovino existen poblaciones de células madre estromales que exhiben marcadores de pluripotencia y multipotencia y en donde algunas de estas células mostraron características propias de MSCs.

Por su parte, durante el postparto bovino, el tejido endometrial experimenta marcados cambios morfológicos y funcionales que involucran un cierto grado de daño en el tejido endometrial. Sin embargo, la presentación de patologías como endometritis afecta la capacidad regenerativa celular, con un severo daño tisular y necrosis celular (Sheldon y Dobson, 2004). La inflamación postparto del útero involucra una respuesta inmune e inflamatoria local con la participación de una serie de moléculas, en donde el equilibrio inapropiado entre citoquinas pro y antiinflamatorias determina su continuidad, duración y aparición de la enfermedad inflamatoria (Sheldon y cols., 2008). La PGE₂ desempeña un papel crítico en la guía y el gobierno de diversos aspectos de la respuesta inflamatoria, regulando la producción de varias ILs y TNF- α y provocando potentes efectos inmunosupresores que contribuyen a la fase de resolución de la inflamación aguda, facilitando la regeneración tisular y el retorno a la homeostasis (Nakanishi y Rosenberg, 2013). Se ha observado que vacas con endometritis clínica tienen mayores cantidades de ARNm para los genes IL1A, IL6, IL17A, TNF α , PGES y PGHS2 en comparación con vacas sanas (Johnson y cols., 2015).

Se describe que la matriz extracelular puede interactuar con el nicho de células madre a nivel local y/o sistémico, mediante factores de crecimiento, quimiocinas y otras moléculas reguladoras que deciden el estado de quiescencia o proliferación, auto-renovación o diferenciación, migración o retención y muerte o supervivencia celular (Wagers, 2012). Las células durante la inflamación pueden responder al daño tisular, detectando factores

endógenos liberados al líquido extracelular por células moribundas o necróticas, o componentes de la matriz extracelular, produciendo moléculas específicas, reclutamiento de neutrófilos y células mononucleares de sangre periférica para eliminar los desechos celulares y que a su vez varía según el grado de inflamación del tejido (Healy y cols., 2014). Por lo que el efecto de la inflamación sobre los tejidos y la respuesta de las células madre residentes, está estrechamente relacionada con la forma en que se inicia, mantiene y resuelve la inflamación (Kizil y cols., 2015).

El daño del tejido presente en endometritis subclínica y clínica, el cual es mayor en esta última, se vió reflejada en una capacidad más limitada de las características funcionales de estas células en comparación con el tejido sano. Al parecer, las señales emitidas de acuerdo al grado de daño tisular afectan la presencia de poblaciones de células inmaduras, aumentando la proliferación de células progenitoras para restituir las células perdidas en el tejido mediante diferenciación o quizás también por transdiferenciación de algunas células madre residentes estromales (Huang y cols., 2012). Se ha descrito que frente a una lesión las células madre estromales modifican su fenotipo y que en condiciones *in vitro*, algunas citoquinas como IL-1 β , TNF α , y IFN- γ , han demostrado ejercer una menor actividad estimuladora para que estas células formen colonias (Gronthos y Simmons, 1995). Asimismo, la inflamación puede afectar a células madre/progenitora directamente en el número total de divisiones celulares y causar senescencia prematuramente, evidenciándose un crecimiento más lento y afectando el resultado de la diferenciación celular (Alongi y cols., 2010). La renovación limitada de células madre puede significar una capacidad regenerativa restringida de un tejido, particularmente en el contexto de una lesión crónica o envejecimiento (Grompe, 2012).

Además, puede ser que la lesión tisular genere migración de MSCs desde otros tejidos y que sean reclutadas por el endometrio, pudiendo fácilmente repoblar el tejido y contribuir a la regeneración del tejido (Kørbliing y Estrov, 2003). Como se ha observado en MSCs derivadas de tejido adiposo administradas vía intrauterina y que han sido incorporadas al epitelio endometrial en yeguas con endometriosis (Mambelli y cols., 2013). Por otro lado, se ha visto en ratones y humanos que la PGE₂ mejora la anidación *in vivo* en médula ósea, la supervivencia y proliferación de células madre adultas hematopoyéticas (Hoggatt y cols., 2015). Y existe evidencia *in vivo* que la PGE₂ producida localmente en respuesta al daño tisular, es necesaria para poder potenciar los efectos proliferativos de las células madre, mediante la interacción con Wnt y así fomentar la reparación de órganos (Goessling y cols., 2009).

Cada tejido adulto posee sus propias células madre y casi todos ellos tienen un potencial regenerativo que está relacionado con su dinámica de rotación celular innata (Caplan y Hariri, 2015). Por su parte, el endometrio es un tejido altamente dinámico que se somete a una constante regeneración celular a lo largo de la vida reproductiva de la hembra, siendo una fuente propicia para la sostenida obtención de MSCs (Gargett, 2007). En este estudio se ha dejado en manifiesto que el endometrio bovino posee poblaciones de células madre estromales y MSCs que varían durante el ciclo estral y en el estado patológico del endometrio durante el postparto bovino. Si bien mucho se ha aprendido acerca de las células madre de endometrio en los 10 años desde su descubrimiento, varias interrogantes no han sido resueltas, por lo que el desarrollo de modelos animales es crucial para investigar el papel de las células madre en el endometrio y en el trastorno de enfermedades uterinas (Gargett y cols, 2016). Es por ello que el establecimiento de un modelo animal como el bovino para la obtención y caracterización de MSCs en el endometrio, puede ser de gran utilidad en la obtención, identificación y caracterización de estas células en otras especies y/o su potencial uso en medicina regenerativa.

Las MSCs de endometrio bovino han sido propuestas como una buena elección para el uso en terapia celular, ya que pueden obtenerse y administrarse con facilidad y seguridad en la regeneración de tejidos bovinos (Mehrabani y cols., 2015). Incluso, se ha propuesto su aplicación directa en el tratamiento de patologías reproductivas bovinas que requieren una remodelación endometrial como fibrosis e incluso endometritis (de Moraes y cols., 2016). Para ello es necesario seguir estudiando estas células ya sea mediante ensayos *in vitro* en donde se caracterize y evalúe por ejemplo su efecto inmunomodulador frente a moléculas específicas y/o patógenos, además de ensayos *in vivo* en donde se pueda evaluar su potencial de migración y anidación en el tejido, ya sea para el tratamiento de enfermedades degenerativas del endometrio como de otros tejidos y abarcando quizás aplicaciones autólogas y/o heterólogas. También estas células pueden ser utilizadas para evaluar su capacidad de formar iPS y con ello la producción de células específicas para la regeneración de un determinado tejido. Otro punto de gran importancia para la realización de futuros estudios, es la caracterización y evaluación *in vitro* de la secretómica de las diferentes células de endometrio bovino encontradas en este estudio. Conjuntamente la secretómica puede utilizarse como medio condicionado en el cultivo *in vitro* de determinadas células, generando un microambiente extracelular específico que puede modificar el comportamiento de las células y que sería de interés evaluar.

El uso de MSCs o medio condicionado han sido considerados como potenciales herramientas en la terapia regenerativa, ya que pueden ejercer un efecto terapéutico mediante la aceleración de la regeneración y/o reparación tisular. Así es como este estudio generó información valiosa y novedosa, que da incampte al completo estudio de estas células y abre una nueva ventana de investigación para el desarrollo de terapias regenerativas, en la que aún queda mucho por desarrollar.



5. CONCLUSIONES

1. Se estableció un modelo experimental *ex vivo* a partir de tejido endometrial bovino para la identificación de MSCs durante el ciclo estral y postparto bovino.
2. Se identificó la expresión de marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2, pero no NANOG, y de multipotencia CD44 y CD117 a nivel de ARNm y proteínas en tejido endometrial durante el ciclo estral y postparto bovino.
3. Se identificó la presencia de células madre mesenquimales y células progenitoras estromales a partir de cultivos primarios de endometrio en la fase folicular y luteal tardía del ciclo estral, y durante el postparto en vacas sanas y con endometritis subclínica; y células madre estromales en fase luteal temprana y endometritis clínica.
4. Las células madre mesenquimales y células progenitoras estromales obtenidas durante el ciclo estral y postparto bovino, presentaron características funcionales de clonogenicidad, proliferación y diferenciación *in vitro* a estirpes mesodérmicas y expresaron marcadores de pluripotencia OCT4 y SOX2, pero no NANOG, y de multipotencia CD44 y CD117 a nivel de ARNm y proteínas.
5. La funcionalidad de MSCs cambió a lo largo del ciclo estral, mientras que la presencia de marcadores fue similar entre la fase folicular, luteal temprana y tardía.
6. La funcionalidad y presencia de marcadores de MSCs en el endometrio de vacas postparto fue observada diferencialmente en endometritis subclínica y clínica en comparación con endometrio sano.
7. Se propone como modelo general integrativo que el endometrio bovino presenta una dinámica de presencia y funcionalidad de células madre, que varía en función del transcurso del ciclo estral y de la inflamación inherente a procesos patológicos puerperales.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aller, J., Callejas, S., Alberio, R. (2013). Biochemical and steroid concentrations in follicular fluid and blood plasma in different follicular waves of the estrous cycle from normal and superovulated beef cows. *Anim Reprod Sci.* 142(3-4):113-20.
2. Alongi, D., Yamaza, T., Song, Y., Fouad, A., Romberg, E., Shi, S., Huang, G. (2010). Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med.* 5(4):617–31.
3. Alt, E., Yan, Y., Gehmert, S., Song, Y.-H., Altman, A., Gehmert, S., Bai, X. (2011). Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell.* 103(4):197-208.
4. Altmann, M., Trachsel, H. (1993). Regulation of translation initiation and modulation of cellular physiology. *Trends Biochem Sci.* 18(11):429-32.
5. Arai, M., Yoshioka, S., Tasaki, Y., Okuda, K. (2013). Remodeling of bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 142(1-2):1-9.
6. Balint, R., Richardson, S.M., Cartmell, S.H.J. (2015). Low-density subculture: a technical note on the importance of avoiding cell-to-cell contact during mesenchymal stromal cell expansion. *J Tissue Eng Regen Med.* 9(10):1200-3.
7. Barlund, C., Carruthers, T., Waldner, C., Palmer, C. (2008). A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* 69(6): 714–723.
8. Bauersachs S., Mitko K., Ulbrich S., Blum H., Wolf E. (2008). Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 116(7):371-84.
9. Bauersachs, S., Wolf, E. (2012). Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Anim Reprod Sci.* 134(1-2):84-94.
10. Bazer, F., Song, G., Kim, J., Dunlap, K., Satterfield, M., Johnson, G., Wu, G. (2012). Uterine biology in pigs and sheep. *J Anim Sci Biotechnol.* 3(1):23.
11. Beyer Nardi, N., da Silva Meirelles, L. (2006). Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(174):249-82.
12. Bodek, G., Bukowska, J., Wisniewska, J., Ziecik, A. (2015). Evidence for the presence of stem/progenitor cells in porcine endometrium. *Mol Reprod Dev.* 82(3):182-90.

13. Bratincsák, A., Brownstein, M., Cassiani-Ingoni, R., Pastorino, S., Szalayova, I., Tóth, Z., Key, S., Néemeth, K., Pickel, J., Mezey, E. (2007). CD45-Positive Blood Cells Give Rise to Uterine Epithelial Cells in Mice. *Stem Cells*. 25(11): 2820 –2826.
14. Buzás, E., Mikecz, K., Glant, T. (1996). Aggrecan: A target molecule of autoimmune reactions. *Pathol Oncol Res*. 2(4):219-228.
15. Cabezas, J., Lara, E., Pacha, P., Rojas, D., Veraguas, D., Saravia, F., Castro, F. (2014). The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reprod Domest Anim*. 49(4):550-9.
16. Calderón, R. (2007). Curso de métodos fisicoquímicos en biotecnología. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Págs: 1-54. <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
17. Cao, M., Chan, R., Yeung, W. (2015). Label-retaining stromal cells in mouse endometrium awaken for expansion and repair after parturition. *Stem Cells Dev*. 24(6):768-80.
18. Caplan, A. I., & Hariri, R. (2015). Body Management: Mesenchymal Stem Cells Control the Internal Regenerator. *Stem Cells Transl Med*. 4(7):695-701.
19. Carneiro, L., Cronin, J., Sheldon, I. (2016). Mechanisms linking bacterial infections of the bovine endometrium to disease and infertility. *Reprod Biol*. 16(1):1-7.
20. Carretero, C., Bernal, C., Torres, M., Thevi, J., Zakaria, F., Mikán, J. (2009). Evaluación de la biocompatibilidad de apatita carbonatada de síntesis seca por medio del cultivo de células osteoprogenitoras de porcino. *Revista Med*. 17 (2):231-244.
21. Cervelló, I., Gil-Sanchis, C., Mas, A., Delgado-Rosas, F., Martínez-Conejero, J., Galán, A., Simón, C. (2010). Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *PLoS One*. 5(6):e10964.
22. Cervelló, I., Horcajadas, J. A., Pellicer, A., Simón, C. (2007). Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod*. 22(1):45-51.
23. Cervelló, I., Mas, A., Gil-Sanchis, C., Peris, L., Faus, A., Saunders, P. T. K., Simón, C. (2011). Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *PLoS One*. 6(6):e21221.
24. Cervelló, I., Mas, A., Gil-Sanchis, C., Simón, C. (2013). Somatic Stem Cells in the Human Endometrium. *Semin Reprod Med*. 31(1):69-76.

25. Chagastelles, P., Nardi, N. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl.* 1(3):63-67.
26. Chan, R. (2004). Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells. *Biol Reprod.* 70(6):1738-50.
27. Chapwanya, A., Meade, K., Foley, C., Narciandi, F., Evans, A., Doherty, M., Callanan J., O'Farrelly C. (2012). The postpartum endometrial inflammatory response: a normal physiological event with potential implications for bovine fertility. *Reprod Fertil Dev.* 24(8):1028-39.
28. Cho, N., Park, K., Kim, T. (2004). Lifetime expression of stem cell markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril.* 81(2):403-7.
29. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C., Corselli, M., Park, T. S., Pe, B. (2008). A perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell.* 3(3):301-13.
30. da Silva Meirelles L., Caplan, A., Nardi, N. (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 26(9): 2287–99.
31. Darzi, S., Werkmeister, J., Deane, J., Gargett, C. (2016). Identification and Characterization of Human Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Potential for Cellular Therapy. *Stem Cells Transl Med.* 5(9):1127-32.
32. De Cesaris, V., Grolli, S., Bresciani, C., Conti, V., Basini, G., Parmigiani, E., Bigliardi, E. (2017). Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells. *Reprod Domest Anim.* 52(2):235-242.
33. de Moraes, C., Maia, L., Dias, M., Dell'Aqua, C., da Mota, L., Chapwanya A., Landim-Alvarenga, F., Oba E. (2016). Bovine endometrial cells: a source of mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biol Int.* 40(12):1332-1339.
34. de Souza, G., Costa, J., da Cunha, E., Passos, J., Ribeiro, R., Saraiva, M., van den Hurk R., Silva, J. (2016). Bovine ovarian stem cells differentiate into germ cells and oocyte-like structures after culture in vitro. *Reprod Domest Anim.* 52(2):243-250.
35. Deans, R., Moseley, A. (2000). Mesenchymal stem cells : Biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 28(8):875-84.
36. Dhaliwal, G., Murray, R., Woldehiwet, Z. (2001). Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci.* 67(3-4):135-52.

37. Dimitrov, R., Timeva, T., Kyurkchiev, D., Stamenova, M., Shterev, A., Kostova, Zlatkov, V., Kehayov, I., Kyurkchiev, S. (2008). Characterization of clonogenic stromal cells isolated from human endometrium. *Reproduction*. 135(4):551-8.
38. Dobson-Hill, B. (2009). Uterine involution in the dairy cow: Comparative study between organic and conventional dairy cows. Thesis of Masters of Science in Science Animal, Massey University, New Zealand. pp: 1-72. <https://muir.massey.ac.nz/bitstream/handle/10179/1272/01front.pdf>
39. Domínguez, G. (2011). Efectos de la modulación de los receptores PPAR γ y de Glucocorticoides en la expresion de Caveolina-1 en células 3T3-L1. Tesis de Magister en Ciencias Farmacéuticas, Universidad Nacional de Colombia, Colombia. Pág: 1-69. <http://www.bdigital.unal.edu.co/4259/1/192538.2011.pdf>
40. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4), 315–7.
41. Donofrio, G., Franceschi, V., Capocefalo, A., Cvirani, S., Sheldon, I. M., Capocefalo, A., Cvirani, S. (2008). Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reprod Biol Endocrinol*. 6:65.
42. Du H., Taylor, H. (2007). Contribution of one marrow-derived stem cells to endometrium and endometriosis. *Stem Cells*. 25(8): 2082–6.
43. Du H., Taylor, H. (2010). Stem cells and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 22(3): 235–41.
44. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., Leblanc, S. J. (2010). Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*. 93(11):5225-33.
45. Dyce, K., Sack, W., Wensing, C. (2015). Anatomía veterinaria. Cuarta edición, Editorial El Manual moderno. Ciudad de Méxcico, México.
46. Eckfeldt, C., Mendenhall, E., Verfaillie, C. (2005). The molecular repertoire of the “almighty” stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(9):726-37.
47. Eridani, S., Cova, L. (2003). Stem cell research: State of the art. *Cytotechnology*. 41(2-3):53-7.
48. Fazleabas, A., Strakova, Z. (2002). Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol*. 186(2):143-7.

49. Fernández, M. (2008). *El Ciclo Estral de la Vaca: Diagnóstico fotográfico*. Editorial Servet, Zaragoza, España.
50. Foley, C., Chapwanya, A., Creevey, C. J., Narciandi, F., Morris, D., Kenny, E. M., Meade, K. G. (2012). Global endometrial transcriptomic profiling: transient immune activation precedes tissue proliferation and repair in healthy beef cows. *BMC Genomics*. 13:489.
51. Fortier, M., Guilbault, L., Grasso, F. (1988). Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. *J Reprod Fertil*. 83(1):239-48.
52. Franken, N., Rodermond, H., Stap, J., Haveman, J., van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc*. 1(5):2315-9.
53. Gargett, C. (2006). Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 46(3):250-3.
54. Gargett, C. (2007). Uterine stem cells: What is the evidence? *Hum Reprod Update*. 13(1):87-101.
55. Gargett, C., Chan, R., Schwab, K. (2008). Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells. *Mol Cell Endocrinol*. 288(1-2):22-9.
56. Gargett, C., Masuda, H. (2010). Adult stem cells in the endometrium. *Mol Hum Reprod*. 16(11):818-34.
57. Gargett, C., Nguyen, H., Ye, L. (2012). Endometrial regeneration and endometrial stem/progenitor cells. *Rev Endocr Metab Disord*. 13(4):235-51.
58. Gargett, C., Schwab, K., Deane, J. (2016). Endometrial stem/progenitor cells: The first 10 years. *Hum Reprod Update*. 22(2):137-63.
59. Gargett, C., Schwab, K., Zillwood, R., Nguyen, H., Wu, D. (2009). Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biol Reprod*. 80(6):1136-45.
60. Gargett, C., Ye, L. (2012). Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertil Steril*. 98(1):11-20.
61. Gebhardt, S., Merkl, M., Herbach, N., Handler, J. (2012). Exploration of global gene expression changes during the estrous cycle in equine endometrium. *Biol Reprod*. 87 (6): 136.
62. Girling, J., Rogers, P. (2005). Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis*. 8(2):89-99.

63. Goessling, W., North, T., Loewer, S., Lord, A., Lee, S., Stoick-Cooper, C., Zon, L. (2009). Genetic Interaction of PGE2 and Wnt Signaling Regulates Developmental Specification of Stem Cells and Regeneration. *Cell*. 136(6):1136-47.
64. Götte, M., Wolf, M., Staebler, A., Buchweitz, O., Kiesel, L., Schüring, A. (2011). Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis. *Fertil Steril*. 95(1):338-41.
65. Grompe, M. (2012). Tissue stem cells: New tools and functional diversity. *Cell Stem Cell*. 10(6):685-9.
66. Gronthos, S., Simmons, P. (1995). The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood*. 85(4):929-40.
67. Guo, X., Chu, X., Li, W., Pan, Q., You, H. (2013). Chondrogenic effect of precartilaginous stem cells following NLS-TAT cell penetrating peptide-assisted transfection of eukaryotic hTGF β 3. *J Cell Biochem*. 114(11):2588-94.
68. Gurung, S., Deane, J., Masuda, H., Maruyama, T., Gargett, C. (2015). Stem Cells in Endometrial Physiology. *Semin Reprod Med*. 33(5):326-32.
69. Guzmán, E.A. (2013). La ozonoterapia intrauterina en el tratamiento de la endometritis subclínica bovina. Tesis de Magister en Reproducción Animal, Universidad de Cuenca, Ecuador.
70. Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B., Ginis, I. (2011). Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*. 20(1):53-66.
71. Healy, L., Cronin, J., Sheldon, I. (2014). Endometrial cells sense and react to tissue damage during infection of the bovine endometrium via interleukin 1. *Sci Rep*. 14(4):7060.
72. Henriot, P., Chevronnay, H., Marbaix, E. (2012). The endocrine and paracrine control of menstruation. *Mol Cell Endocrinol*. 358(2):197-207.
73. Hill, J., Gilbert, R. (2008). Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J*. 86(8):312-6.
74. Hoggatt, J., Singh, P., Sampath, J., Pelus, L. (2015). Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood*. 113(22):5444-55.
75. Huang, C., Orvis, G., Wang, Y., Behringer, R. (2012). Stromal-to-Epithelial Transition during Postpartum Endometrial Regeneration. *PLoS One*. 7(8): e44285.

76. Indumathi, S., Harikrishnan, R., Rajkumar, J. S., Sudarsanam, D., Dhanasekaran, M. (2013). Prospective biomarkers of stem cells of human endometrium and fallopian tube compared with bone marrow. *Cell Tissue Res.* 352(3):537-49.
77. Ireland, J., Murphee, R., Coulson, P. (1980). Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. *J Dairy Sci.* 63(1):155-60.
78. Johnson, H., Torres, C., Carvallo, F., Duchens, M., Peralta, O. (2015). Endometrial expression of selected transcripts in postpartum of primiparous Holstein cows with clinical and subclinical endometritis. *Anim Reprod Sci.* 156:34-9.
79. Karagianni, M., Brinkmann, I., Kinzebach, S., Grassl, M., Weiss, C., Bugert, P., Bieback, K. (2013). A comparative analysis of the adipogenic potential in human mesenchymal stromal cells from cord blood and other sources. *Cytotherapy*, 15(1), 76-88.
80. Kasimanickam, R., Duffield, T., Foster, R., Gartley, C., Leslie, K., Walton, J., Johnson, W. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology.* 62(1–2):9-23.
81. Kastelic, J., Bergfelt, D., Ginther, O. (1990). Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. *Theriogenology.* 33(6):1269-1278.
82. Kauma, S., Huff, T., Krystal, G., Ryan, J., Takacs, P., Turner, T. (1996). The expression of stem cell factor and its receptor, c-kit in human endometrium and placental tissues during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 81(3):1261-6.
83. Kizil, C., Kyriasis, N., Brand, M. (2015). Effects of inflammation on stem cells: together they strive? *EMBO Rep.* 16(4):416-26.
84. Kørbling, M., Estrov, Z. (2003). Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med.* 349(6):570-82.
85. Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Tada, T. (2005). Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. *Mol Cell Biol.* 25(6):2475-85.
86. Lakshmipathy, U., Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 19(1):29-38.
87. 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.* [Epub ahead of print].

88. LeBlanc, S., Duffield, T., Leslie, K., Bateman, K., Keefe, G., Walton, J., Johnson, W. H. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 85(9):2223-36.
89. Lemons, M., Sandy, J., Anderson, D., Howland, D. (2001). Intact aggrecan and fragments generated by both aggrecanase and metalloproteinase-like activities are present in the developing and adult rat spinal cord and their relative abundance is altered by injury. *J Neurosci.* 21(13):4772-81.
90. Letouzey, V., Tan, K., Deane, J., Ulrich, D. (2015). Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem/Stromal Cells in the Ovine Endometrium. *PLoS One.* 10(5): e0127531.
91. Li, L., Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 21:605-31.
92. Lin, H. (2002). The stem-cell niche theory : lessons from flies. *Nat Rev Genet.* 3(12):931-40.
93. Lu, G., Zhang, S., Chen, Q., Wang, X., Lu, F., Liu, J., Li, M., Li, Z. (2011). Isolation and multipotent differentiation of human decidua basalis-derived mesenchymal stem cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 31(2):262-5.
94. Łupicka, M., Bodek, G., Shpigel, N., Elnekave, E., Korzekwa, A. (2015). Identification of pluripotent cells in bovine uterus: In situ and in vitro studies. *Reproduction.* 149(4):317-327.
95. Łupicka, M., Socha, B., Szczepanska, A., Korzekwa, A. (2015). Expression of pluripotency markers in the bovine uterus with adenomyosis. *Reprod Biol Endocrinol.* 13:110.
- 96.** Madoz, L., Jaureguiberry, M., Migliorisi, A., De la sota, R. (2016). Cambios en la citología endometrial durante el ciclo estral en vacas de tambo. *Cs Morfol.* 18(1):34-41.
97. 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 endometrosis. *Theriogenology.* 79(5):744–750.
98. Martins, T., de Paula, A., Gomes, D., Goes, A. (2014). Alkaline phosphatase expression/activity and multilineage differentiation potential are the differences between fibroblasts and orbital fat-derived stem cells--a study in animal serum-free culture conditions. *Stem Cell Rev.* 10(5):697-711.

99. Maruyama, T., Masuda, H., Ono, M., Kajitani, T., Yoshimura, Y. (2010). Human uterine stem/progenitor cells: their possible role in uterine physiology and pathology. *Reproduction*. 140(1):11-22.
100. Masuda, H., Anwar, S., Bühring, H., Rao, J., Gargett, C. (2012). A novel marker of human endometrial mesenchymal stem-like cells. *Cell Transplant*. 21(10):2201-14.
101. Masuda, H., Kalka, C., Takahashi, T., Yoshida, M., Wada, M., Kobori, M., Hayashi, S. (2007). Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 101(6):598-606.
102. Masuda, H., Matsuzaki, Y., Hiratsu, E., Ono, M., Nagashima, T., Kajitani, T., Arase, T., Oda, H., Uchida, H., Asada, H., Ito, M., Yoshimura, Y., Maruyama, T., Okano, H. Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *PLoS One*. 28;5(4):e10387.
103. Matthai, C., Horvat, R., Noe, M., Nagele, F., Radjabi, A., van Trotsenburg, M., Kolbus, A. (2006). Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod*. 2006 Jan;12(1):7-10.
104. Mehrabani, D., Rahmanifar, F., Mellinejad, M., Tamadon, A., Dianatpour, M., Zare, S., Ghobadi, F. (2015). Isolation, culture, characterization, and adipogenic differentiation of heifer endometrial mesenchymal stem cells. *Comp Clin Pathol*. 24(5):1159-64.
105. Meira, E., Henriques, L., Sá, Gregory, L. (2012). Comparison of ultrasonography and histopathology for the diagnosis of endometritis in Holstein-Friesian cows. *J Dairy Sci*. 95(12):6969-73.
106. Meng, X., Ichim, T., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Riordan, N. (2007). Endometrial regenerative cells : A novel stem cell population. *J Transl Med*. 5:57.
107. Miernik, K., Karasinski, J. (2012). Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction*. 143(2):203-209.
108. Mints, M., Jansson, M., Sadeghi, B., Westgren, M., Uzunel, M., Hassan, M., Palmblad, J. (2008). Endometrial endothelial cells are derived from donor stem cells in a bone marrow transplant recipient. *Hum Reprod*. 23(1):139-43.
109. Mitko, K., Ulbrich, S., Wenigerkind, H., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E., Bauersachs, S. (2008). Dynamic changes in messenger RNA profiles of bovine endometrium during the oestrous cycle. *Reproduction*. 135(2):225-40.

110. Moore, K., Lemischka, I. (2006). Review Stem Cells and Their Niches. *Science*. 311(5769):1880-5.
111. Nakanishi, M., Rosenberg, D. (2013). Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Semin Immunopathol.* 35(2):123-37.
112. Navaei-Nigjeh, M., Amoabedini, G., Noroozi, A., Azami, M., Asmani, M. N., Ebrahimi-Barough, S., Ai, J. (2014). Enhancing neuronal growth from human endometrial stem cells derived neuron-like cells in three-dimensional fibrin gel for nerve tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 102(8):2533-43.
113. Noakes, D., Wallace, L., Smith, G. (1991). Bacterial flora of the uterus of cows after calving on two hygienically contrasting farms. *Vet Rec.* 128(19):440-2.
114. Noseir, W. (2003). Ovarian follicular activity and hormonal profile during estrous cycle in cows: the development of 2 versus 3 waves. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:50.
115. Ohlstein, B., Kai, T., Decotto, E., Spradling, A. (2004). The stem cell niche : theme and variations. *Curr Opin Cell Biol.* 16(6):693-9.
116. Ohtani, S., Okuda, K., Nishimura, K., Mohri, S. (1993). Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology.* 39(5):1033-1042.
117. Okano, A., Tomizuka, T. (1996). Post partum Uterine Involution in the Cow. *Theriogenology.* 27(2):369-76.
118. Ono, M., Kajitani, T., Uchida, H., Arase, T., Oda, H., Nishikawa-Uchida, S., Maruyama, T. (2010). OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. *Hum Reprod.* 25(8):2059-67.
119. Overman, J., Farré-Guasch, E., Helder, M., ten Bruggenkate, C. M., Schulten, E. A. J. M., & Klein-Nulend, J. (2013). Short (15 minutes) bone morphogenetic protein-2 treatment stimulates osteogenic differentiation of human adipose stem cells seeded on calcium phosphate scaffolds in vitro. *Tissue Eng Part A.* 19(3-4):571-81.
120. Pacchiarotti, A., Caserta, D., Sbracia, M., Moscarini, M. (2011). Expression of oct-4 and c-kit antigens in endometriosis. *Fertil Steril.* 95(3):1171-3.
121. Padykula, H., Coles, L., McCracken J., King, N., Longcope, C., Kaiserman-Abramof, I. 1984. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus endometrium during the estrogen surge. *Biol Reprod.* 31(5):1103–1118.

122. Padykula, H., Coles, L., Okulicz, W. (1989). The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod.* 40(3):681–690.
123. Park, J., Daheron, L., Kantarci, S., Lee, B., Teixeira, J. (2011). Human endometrial cells express elevated levels of pluripotent factors and are more amenable to reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Endocrinology.* 152(3):1080-9.
124. Patel, A., Park, E., Kuzman, M., Benetti, F, Silva, F., Allickson, J. (2008). Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant.* 17(3):303-11.
125. Prianishnikov, V. (1978). On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception* 18(3):213–223.
126. Ratajczak, M., Liu, R., Ratajczak, J., Kucia, M., Shin, D. (2011). The role of pluripotent embryonic-like stem cells residing in adult tissues in regeneration and longevity. *Differentiation.* 81(3):153-61.
127. Riaño, N., Vera, V., Villamil, L. (2007). Las células madre mesenquimales desde la perspectiva de las ciencias veterinarias. *Revista de Medicina Veterinaria Universidad de La Salle.* 13:19-26.
128. Rivadeneira, V. (2013). Ciclo estral bovino. *Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.*
129. Rolf, H., Niebert, S., Niebert, M., Gaus, L., Schliephake, H., Gu, K. (2012). Intercellular Transport of Oct4 in Mammalian Cells : A Basic Principle to Expand a Stem Cell Niche?, *PLoS One.* 7(2):e32287.
130. Ross, M., Pawlina, W., Negrete, J. (2007). *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular.* 5ª Edición, Edición Médica Panamericana, Madrid.
131. Rossi, B., Merlo, B., Colleoni, S., Iacono, E. (2014). Isolation and in Vitro Characterization of Bovine Amniotic Fluid Derived Stem Cells at Different Trimesters of Pregnancy. *Stem Cell Rev.* 10(5):712-24.
132. Sakumoto R., Berisha, B., Kawate, N., Schams, D., Okuda, K. (2000). Tumor necrosis factor-alpha and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. *Biol Reprod.* 62(1):192-9.
133. Salamonsen, L. (2003). Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction,* 125(3): 301–11.

134. Santamaria, X., Massasa, E., Feng, Y., Wolff, E., Taylor, H. (2011). Derivation of insulin producing cells from human endometrial stromal stem cells and use in the treatment of murine diabetes. *Mol Ther.* 19(11):2065-71.
135. Scadden, D. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 441(7097):1075-9.
136. Schüring, A., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L., Götte, M. 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil Steril.* 95(1):423-6.
137. Schwab, K., Gargett, C. (2007). Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod.* 22(11):2903-11.
138. Schwab, K., Hons, B., Wah, R., Chan, S., Hons, B., Gargett, C. (2005). Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril.* 84 Suppl 2:1124-30.
139. Schwab, K., Hutchinson, P., Gargett, C. (2008). Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod.* 23(4):934-43.
140. Sethe, S., Scutt, A., Stolzing, A. (2006). Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 5(1):91-116.
141. Sheldon, I., Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Anim Reprod Sci.* 82-83:295-306.
142. Sheldon, I., Lewis, G., LeBlanc, S., Gilbert, R. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* 65(8):1516-1530.
143. Sheldon, I., Williams, E., Miller, A., Nash, D., Herath, S. (2008). Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J.* 176(1):115-21.
144. Singh, J., Adams, G., Pierson, R. (2003). Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. *Anim Reprod Sci.* 78(3-4):371-99.
145. Singh, J., Singla, P., Dhaliwal, G., Kumar, A., Banga, H. (2008). Histomorphological alterations in uterus of repeat breeding cows with subclinical endometritis following E. coli lipopolysaccharide and autologous serum therapy. *Indian J Anim Sci.* 78(7):710-713.
146. Slama, H., Vaillancourt, D., Goff, A. (1991). Pathophysiology of the puerperal period: Relationship between prostaglandin E₂ (PGE₂) and uterine involution in the cow. *Theriogenology.* 36(6):1071-1090.

147. Slayden, O., Brenner, R. (2004). Hormonal regulation and localization of estrogen, progesterin and androgen receptors in the endometrium of nonhuman primates: effects of progesterone receptor antagonists. *Arch Histol Cytol.* 67(5):393-409.
148. Snyder, E., Loring, J. (2005). A Role for Stem Cell Biology in the Physiological and Pathological Aspects of Aging. *J Am Geriatr Soc.* 53(9 Suppl):S287-91.
149. Spencer, T. (2004). Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. *Biol Reprod.* 71(1):2-10.
150. Spencer, T., Dunlap, K., Filant, J. (2012). Comparative developmental biology of the uterus : Insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol.* 354(1-2):34-53.
151. Spencer, T., Hayashi, K., Hu, J., Carpenter, K. (2005). Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol.* 68:85-122.
152. Spitzer, T., Rojas, A., Zelenko, Z., Aghajanova, L., Erikson, D., Barragan, F., Meyer, M., Tamaresis, J., Hamilton, A., Irwin, J., Giudice, L. (2012). Perivascular human endometrial mesenchymal stem cells express pathways relevant to self-renewal, lineage specification, and functional phenotype. *Biol Reprod.* 86(2):58.
153. Stefanovic, S., Pucéat, M. (2010). L' octamanie Le double jeu de OCT4. *Med Sci (Paris).* 23(3): 411-416.
154. Štefková, K., Procházková, J., Pacherník, J. (2015). Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2015:628368.
155. Sternecker, J., Höing, S., Schöler, H. (2012). Concise review: Oct4 and more: The reprogramming expressway. *Stem Cells.* 30(1):15-21.
156. Stevenson, J. (2007). Clinical Reproductive Physiology of the Cow. En R. Youngquist, W. Threlfall (Eds.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (pp 258-270). United States of America: Elsevier Inc.
157. Stewart, M., Stewart, A. (2011). Mesenchymal stem cells: characteristics, sources, and mechanisms of action. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 27(2):243-61.
158. Sumer, H., Liu, J., Malaver-Ortega, L., Lim, M., Khodadadi, K., Verma, P. (2011). NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. *J Anim Sci.* 89(9):2708-16.

159. Szotek, P., Chang, H., Zhang, L., Preffer, F., Dombkowski, D., Donahoe, P., Teixeira, J. (2007). Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation. *Stem Cells*. 25(5):1317-25.
160. Tamadon, A., Mehrabani, D., Zarezadeh, Y., Rahmanifar, F., Dianatpour, M., Zare, S. (2017). Caprine Endometrial Mesenchymal Stromal Stem Cell: Multilineage Potential, Characterization, and Growth Kinetics in Breeding and Anestrous Stages. *Vet Med Int*. 2017:5052801.
161. Taylor, H. (2004). Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA*. 292(1):81-5.
162. Teixeira, J., Rueda, B., Pru, J. (2008). Uterine stem cells. *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute.
163. Tosh, D., Slack, J. (2002). How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(3):187-94.
164. Uduwela, A., Perera, M., Aiqing, L., Fraser, I. (2000). Endometrial-Myometrial Interface: Relationship to Adenomyosis and Changes in Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 55(6):390-400.
165. Vidal, M., Kilroy, G., Johnson, J., Lopez, M., Moore, R., Gimble, J. (2006). Cell growth characteristics and differentiation frequency of adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity. *Vet Surg*. 35(7):601-10.
166. Vogel, K., Sandy, J., Pog, B., Robbins, J. (1994). *Matrix Biol*. 14(2):171-9.
167. Wada-Hiraike, O., Hiraike, H., Okinaga, H., Imamov, O., Barros, R., Morani, A., Gustafsson, J.-åke. (2006). Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(48):18350-5.
168. Wagers, A. (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*. 10(4):362-369.
169. Wagers, A., Weissman, I. (2004). Plasticity of Adult Stem Cells. *Cell*. 116:639–648.
170. Wang, Y., Sacchetti, A., van Dijk, M., van der Zee, M., van der Horst, P., Joosten, R., Fodde, R. (2012). Identification of Quiescent , Stem-Like Cells in the Distal Female Reproductive Tract. *PLoS One*. 7(7):e40691.
171. Weissman, I. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 100(1):157-168.

172. Wen, J., Zhu, H., Leung, P. (2013). Gonadal steroids regulate the expression of aggrecanases in human endometrial stromal cells in vitro. *J Cell Mol Med.* 17(10):1325-34.
173. Wolff, E., Wolff, A., Du, H., Taylor, H. (2007). Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci.* 14(6):524-33.
174. Wood, C., Rogers, P. 1993. Pregnancy after planned partial endometrial resection. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 33:316-318.
175. Yin, Y., Ma, L. (2005). Development of the Mammalian Female Reproductive Tract. *J Biochem.* 137(6):677-83.
176. Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-kojima, E., Gonda, K. (2006). Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived From the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates. *J Cell Physiol.* 208(1):64-76.
177. Young, R. (2011). Control of the embryonic stem cell state. *Cell.* 144(6):940-954.
178. Zangrossi, S., Marabese, M., Broggin, M., Giordano, R., D'Erasmus, M., Montelatici, E. Lazzari, L. (2007). Oct-4 expression in adult human differentiated cells challenges its role as a pure stem cell marker. *Stem Cells.* 25(7):1675-1680.
179. Zhang, S., Kong, S., Lu, J., Wang, Q., Chen, Y., Wang, W., Wang, B., Wang, H. (2013). Deciphering the molecular basis of uterine receptivity. *Mol Reprod Dev.* 80(1):8-21.
180. Zhu, L., Pollard, J. (2007). Estradiol-17 beta regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(40):15847-51.