



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Expresión génica de células madre mesenquimales equinas: valoración de la inmunomodulación y la inmunogenicidad in vivo

Gene expression of equine mesenchymal stem cells: in vivo assessment of immunomodulation and immunogenicity

Autor/es

M<sup>a</sup> Belén Serrano Pastor

Director/es

Antonio Romero Lasheras  
Alina Cequier Soler

Facultad de Veterinaria

2022

---

## ÍNDICE

<b>1. Resumen/Abstract</b> .....	1
<b>2. Introducción</b> .....	3
2.1. Principales patologías del aparato locomotor.....	3
2.1.1. Osteoartritis .....	4
2.1.2. Investigación traslacional con la especie equina .....	5
2.2. Medicina regenerativa .....	6
2.2.1. Productos ortobiológicos .....	6
2.2.1.1. Células madre mesenquimales.....	7
2.2.1.1.1. Caracterización de las MSCs.....	7
2.2.1.1.2. Mecanismos de acción terapéutica de las MSCs .....	8
2.2.1.1.2.1. Inmunomodulación.....	8
2.2.1.1.3. Inmunogenicidad.....	9
2.2.1.1.4. Equilibrio inmunogenicidad-inmunomodulación.....	11
<b>3. Justificación y objetivos</b> .....	12
<b>4. Metodología</b> .....	13
4.1. Grupos de animales.....	13
4.2. Extracción, aislamiento y cultivo de MSCs .....	14
4.3. Fabricación de los implantes .....	14
4.4. Colocación y retirada de los implantes .....	15
4.5. Extracción de ácido ribonucleico mensajero .....	16
4.6. Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) .....	17
4.7. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real .....	17
4.8. Análisis de los datos .....	19
4.9. Análisis estadístico .....	19
<b>5. Resultados y discusión</b> .....	20
5.1. Influencia del tipo de MSCs.....	21
5.2. Influencia de la compatibilidad .....	27
5.3. Cambios en las MSCs equinas a lo largo del tiempo de exposición <i>in vivo</i> .....	29
<b>6. Conclusiones/Conclusions</b> .....	31
<b>7. Valoración personal</b> .....	33
<b>8. Bibliografía</b> .....	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diseño experimental. ....	13
<b>Figura 2.</b> Diseño y colocación de los implantes. ....	15

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grupos de animales y tipos de MSCs recibidas. ....	14
<b>Tabla 2.</b> Cebadores empleados en la RT-qPCR para analizar la expresión génica. ....	18
<b>Tabla 3.</b> Resultados de la expresión de los genes inmunomoduladores e inmunogénicos en los implantes. ....	21

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Expresión relativa de <i>COX2</i> entre MSCs en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible. ....	22
<b>Gráfica 2.</b> Expresión relativa de <i>IDO1</i> entre MSCs en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible. ....	23
<b>Gráfica 3.</b> Expresión relativa de <i>IL6</i> e <i>iNOS2</i> entre MSCs en el grupo MHC-compatible. ....	24
<b>Gráfica 4.</b> Expresión relativa de <i>VCAM1</i> entre MSCs en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible. ....	24
<b>Gráfica 5.</b> Expresión relativa de <i>CD40</i> (A) y <i>CD80</i> (B) entre MSCs en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible. ....	26
<b>Gráfica 6.</b> Expresión relativa de <i>MHC-II</i> entre MSCs en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible. ....	26
<b>Gráfica 7.</b> Expresión relativa de MSC-C (A) y MSC-SE (B) entre grupos. ....	28
<b>Gráfica 8.</b> Expresión relativa de <i>VCAM1</i> (A), <i>MHC-I</i> (B) y <i>MHC-II</i> (C) a lo largo del tiempo en las MSC-SE en el grupo MHC-compatible. ....	30

### 1. Resumen

Las terapias biológicas avanzadas, como las células madre mesenquimales (MSCs), resultan muy atractivas para el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas en la especie equina, especialmente su administración alogénica. Sin embargo, el tratamiento alogénico con MSCs requiere conocer sus interacciones con el sistema inmune del caballo y poco se conoce sobre qué les sucede a las MSCs *in vivo*. Por ello, el objetivo de este trabajo es evaluar el perfil inmunomodulador e inmunogénico de las MSCs equinas tras ser expuestas al sistema inmune del caballo.

Se administraron MSCs alogénicas sin manipular (MSC-SE), estimuladas con citoquinas proinflamatorias (MSC-E) o diferenciadas a condrocitos (MSC-C) en caballos compatibles o incompatibles para el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) equino. Para ello, las MSCs se encapsularon en geles de alginato y se implantaron subcutáneamente, permitiendo recuperarlas a distintos tiempos para valorar su expresión génica mediante RT-qPCR. El procedimiento se repitió en los mismos animales para valorar el efecto inmunogénico e inmunomodulador de una segunda administración.

Dentro de los tres tipos celulares estudiados, las MSC-C fueron las más inmunomoduladoras y podrían administrarse de forma MHC-incompatible, ya que en esta condición no aumentó su perfil inmunogénico. Por el contrario, en las MSC-SE administradas en los grupos MHC-incompatibles se observó un mayor perfil inmunogénico y un menor perfil inmunomodulador. Por ello, se recomendaría que para su administración se buscaran donantes MHC-compatibles con el paciente. Sin embargo, una segunda administración parece que solo afectaría a las MSC-SE de forma variable sobre sus marcadores inmunogénicos. Las MSC-E mostraron menor perfil inmunomodulador y mayor inmunogénico, contrariamente a lo descrito *in vitro*. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los estudios *in vivo* son necesarios para dilucidar las complejas interacciones entre las MSCs y el sistema inmunitario receptor, lo que resulta fundamental para desarrollar terapias celulares más seguras y eficaces.

### 1. Abstract

Advanced biological therapies, such as mesenchymal stem cells (MSCs), are very attractive for the treatment of musculoskeletal injuries in the equine species, especially their allogeneic administration. However, while allogeneic treatment with MSCs requires knowledge of their interactions with the equine immune system, little is known about what happens to MSCs *in vivo*. Therefore, the aim of this work is to evaluate the immunomodulatory and immunogenic profiles of equine MSCs after their exposure to the immune system of the horse.

Unstimulated MSCs (MSC-SE), MSCs stimulated with proinflammatory cytokines (MSC-E) or differentiated to chondrocytes (MSC-C) were allogeneically administered to horses matched or mismatched for the equine major histocompatibility complex (MHC). For this purpose, MSCs were encapsulated in alginates scaffolds and implanted subcutaneously to allow their recovery at different times to assess their gene expression by RT-qPCR. The procedure was repeated in the same animals to assess the effect of a second administration on equine MSC immune profile. Among the three types of cells studied, MSC-C presented the most immunomodulatory profile and their MHC-mismatched administration would be feasible as their immunogenic profile did not increase in this condition. In contrast, MHC-mismatched MSC-SE showed higher immunogenic and lower immunomodulatory profiles. Therefore, it would be recommended that MHC-matched donors should be sought for MSC-SE administration. Furthermore, only MSC-SE seem to be affected after a second administration, showing a variable expression of their immunogenic markers. Finally, MSC-E showed a lower immunomodulatory and higher immunogenic profile, contrary to what has been previously described *in vitro*. Thus, the results obtained in this work demonstrate that *in vivo* studies are needed to elucidate the complex interactions between MSCs and the patient's immune system, which is essential to develop safer and more effective cell therapies.

### 2. Introducción

Antiguamente el caballo se consideraba una herramienta de trabajo, ayudando en las tareas del campo y en los trabajos de fuerza. Sin embargo, hoy en día se considera un animal de compañía e incluso un atleta profesional participando en multitud de disciplinas, algunas de ellas de carácter olímpico (Doma Clásica, Salto de Obstáculos y Concurso Completo) (Real Federación Hípica Española, 2022). Actualmente, se encuentran censados más de 644.197 ejemplares y 196.206 explotaciones distribuidas a lo largo de todo el territorio español (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2021). Por ello el sector equino tiene un impacto económico en España superior a los 5.777 millones de euros, lo que representa un 0,59% del producto interior bruto (PIB) (Deloitte, 2022). Dada la importancia del caballo en las diferentes disciplinas deportivas, el tratamiento de las patologías que afectan a su sistema musculoesquelético y provocan una disminución del rendimiento, supone un reto de especial relevancia para la profesión veterinaria.

En los últimos años, debido a la limitada capacidad de reparación de los tejidos implicados en las lesiones musculoesqueléticas como son los tendones, ligamentos y el cartílago articular, han cobrado especial relevancia las terapias biológicas avanzadas (Stewart y Stewart, 2011), más conocidas como medicina regenerativa, entre las que destaca la aplicación de células madre. El objetivo principal de estos tratamientos es mejorar la reparación de estos tejidos y que su funcionalidad sea lo más parecida posible a la original, puesto que los tratamientos convencionales no alcanzan un resultado óptimo e implican tiempos largos de recuperación y altas tasas de recidivas (Ortved, 2018).

Numerosos estudios han demostrado que para la reparación de estos tejidos, la administración de células madre mesenquimales (MSCs de sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*) tanto autólogas como alogénicas es de gran utilidad, obteniendo resultados prometedores (Berg *et al.*, 2009; Schnabel *et al.*, 2013). Sin embargo, aún hay controversia en lo relativo a su efectividad y seguridad debido a que en algunos estudios se ha observado que su uso repetido puede conllevar efectos negativos, lo que podría relacionarse con un rechazo inmunomediado hacia las mismas (Van Hecke *et al.*, 2021).

#### 2.1. Principales patologías del aparato locomotor

Las claudicaciones o cojeras en caballos de deporte suponen la causa principal de asistencia veterinaria en la medicina deportiva equina (Murray *et al.*, 2010), teniendo como consecuencia una pérdida de rendimiento y una disminución de la vida deportiva (Ramzan y Palmer, 2011; Bertuglia *et al.*, 2014). Según un estudio elaborado por Torricelli *et al.*, 2011 en caballos de carreras, la principal causa de disminución de rendimiento deportivo en el 82% de los animales

correspondía con patologías del sistema locomotor. En la mayoría de las disciplinas, las lesiones articulares y las que afectan a los ligamentos y tendones son las más importantes desde el punto de vista clínico. Esto se debe principalmente a la limitada capacidad de reparación de estos tejidos, en gran parte debido a la escasa vascularización que poseen, lo que predispone a la cronicidad de estas lesiones y a las recaídas (van Weeren y Back, 2016). Además, el tejido cicatricial formado posee unas características biomecánicas inferiores a las del tejido original, formándose un tejido más débil y menos elástico, lo que le hace más propenso a las recaídas clínicas (Voleti, Buckley y Soslowsky, 2012).

El impacto económico de las lesiones del aparato locomotor es muy elevado. Además de los costes directos que suponen los tratamientos veterinarios, están los costes indirectos debido a la incapacidad para competir y a los largos tiempos de recuperación. Por otro lado, cabe destacar la pérdida de bienestar animal que conllevan todas estas lesiones, sobre todo las crónicas, como la osteoartritis (OA).

Los caballos de deporte tienen predisposición a lesiones específicas dependiendo de la disciplina que realizan y a las estructuras anatómicas que se encuentran más comprometidas en cada ejercicio. Así, por ejemplo, los que realizan Concurso Completo, Salto de Élite y Doma Clásica poseen mayor riesgo de padecer lesiones en tendones y ligamentos (Murray *et al.*, 2006) mientras que en los caballos de carreras el principal problema locomotor es la predisposición a las osteoartritis postraumáticas (Engiles *et al.*, 2017). En el caso de caballos de avanzada edad, la osteoartritis y la laminitis crónica son las patologías más comunes, siendo crucial el manejo del dolor para garantizar una buena calidad de vida (van Weeren y Back, 2016).

### 2.1.1. Osteoartritis

La osteoartritis (OA) o enfermedad degenerativa articular es una patología multifactorial y compleja caracterizada por la degeneración progresiva del cartílago y la inflamación sinovial, que afecta a la articulación en conjunto debido a la asociación física y funcional de todos los tejidos articulares (Loeser *et al.*, 2012).

Los mediadores inflamatorios como las prostaglandinas y las citoquinas juegan un papel fundamental en el inicio y progreso de la OA debido al efecto deletéreo sobre el cartílago, el hueso y la membrana sinovial. Estos mediadores activan enzimas degradativas de la matriz extracelular y los productos del catabolismo incrementan la inflamación, generando una retroalimentación positiva. La inflamación que se genera agrava la OA al promover la cascada de liberación de mediadores inflamatorios junto a la limitada capacidad del cartílago articular adulto para repararse. La fuente de dichos mediadores puede ser local, a partir de las células

articulares, o sistémica, a partir de otros tejidos como por ejemplo el adiposo (Berenbaum, 2013).

En humana la OA primaria es la más común y la edad avanzada, los daños mecánicos, la genética, la disfunción metabólica y la obesidad son ejemplos de factores de riesgo asociados a su aparición al provocar esa cascada fisiopatológica de liberación de mediadores inflamatorios que provocan daños articulares (Berenbaum, 2013). Sin embargo, en la especie equina no está tan establecida la asociación de estos factores con la aparición de OA y la presentación más común es la OA secundaria en animales jóvenes y en periodo de competición normalmente como consecuencia de traumatismos durante su actividad deportiva (Engiles *et al.*, 2017). Aun así, la prevalencia de osteoartritis en caballos mayores de 15 años es superior al 50%, y esta cifra alcanza valores del 80-90% si se trata de caballos con más de 30 años (van Weeren y Back, 2016). Debido al importante papel que juega la inflamación en la patogenia de la OA, actualmente, su tratamiento se basa en una combinación de antiinflamatorios y el empleo de otras sustancias que mejoran el ambiente inflamatorio y catabólico articular. El uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) a nivel sistémico, así como de esteroides intraarticulares, es la medida terapéutica más frecuente en el tratamiento de esta patología (Goodrich y Nixon, 2006). Por otro lado, para mejorar la viscoelasticidad del líquido articular y modular la respuesta quimiotáctica, es frecuente utilizar ácido hialurónico a nivel intraarticular junto a la administración oral de glucosaminoglucanos, glucosamina y condroitín sulfato (Goodrich y Nixon, 2006). Este tratamiento médico se puede complementar con herraje, fisioterapia y régimen de ejercicio (van Weeren y Back, 2016).

Sin embargo, todos esos tratamientos son paliativos y tienen un efecto limitado sobre la degeneración progresiva del cartílago articular. Su objetivo es controlar el dolor y favorecer la movilidad para mejorar la calidad de vida del animal, pero no consiguen detener la progresión de la enfermedad ni promover una reparación de calidad del tejido articular.

### 2.1.2. Investigación traslacional con la especie equina

Además de su importancia como paciente, el caballo tiene un gran valor como modelo animal para la traslación de resultados a medicina humana por la similitud respecto a fisis-patogenia y biomecánica entre las enfermedades locomotoras equinas y humanas (Colbath *et al.*, 2017b). Además, el caballo no se considera únicamente modelo de estas enfermedades, sino que se ha demostrado que puede utilizarse como modelo animal para el tratamiento de diferentes patologías oftalmológicas, reproductivas y respiratorias, entre otras (Cequier *et al.*, 2021). Esto se alinea con el concepto de “*One Health, One Medicine*” promovido por la Organización Mundial de la Salud y que defiende que la salud humana, animal y ambiental constituyen un

único sistema que requiere de un avance conjunto (Fortier *et al.*, 2020). Aunque deben realizarse más estudios sobre estas enfermedades, el rápido avance conseguido en la especie equina en lo que respecta a la medicina regenerativa la convierte en idónea para la investigación traslacional (Ribitsch *et al.*, 2020).

### 2.2. Medicina regenerativa

La medicina regenerativa es una rama emergente de la medicina que tiene como objetivo restaurar o reestablecer la estructura y función normal de un órgano o tejido, que se ha perdido como consecuencia de una enfermedad, lesión, degeneración asociada a la edad o defectos congénitos (Mao y Mooney, 2015; Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). La medicina regenerativa abarca la ingeniería de tejidos, la terapia génica y la terapia celular somática, así como las combinaciones entre los diferentes tipos (Reglamento (CE) nº 1394/2007; Directiva 2001/83/CE). Es importante destacar que el concepto de reparación es distinto del de regeneración, ya que la reparación conduce a la restauración de la continuidad interrumpida sintetizando un tejido cicatricial con distintas características al tejido original. Por el contrario, la regeneración restaura esa continuidad interrumpida mediante la síntesis de tejidos u órganos con las mismas propiedades que el original (Mason y Dunnill, 2008). Durante las últimas dos décadas ha habido grandes avances en esta materia, estando cada día más cerca de conseguir el objetivo de establecer terapias verdaderamente regenerativas. Sin embargo, y debido precisamente a ese mayor conocimiento de los nuevos productos terapéuticos y sus mecanismos de acción, a día de hoy, el objetivo de estos productos no es tanto conseguir una regeneración real extrínseca sino promover los propios mecanismos de reparación del organismo para fomentar una mejor reparación intrínseca. Por ello, en la actualidad se está utilizando más el concepto de terapias biológicas avanzadas y no tanto el de medicina regenerativa (Glotzbach *et al.*, 2011).

#### 2.2.1. Productos ortobiológicos

Cuando los materiales biológicos o las tecnologías diseñadas con el fin de promover la reparación están enfocados a los tejidos musculoesqueléticos, dichos productos se acuñan con el nombre de ortobiológicos (Kruel *et al.*, 2021). Entre los productos ortobiológicos más empleados en la clínica equina para el tratamiento de patologías del aparato locomotor están las MSCs, el suero autólogo condicionado, la solución proteica autóloga y el plasma rico en plaquetas. Estos tres últimos se componen de derivados sanguíneos autólogos (proviene del mismo paciente) mínimamente manipulados (Ribitsch, Oreff y Jenner, 2021). En cambio, la administración de MSCs es más compleja y puede realizarse de forma autóloga pero también

alógena, obteniendo las células de otro individuo de la misma especie que actúe como donante (Berglund *et al.*, 2017).

### 2.2.1.1. Células madre mesenquimales

Las MSCs son células multipotentes adultas procedentes del mesodermo que se caracterizan principalmente por la capacidad para diferenciarse en diversos tipos celulares de su mismo linaje como por ejemplo osteoblastos, condrocitos, adipocitos y tenocitos (Kolios y Moodley, 2012). Las MSCs están presentes en gran variedad de órganos y tejidos, a partir de los cuales pueden aislarse (Stewart y Stewart, 2011). De especial interés resultan las derivadas de la sangre periférica y de los tejidos perinatales por obtenerse a partir de procedimientos no invasivos, aunque a día de hoy las más empleadas en caballos son las procedentes del tejido adiposo (AT-MSCs) y de la médula ósea (BM-MSCs) (Barrachina *et al.*, 2018c). Normalmente las AT-MSCs se aíslan del tejido subcutáneo de la región supraglútea mientras que las BM-MSCs se obtienen del esternón o del ilion mediante el empleo de una aguja Jamshidi (Bastos *et al.*, 2017).

#### 2.2.1.1.1. Caracterización de las MSCs

La *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), con el objetivo de estandarización y para facilitar la comparación de los estudios realizados en MSCs, propuso los criterios que las MSCs humanas debían cumplir para ser consideradas MSCs (Dominici *et al.*, 2006): deben ser adherentes al plástico del sistema de cultivo, expresar o carecer de determinados marcadores de superficie (inmunofenotipo) y ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*.

Sin embargo, se ha observado que estas características, especialmente el inmunofenotipo, pueden ser variables y a día de hoy no se dispone de criterios uniformes para caracterizar las MSCs de distintas especies animales, y en particular las MSCs equinas. La limitada disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos en medicina veterinaria dificulta la posibilidad de establecer el inmunofenotipo de las MSCs en algunas especies. Por esa razón, para completar el estudio de los marcadores de las MSCs equinas, además de emplear la citometría de flujo, la expresión génica de estos marcadores puede ser valorada mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) (De Schauwer *et al.*, 2011). Aunque la expresión génica puede no reflejar directamente la expresión de superficie y es más difícil de cuantificar, su combinación con el estudio del inmunofenotipo puede facilitar la caracterización de las MSCs equinas (Ranera *et al.*, 2011).

Por citometría de flujo se ha podido observar que las MSCs equinas expresan algunos de los marcadores establecidos por la ISCT (Iacono *et al.*, 2015), aunque se ha detectado variabilidad en la expresión génica según los tejidos de origen (Ranera *et al.*, 2011). A pesar de que no hay

unos estándares claros para el inmunofenotipo de las MSCs equinas, estas células sí cumplen homogéneamente con los criterios de adherencia al plástico y multipotencia.

### 2.2.1.1.2. Mecanismos de acción terapéutica de las MSCs

Los principales mecanismos de acción terapéutica de las MSCs se atribuyen, por un lado, a su capacidad de migración, integración y diferenciación y, por otro, a su acción paracrina. Inicialmente se atribuyó a la capacidad de diferenciación de las MSCs la base de su acción terapéutica para la reparación y la regeneración de los tejidos musculoesqueléticos. Sin embargo, se ha comprobado que al contrario de lo que se planteó inicialmente, las MSCs no necesitan integrarse o diferenciarse en células de un tejido concreto para ejercer sus acciones terapéuticas (Stewart y Stewart, 2011). Actualmente, aunque se sigue considerando que los mecanismos de integración y diferenciación participan en la acción terapéutica de las MSCs, ésta se atribuye principalmente a la reparación tisular y al mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune que ejercen mediante su acción paracrina (Stewart y Stewart, 2011).

Los efectos paracrinos, a su vez, se pueden dividir en anti-fibróticos, quimioatrayentes, inmunomoduladores y tróficos. Los factores solubles responsables de esos efectos tróficos tienen además otra subdivisión y pueden ser: antiapoptóticos, antioxidantes, de soporte (estimulando la mitosis, la proliferación y la diferenciación de precursores) y angiogénicos (Liang *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2020).

#### 2.2.1.1.2.1. Inmunomodulación

Respecto a la capacidad inmunomoduladora de las MSCs, se han descrito gran cantidad de mediadores relacionados con la actividad paracrina de las MSCs, con variación respecto a la especie y al tejido de origen de las MSCs (Ren *et al.*, 2008). Su mecanismo de acción se centra en modular la proliferación, la diferenciación, la migración y la apoptosis de distintas células inmunes (Ding, Shyu y Lin, 2011; Ma *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2022). Actualmente se están llevando a cabo diferentes estudios valorando cuáles son las principales moléculas implicadas en la capacidad inmunomoduladora de las MSCs equinas. Las moléculas interleuquina 6 (IL6) y prostaglandina E2 (PGE-2), cuya producción está regulada por la ciclooxigenasa 2 (COX2), parecen ser las principales responsables de la inhibición de la proliferación de linfocitos equinos mediada por las MSC equinas (Carrade Holt *et al.*, 2014; Remacha *et al.*, 2015; Colbath *et al.*, 2017a; Caffi *et al.*, 2020). Además, tras el co-cultivo *in vitro* de linfocitos con MSCs se ha observado que el aumento de IL6 conlleva una inmunosupresión más eficiente de los linfocitos B (Foo *et al.*, 2021; Alvites *et al.*, 2022). Además, en un estado inflamatorio, el incremento de la actividad enzimática de indoleamina 2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) promueve la diferenciación de los

linfocitos T reguladores ejerciendo de este modo un mayor efecto inmunosupresor (Kondělková *et al.*, 2010; Munn y Mellor, 2016).

Además de su acción paracrina las MSCs también pueden regular el ambiente inflamatorio mediante contacto directo con células inmunes, interviniendo en el proceso moléculas de adhesión (Fan *et al.*, 2020). El aumento de expresión de la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1) en las MSCs está relacionado también con su capacidad de migración y en su posterior capacidad inmunomoduladora (Ma *et al.*, 2014). Este mecanismo de migración resulta muy importante para el reclutamiento de las MSCs a las regiones lesionadas para facilitar la reparación de ese tejido dañado (Barrachina *et al.*, 2016b).

En diferentes estudios se ha observado cómo la exposición de las MSCs a un ambiente inflamatorio mediante citoquinas proinflamatorias puede aumentar sus propiedades inmunomoduladoras al aumentar la expresión de estas moléculas. En el caso de IL6, COX2, IDO1, sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS2) y VCAM1 su expresión aumenta tras la exposición de las MSCs a citoquinas pro-inflamatorias como el interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) mejorando el efecto inhibitorio de la proliferación de linfocitos por parte de las MSCs (Ren *et al.*, 2008; Barrachina *et al.*, 2017; Caffi *et al.*, 2020). El estudio de moléculas inducibles mediante citoquinas inflamatorias como iNOS2 resulta también muy interesante con el objetivo de potenciar el efecto inmunorregulador de las MSCs equinas (Su *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2022). Además, el contacto celular también se ve incrementado al exponer las MSCs a un ambiente inflamatorio (Ma *et al.*, 2014).

En general, se considera que todas estas moléculas tienen efectos sobre el sistema inmune y por ello, dependiendo de su nivel de expresión, las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs serán mayores o menores, lo que puede repercutir en su efectividad terapéutica.

### 2.2.1.1.3. Inmunogenicidad

Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de MSCs puede ser alogénica, obteniendo las células a partir de un donante. La terapia alogénica resulta muy atractiva para su aplicación clínica, ya que no es necesario esperar al cultivo de las células y permite administrar el tratamiento de forma temprana (Berglund *et al.*, 2017). Sin embargo, hay que considerar que la generación de respuesta inmune tras la administración de terapias derivadas de fuentes biológicas alogénicas representa un gran obstáculo en el desarrollo de este tipo de tratamientos (Sethu *et al.*, 2012).

Hasta hace unos años se consideraba que las MSCs eran inmunoprivilegiadas y, por consiguiente, que la terapia alogénica era igual de segura que la autóloga y no se generarían efectos adversos por el reconocimiento inmune de las células (Ankrum, Ong y Karp, 2014; Berglund *et al.*, 2017).

Sin embargo, diversos estudios han ido demostrando que este concepto no era correcto y a día de hoy las MSCs se consideran inmunoevasivas, pero no inmunoprivilegiadas (Ankrum, Ong y Karp, 2014). Esta nueva etiqueta se basa en la capacidad de las MSCs para regular la respuesta inmune, comentada anteriormente, y también en que serían menos inmunogénicas que otras células por su expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Tras varios estudios contradictorios sobre la presencia de marcadores MHC en la superficie de las MSC equinas, se ha concluido que la expresión del *MHC-I* y *MHC-II* es variable entre animales y entre tejidos de origen (De Schauwer *et al.*, 2014), y además dicha expresión puede variar dependiendo del ambiente en que se encuentren las MSCs.

Tanto estudios *in vitro* como *in vivo* han demostrado que las MSCs que expresan altos niveles de *MHC-II* estimulan la generación de una respuesta inmune. En cambio, cuando la expresión es baja, las MSCs pueden pasar desapercibidas y no inducir respuesta inmune en el receptor (Schnabel *et al.*, 2014; Broeckx *et al.*, 2019). Recientemente se ha valorado la importancia de la compatibilidad para el MHC entre donante y receptor y diversos estudios describen la generación de memoria inmunológica frente a las moléculas del MHC, que puede repercutir en la administración repetida de MSCs en diferentes especies (Berglund *et al.*, 2017). En la especie equina, se ha observado que la administración repetida de MSCs alogénicas MHC-incompatibles da lugar a una respuesta inmunitaria adaptativa, inflamación local y una menor acción terapéutica de las MSCs (Rowland *et al.*, 2021).

Además del MHC, moléculas como CD40 y CD80 están muy relacionadas con el perfil inmunogénico de las MSCs pudiendo desarrollar un papel muy importante en el rechazo inmunológico. Ambas moléculas actúan como activadores del sistema inmunitario promoviendo la estimulación de los linfocitos T y la aparición de linfocitos B de memoria (Lee, Jung y Kim, 2021). En las MSCs equinas se ha observado una expresión de moderada a fuerte de las moléculas coestimuladoras CD40 y CD80, dependiendo del tejido de origen (De Schauwer *et al.*, 2014).

Por todo ello, es importante preservar una baja inmunogenicidad de las MSCs para poder realizar terapias alogénicas y evitar el reconocimiento inmune por parte del receptor (Barrachina *et al.*, 2016b). Además, la compatibilidad para el MHC entre donante y receptor podría interferir en el efecto terapéutico deseado ya que se ha observado que la administración de MSCs alogénicas frente a autólogas influye sobre la eficacia del tratamiento (Berglund *et al.*, 2017). De esta forma, las propiedades inmunes de las MSCs juegan un papel central en la eficacia y seguridad de la terapia.

### 2.2.1.1.4. Equilibrio inmunogenicidad-inmunomodulación

Tras la revisión de las propiedades inmunomoduladoras e inmunogénicas de las MSCs resulta fundamental definir qué factores influyen sobre cada una para poder aumentar el potencial terapéutico y reducir el riesgo de aparición de efectos adversos o rechazo de las propias células, lo que repercutiría en su efectividad. Según Ankrum, Ong y Karp, 2014 la severidad del rechazo de las MSCs depende del equilibrio entre esas dos propiedades.

La estimulación con citoquinas proinflamatorias, la diferenciación, la compatibilidad para el MHC, el tejido de origen y la especie se han estudiado en diversas ocasiones como factores que afectan a la capacidad inmunomoduladora e inmunogénica de las MSCs (Barrachina *et al.*, 2018b; Broeckx *et al.*, 2019; Caffi *et al.*, 2020).

Aunque el ambiente inflamatorio supone un aumento de las propiedades inmunomoduladoras de las MSCs, también aumenta la expresión del *MHC-I* y *MHC-II* (Barrachina *et al.*, 2017). Sin embargo, tras realizar una segunda administración de MSCs estimuladas con citoquinas proinflamatorias, el aumento de sus propiedades inmunomoduladoras podría ayudarlas a regular más eficazmente la inflamación y a provocar una menor respuesta humoral (Barrachina *et al.*, 2020). Por otra parte, la expresión de estas moléculas tras la diferenciación de las MSCs a condrocito está siendo cada vez más estudiada con el objetivo de poder administrar ese tipo de MSCs en patologías articulares. Según (Ryan *et al.*, 2014), tras la diferenciación a condrocito de las MSCs equinas aumenta la expresión del MHC, la proliferación de los linfocitos B y además sus capacidades inmunomoduladoras se reducen respecto a las MSCs indiferenciadas. Sin embargo, en reciente estudios *in vitro* e *in vivo* en la especie equina no se observó ese aumento de la inmunogenicidad tras la diferenciación condrogénica de las MSCs al co-cultivarlas con linfocitos alogénicos MHC-incompatibles, aunque sus propiedades inmunomoduladoras siguen discutiéndose (Van Hecke *et al.*, 2021; Cequier *et al.*, 2022).

A nivel clínico, es deseable que las propiedades inmunomoduladoras sobrepasen al potencial inmunogénico de las MSCs. Sin embargo, los mecanismos exactos para conseguirlo no están definidos claramente y son necesarias nuevas investigaciones en este campo para esclarecer qué factores y de qué forma pueden modificar dicho equilibrio, como un paso imprescindible para que el rendimiento terapéutico sea el mayor posible. En caballos, se han estudiado *in vitro* las moléculas relacionadas con este equilibrio tanto a nivel de su expresión génica como de secreción por parte de las MSCs. Sin embargo, no se han estudiado estas propiedades *in vivo* tras la administración de MSCs equinas por la dificultad para recuperar las células una vez administradas en el animal. El uso de hidrogeles como el alginato se ha utilizado en diferentes estudios para inmovilizar células, como si se tratara de una matriz extracelular sintética (Ho *et al.*, 2022), y resulta una buena opción para encapsular en ellos las MSCs y así poder

recuperarlas para estudiarlas con detalle. Las células de los mamíferos no pueden interactuar con los polisacáridos del alginato, lo cual es ideal para que el hidrogel se mantenga íntegro y las MSCs se queden en el interior, pero además permite el paso de nutrientes y metabolitos del organismo a las células del interior y viceversa, lo que es idóneo para estudiar la interacción entre la respuesta inmune del animal y las MSCs (Watts, Ackerman-Yost y Nixon, 2013). Dicho estudio puede realizarse mediante el análisis de la expresión génica de las moléculas implicadas en el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad en las MSCs expuestas al sistema inmune del animal.

### 3. Justificación y objetivos

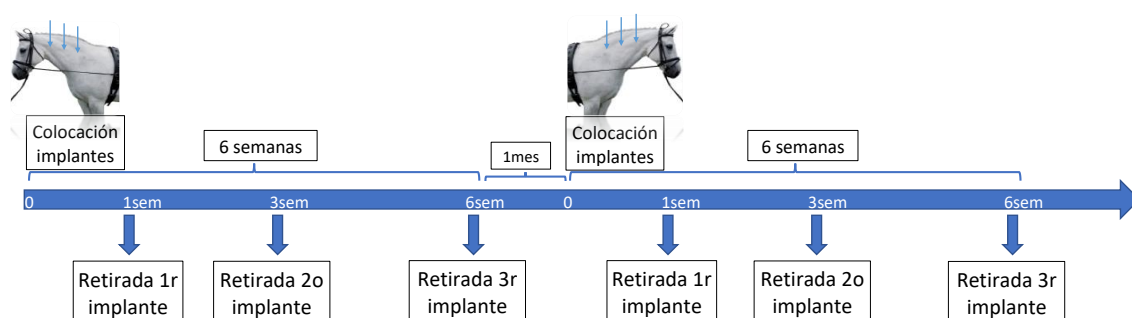
El empleo de la terapia celular alogénica supondría una gran ventaja para su aplicación en la clínica equina debido a la posibilidad de creación de bancos celulares, que permitiría disponer de MSCs bien caracterizadas para la administración temprana del tratamiento. Sin embargo, en la actualidad siguen sin estar claros todos los mecanismos de acción de las MSCs y éstas pueden ser rechazadas tras su administración alogénica, asociándose este rechazo a la incompatibilidad para el MHC entre donante y receptor. Además, diversos factores pueden influir sobre las propiedades inmunes de las MSCs, algunos aumentando sus propiedades inmunomoduladoras y otros, por el contrario, su capacidad inmunogénica. Las condiciones terapéuticas para lograr que prime la primera sobre la segunda no se conocen con exactitud, lo que en buena parte se debe a la dificultad de realizar estudios que esclarezcan qué sucede con las MSCs *in vivo*, principalmente por la dificultad que supone recuperarlas una vez aplicadas. Dicha limitación podría superarse encapsulando las MSCs equinas en un soporte que permita su recuperación y posterior estudio mediante análisis como la expresión génica.

Por todo lo expuesto, el objetivo general del presente Trabajo Fin de Grado (TFG) es evaluar el perfil inmunomodulador e inmunogénico de las MSCs equinas, mediante expresión génica, una vez han sido expuestas al sistema inmune del caballo, teniendo en cuenta los principales factores que pueden influir sobre el equilibrio entre ambas propiedades. Para lograr este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar los cambios en el perfil inmunomodulador e inmunogénico de las MSCs sin estimular, estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias y diferenciadas a condrocitos después de su administración *in vivo*.
- Valorar la influencia de la compatibilidad para el MHC entre donante y receptor sobre el perfil inmunomodulador e inmunogénico de las MSCs equinas.
- Evaluar los cambios en el perfil génico de las MSCs de las situaciones anteriores a lo largo del tiempo y tras una segunda administración.

### 4. Metodología

El diseño experimental realizado para este TFG consistió en el análisis de la expresión génica de diferentes moléculas relacionadas con la inmunomodulación e inmunogenicidad de las MSCs tras su administración *in vivo*. Para ello, las MSCs se encapsularon en geles de alginato y se colocaron tres implantes subcutáneos en las tablas del cuello de diferentes caballos. A la semana, tres semanas y seis semanas se recuperaron los implantes y, transcurrido un mes tras retirar el último, se repitió el mismo procedimiento a cada animal en las tablas del cuello contralaterales (**Figura 1**). En los implantes recuperados se analizó la expresión de determinados genes mediante RT-qPCR con el fin de valorar las propiedades inmunomoduladoras (*VCAM1*, *IL6*, *COX2*, *iNOS2* e *IDO1*), e inmunogénicas (*CD40*, *CD80*, *MHC-I* y *MHC-II*) de las MSCs.



**Figura 1.** Diseño experimental.

Este TFG es parte del proyecto de investigación “Optimización del uso de MSCs en patologías articulares en caballo: equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad” (AGL17-84411), concedido por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad en la convocatoria del año 2017 y realizado por el grupo LAGENBIO en la Universidad de Zaragoza dentro de su línea de investigación en terapias celulares veterinarias con aplicación a investigación traslacional. Para comprender mejor el contexto del TFG a continuación se describe brevemente parte del diseño del proyecto.





















#### 4.1. Grupos de animales

Los caballos que participaron en el estudio fueron seleccionados previamente por el grupo LAGENBIO según su haplotipo para el MHC equino con el objetivo de conformar grupos de animales compatibles e incompatibles para el mismo. Se analizaron 10 regiones de microsatélites intra-MHC mediante PCR multiplex según bibliografía previamente descrita (Sadeghi *et al.*, 2018). En total se seleccionaron 20 caballos de entre 2 y 12 años de edad para el estudio: 12 machos castrados, 7 hembras y 1 semental.

En primer lugar, se seleccionaron 3 animales homocigotos para determinados haplotipos para el MHC que fueron los donantes de MSCs del estudio. El resto de caballos se seleccionaron de manera que se pudieran formar dos grupos de receptores alogénicos: MHC-compatibles y MHC-

incompatibles respecto a los haplotipos de los donantes. Ambos grupos se dividieron a su vez en tres subgrupos de 2-3 caballos cada uno. Cada subgrupo recibió un tipo de MSCs: en condiciones basales sin estimular (MSC-SE), estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias (MSC-E) o diferenciadas a condrocito (MSC-C) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Grupos de animales y tipos de MSCs recibidas. Los haplotipos se asignaron de acuerdo con los haplotipos descritos por otros autores (Barrachina *et al.*, 2016a; Sadeghi *et al.*, 2018).

Donantes MSCs	Receptores alogénicos MHC-compatibles	Receptores alogénicos MHC-incompatibles
 D1 MSC-C	 R1 HapPRE10/HapPRE10-1  R2 HapPRE10/HapMAI06  R3 HapPRE10/HapPRE31	 X1 HapMai50/desconocido  X2 A3b/A3c  X3 Desconocido/desconocido
 D2 MSC-E	 A1 HapMAI04/HapPRE01  A2 HapMAI04/unknow	 Y1 COR71/desconocido  Y2 HapPRE09/COR182  Y3 HapPSL01/HapPSL01
 D3 MSC-SE	 C1 HapPRE11/desconocido  C2 HapPRE11/A2  C3 HapPRE11/HapPRE26	 Z1 HapPRE10/ZAR14  Z2 A9a/desconocido  Z3 A8/A10b

Todos los procedimientos en los que intervinieron los animales fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI-15/16).

#### 4.2. Extracción, aislamiento y cultivo de MSCs

Las MSCs se obtuvieron de la médula ósea del esternón de los 3 donantes y su aislamiento fue llevado a cabo por el grupo LAGENBIO. Fueron cultivadas a una temperatura de 37 °C, con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad relativa. El medio de MSCs empleado fue Dulbecco's Modified Eagle's Medium bajo en glucosa (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM del aminoácido L-glutamina, 0,1 mg/mL de estreptomicina y 100 U/mL de penicilina. Todos los suplementos empleados fueron de Sigma-Aldrich. Antes de iniciar los ensayos *in vivo*, estas MSCs se caracterizaron mediante expresión de marcadores y su capacidad de diferenciación en los tres linajes (Cequier *et al.*, 2022).

#### 4.3. Fabricación de los implantes

Para la construcción de cada implante, se mezcló 1 mL de una suspensión celular con 5·10<sup>6</sup> MSCs con 1 mL de una solución de alginato (NovaMatrix) al 3%. El alginato se polimerizó por inmersión en una solución estéril 102 mM de CaCl<sub>2</sub> durante 30 minutos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, siendo 2 mL el volumen final de cada implante.

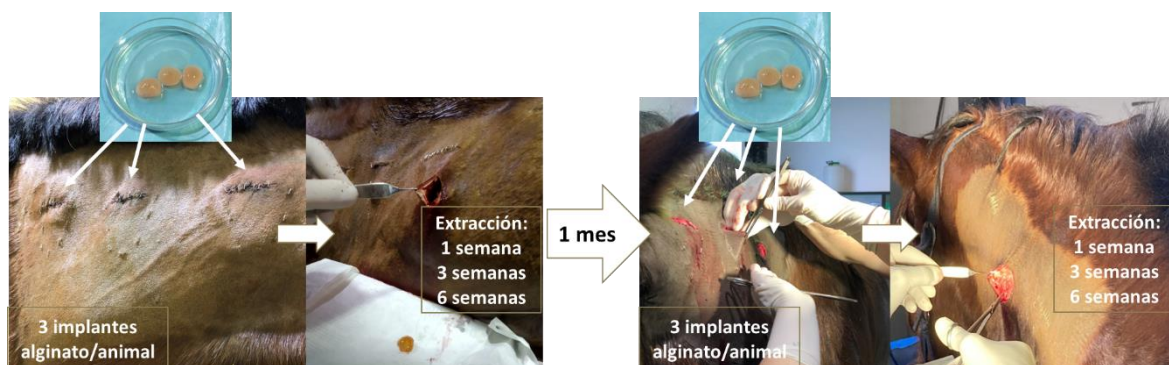
Los implantes de MSC-SE y MSC-E se cultivaron en el medio de cultivo de MSCs descrito anteriormente durante 48 horas. En los implantes de MSC-E, 12 horas antes de la colocación, se añadieron 5 ng/mL de cada una de las citoquinas pro-inflamatorias: TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (R&D Systems). Las condiciones de estimulación de las MSC-E fueron optimizadas previamente por el grupo LAGENBIO (Barrachina *et al.*, 2018a).

En el caso de las MSC-C, la diferenciación condrogénica se realizó con medio de inducción condrogénico durante 14 días a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub> (Ryan *et al.*, 2014). Este medio se cambió cada 48 horas durante esas dos semanas.

Todos los implantes (MSC-SE, MSC-E y MSC-C), 24 horas antes de su colocación, se lavaron 2 veces con tampón fosfato salino (PBS, de sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*) y se sustituyó el SFB del medio de cultivo por suero autólogo de cada receptor para que las MSCs estuvieran libres de antígenos xenogénicos que pudieran interferir con la respuesta inmune. Posteriormente, justo antes de la intervención, se lavaron de nuevo tres veces con PBS. Además, se preparó un implante adicional de cada uno de los donantes que fueron congelados directamente a -80 °C para utilizarlos posteriormente como control en el análisis de la expresión génica (muestra de referencia).

#### 4.4. Colocación y retirada de los implantes

En cada animal se colocaron de forma subcutánea tres implantes de alginato con  $5 \cdot 10^6$  MSCs por implante. Se colocaron a lo largo de las tablas del cuello, de craneal a caudal, dejando aproximadamente 10 cm entre ellos (**Figura 2**). La técnica empleada fue la del bolsillo subcutáneo (Bellas *et al.*, 2014), detallada a continuación. Cada implante se retiró a un tiempo distinto: de craneal a caudal a 1 (T1), 3 (T2) y 6 (T3) semanas.



**Figura 2.** Diseño y colocación de los implantes.

El mismo procedimiento se repitió en las tablas del cuello contralaterales un mes después de la retirada del último implante (T3). Las MSCs de estos implantes fueron del mismo donante y tipo que las colocadas en la primera intervención con la finalidad de valorar la capacidad de memoria

del organismo frente a las MSCs (**objetivo específico 3**) y se retiraron igualmente tras 1 (T4), 3 (T5) y 6 (T6) semanas.

Para llevar a cabo la intervención quirúrgica, que se realizó en estación, se administró una sedación a base de un  $\alpha$ -2 agonista (detomidina 0,01 mg/Kg, Sedaquick, Fatro) y un opioide (butorfanol 0,02 mg/Kg, Torbugesic, Pfizer). Además, se les administró una única dosis de flunixin meglumine IV (1,1 mg/Kg, Niglumine, Calier).

Tras la preparación aséptica del campo quirúrgico, se inyectó un anestésico local (lidocaína al 5%, Anesvet, Laboratorios Ovejero) en las zonas de incisión. Se hicieron tres incisiones horizontales de aproximadamente 3 cm de longitud y se diseccionó el tejido subcutáneo de toda la zona ventral a la incisión creando un bolsillo subcutáneo de 1,5x1,5 cm. A continuación, se colocaron los implantes dentro de los bolsillos y se suturó cada incisión en dos planos. Primero se hizo una sutura continua del tejido subcutáneo con material reabsorbible (Monosyn, Braun) y la piel se cerró colocando grapas y puntos simples de sutura (en caso necesario). Además, en los bordes ventral, caudal y rostral de cada bolsillo también se pusieron grapas para delimitar la zona de implantación y evitar la migración de los implantes.

Tras la intervención y en los tres días siguientes todos los caballos fueron monitorizados clínicamente. Además, durante esos tres días se mantuvieron con cobertura antibiótica (penicilina procaína IM a 15 mg/Kg una vez al día, Procopen, Livisto).

Para la extracción, que se llevó a cabo según los tiempos mencionados, se siguió el mismo procedimiento de preparación del campo quirúrgico que en la colocación de los implantes. Para extraer cada implante se hizo una incisión en el borde rostral de cada bolsillo de unos 3 cm de longitud y se diseccionó el tejido subcutáneo. El implante recuperado se dividió en dos partes: la primera mitad para estudiar la expresión génica (el objetivo de este TFG) y la segunda para llevar a cabo otros estudios del proyecto de investigación. Los implantes para realizar la expresión génica se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la extracción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm).

Tras la intervención quirúrgica para la extracción de los implantes los caballos también fueron monitorizados clínicamente los días posteriores.

### 4.5. Extracción de ácido ribonucleico mensajero

Para la extracción de ARNm, los implantes se colocaron en tubos cónicos de 1,5 mL con 500  $\mu\text{L}$  de Trizol y perlas de acero inoxidable (Qiagen), y posteriormente se disgregaron y homogenizaron con el instrumento TissueLyser LT (Qiagen) durante 3 minutos a 50 Hz. Después de ello, los tubos con las muestras se dejaron reposar durante dos minutos en hielo. Para el aislamiento del ARNm se empleó el kit comercial de Zymo Direct-Zol RNA siguiendo las

instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la capacidad de una membrana para retener ácidos nucleicos y todo el procedimiento se llevó a cabo manteniendo bajas temperaturas debido a la facilidad de degradación del ARNm.

Finalmente, se midió la concentración de ARNm de cada muestra con el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher). Además, se evaluó la pureza mediante los ratios 260/280 y 260/230 de absorbancia. El primero de ellos indica el grado de contaminación de la muestra con proteínas (absorbancia a 280 nm) mientras que el segundo indica el grado de presencia de sales y otros contaminantes que tienen una absorbancia a 230 nm. Las muestras de ARNm se almacenaron a -80 °C hasta realizar la retrotranscripción.

### 4.6. Síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc)

El kit empleado para hacer la retrotranscripción fue qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences). Se retrotranscribieron un total de 100 ng de ARNm por muestra para posteriormente trabajar a una misma concentración de ADNc al realizar las reacciones de RT-qPCR. Además, es preferible trabajar con ADNc debido a la alta degradabilidad del ARNm. Se calculó individualmente para cada reacción de retrotranscripción el volumen a añadir de cada muestra de ARNm y de H<sub>2</sub>O libre de ARNsas para que junto a los 4 µL de master mix, el volumen final fuera 20 µL, siguiendo las instrucciones del kit. Además, se preparó otra muestra con H<sub>2</sub>O libre de ARNsas como control negativo de la retrotranscripción. Las muestras mezcladas con los componentes del kit se incubaron en un termociclador en primer lugar 5 minutos a 25 °C, después 30 minutos a 42 °C para que tuviera lugar la reacción de síntesis del ADNc a partir del ARNm gracias a la enzima retrotranscriptasa del kit, y a continuación, 5 minutos más a 85 °C para inactivar dicha enzima. El ADNc se diluyó 1:10 y se almacenó a -20 °C hasta la preparación de las placas de RT-qPCR.

### 4.7. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

El análisis de la expresión génica de moléculas relacionadas con la capacidad inmunorreguladora e inmunogénica de las MSCs en distintas condiciones se llevó a cabo mediante la técnica de RT-qPCR, técnica de elección para el estudio del ARNm (Singh y Roy-Chowdhuri, 2016).

Las moléculas analizadas en este TFG están relacionadas con la capacidad inmunomoduladora e inmunogénica de las MSCs. Los cebadores utilizados para su detección fueron diseñados previamente por el grupo (Barrachina *et al.*, 2018a) y se detallan en la **Tabla 2**.

Para cada una de las muestras se analizaron los 9 genes mencionados en la **Tabla 2** y también se analizaron dos genes normalizadores:  $\beta$ -2-microglobulina (*B2M*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (**Tabla 2**). Estos últimos son genes normalizadores porque se expresan de forma consistente en todos los tejidos y permiten hacer equiparable la expresión entre

muestras al igualar las diferencias en la cantidad de partida de ácidos nucleicos. Primero se analizaron estos dos genes para todas las muestras ya que, si en alguna no se hubiera observado expresión, indicaría que esa muestra debe ser revisada. Para todos los genes analizados se hicieron tres réplicas de cada muestra.

**Tabla 2.** Cebadores empleados en la RT-qPCR para analizar la expresión génica. Los genes se agrupan de acuerdo con las funciones e implicaciones de las moléculas codificadas.

Gen	Número de acceso	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño amplicón (bp)
<b>GENES NORMALIZADORES</b>			
<i>GAPDH</i>	NM_001163856	F: GGCAAGTTCCATGGCACAGT R: CACAACATATTCAGCACCAGCAT	128
<i>B2M</i>	NM_001082502	F: TCGTCCTGCTCGGGCTACT R: ATTCTCTGCTGGGTGACGTGA	102
<b>MOLÉCULAS INMUNOMODULADORAS</b>			
Moléculas relacionadas con el mecanismo de contacto celular			
<i>VCAM1</i>	NM_001101650	F: TCTATGCTACGCTCTGGCTACG R: TTGATGGTCTCCCGATGA	127
Moléculas relacionadas con el mecanismo de señalización paracrina			
<i>COX2</i>	AB041771	F: GTTTGCATTTTTGCCCAGC R: ACTTAAATCCACCCGTGACC	103
<i>IDO1</i>	XM_01736538.2	F: TCATGACTACGTGGACCCAAAA R: CGCCTTCATAGAGCAGACCTTC	104
<i>iNOS2</i>	AY027883	F: CCAACAATGGCAACATCAGGT R: TGAGCATTCCAGATCCGGA	85
<i>IL6</i>	EU438770	F: AACAGCAAGGAGGTACTGGCA R: CAGGTCTCTGATTGAACCCA	95
<b>MARCADORES INMUNOGÉNICOS: moléculas presentadoras de antígenos</b>			
<i>MHC-I</i>	AB525081	F: CGTGAGCATCATTGTTGGC R: TCCCTCTTTTTTACCTGAGG	92
<i>MHC-II</i>	NM_001142816	F: AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R: CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172
<b>MOLÉCULAS RELACIONADAS CON LA PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS: moléculas coestimuladoras</b>			
<i>CD40</i>	AY514017	F: ACAATACTGCGACCCCAACC R: TTTACAGGCATCGCTGGA	114
<i>CD80</i>	XM_005601958.3	F: CAGGAAAGTTGGCTCTGACCA R: TCTCCATTGTGATCCTGGCTC	135

Para cada muestra se utilizaron 5 µL de Fast SYBER Green Master Mix (Applied Biosystems), fluorocromo intercalante que emite fluorescencia únicamente cuando se une a una doble cadena de ADN, 0,15 µL de cada cebador de la pareja y 2,7 µL de H<sub>2</sub>O para un volumen final de 8 µL. Se pipetearon los 8 µL del mix en cada pocillo y se añadieron 2 µL de ADNc de las muestras correspondientes en cada pocillo. Además, para cada gen se incluyó un control negativo (NTC, *no template control*) en triplicado, en el que se pipetaron 2 µL de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas en lugar de ADNc, para comprobar que no había amplificación inespecífica. Todas las placas se analizaron en el instrumento QuantStudio3 Real Time PCR System (Applied Biosystems). El programa de PCR empleado consistió en una activación inicial a 95 °C durante 20 segundos seguida de 40 ciclos de 3 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C y finalmente una curva de disociación para comprobar la especificidad de la amplificación.

### 4.8. Análisis de los datos

Para el análisis de los resultados obtenidos de RT-qPCR se utilizó el programa QuantStudio™ Design & Analysis Software (Applied Biosystems) analizando de forma individual las tres réplicas de cada muestra.

Se analizaron los valores del ciclo umbral (Ct, de sus siglas en inglés, *cycle threshold*) que indica el ciclo a partir del cual la amplificación es exponencial, la desviación estándar del ciclo umbral (Ct SD, de sus siglas en inglés, *standar deviation cycle threshold*) y la temperatura de disociación (Tm1, de sus siglas en inglés, *melting temperature*). El análisis se hizo en conjunto teniendo en cuenta los tres parámetros a la vez.

Para realizar la cuantificación de la expresión se utilizó el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , el cual permite calcular los niveles de expresión génica como un cambio relativo entre dos condiciones diferentes (Livak y Schmittgen, 2001). En este caso, el implante control de cada donante que se congeló al principio se utilizó como muestra de referencia para calcular la expresión relativa en los implantes experimentales.

El factor de normalización para cada muestra se calculó como la media geométrica de los valores Ct de los genes normalizadores *GAPDH* y *B2M*. Para el análisis de cada gen, este factor se restó a la media del valor Ct de las tres réplicas de cada muestra para obtener el valor  $\Delta Ct$  ( $\Delta Ct = Ct_{\text{gen interés}} - Ct_{\text{normalizador}}$ ). A continuación, se calculó la diferencia entre el  $\Delta Ct$  basal (muestra de referencia) y el  $\Delta Ct$  de cada muestra experimental para obtener el valor  $\Delta\Delta Ct$ , siendo este igual a cero en el caso de los propios implantes controles.

Con la finalidad de transformar el proceso exponencial en una relación lineal se empleó la conversión  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  asumiendo una eficiencia de los cebadores del 100% (Derveaux, Vandesompele y Hellemans, 2010). Mediante el mismo método, se calculó la desviación estándar (SD), representada por las barras de error, utilizando los valores  $2^{-\Delta\Delta Ct - SD}$  (límite inferior) y  $2^{-\Delta\Delta Ct + SD}$  (límite superior). Mediante el cálculo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  el valor de los implantes controles fue 1 ( $2^0=1$ ), por lo que en las muestras con valores  $> 1$  la expresión del gen aumentó mientras que en las que tuvieron valores  $< 1$  disminuyó.

### 4.9. Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de las diferentes variables se realizó con el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 26. Se utilizaron pruebas estadísticas analíticas para comprobar las diferencias en la expresión relativa del ARNm de cada gen (*COX2*, *IL6*, *iNOS2*, *IDO1*, *VCAM1*, *MHC-I*, *MHC-II*, *CD40* y *CD80*) en función de las distintas variables de estudio. Las variables fueron "grupo" (dos categorías: MHC-compatible y MHC-incompatible), "tipo de célula" (tres categorías: MSC-SE, MSC-E y MSC-C) y "tiempo" (6 categorías: T1, T2, T3, T4, T5 y T6). La

existencia de muestras atípicas se evaluó con la prueba de Grubbs (alfa = 0,05). La expresión de cada gen se analizó individualmente, estableciéndose como variable dependiente, y cada una de las demás variables como factor para estudiar las diferencias de la siguiente manera (1) diferencias entre tipos de células en cada tiempo dentro de cada grupo de receptores, (2) diferencias entre grupos de receptores para cada tipo de células en cada tiempo, (3) diferencias a lo largo del tiempo dentro de cada grupo de receptores para cada tipo de células.

Para los diferentes análisis, se utilizaron pruebas no paramétricas tras valorar la normalidad y la homocedasticidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente. En las variables con más de tres grupos, se utilizaron las pruebas Kruskal-Wallis o Friedman seguida de la prueba de Dunn como post hoc, para muestras independientes (1) o relacionadas (3), respectivamente. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre dos grupos (2). El nivel de significación se fijó en  $p < 0,05$  para todos los análisis. Para la representación gráfica se utilizó GraphPad Prism 9.2.

## 5. Resultados y discusión

Antes de presentar y discutir los resultados, es necesario considerar las limitaciones del estudio. En primer lugar, el tamaño muestral es reducido y puede influir en los resultados del análisis estadístico. Sin embargo, cabe considerar la dificultad de trabajar con un número elevado de animales por el tamaño y necesidades particulares de la especie equina, a lo que se añade la dificultad de encontrar individuos compatibles para el MHC teniendo en cuenta la gran variabilidad de haplotipos (Sadeghi *et al.*, 2018). Además, existe gran variabilidad inter-individual en la expresión génica a pesar de haber seleccionado caballos con características similares. Para tratar de contrarrestar este efecto, los resultados se normalizaron de acuerdo con la expresión génica de cada donante tras analizarla en los implantes controles. Por todo ello, en las gráficas que se mostrarán a continuación se observan ciertas diferencias que el análisis estadístico no ha detectado como significativas, pero que, sin embargo, pueden ser relevantes. Finalmente, no toda la expresión génica que se detecta mediante RT-qPCR resulta en una secreción de la molécula en cuestión por parte de las MSCs (Cassano *et al.*, 2018).

Por motivos de extensión, solo se han representado en detalle los genes y las condiciones en las que se observaron diferencias significativas (o relevantes). Para el resto de los genes y condiciones, no se observaron cambios relevantes, lo que puede indicar que dichos genes no se verían influenciados por las condiciones testadas en este estudio. Todos los resultados están presentados en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Resultados de la expresión de los genes inmunomoduladores e inmunogénicos en los implantes. Media  $2^{-\Delta\Delta Ct}$   $\pm$  error estándar de la media (SEM, de sus siglas en inglés *standard error of the mean*) de los implantes analizados en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible en los tres tipos celulares (MSC-SE, MSC-E y MSC-C).

			T1	T2	T3	T4	T5	T6
			Media $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$	Media $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm SEM$
IL6	MHC-compatible	MSC-SE	1,122 $\pm$ 1,302	1,035 $\pm$ 1,529	0,692 $\pm$ 0,562	1,662 $\pm$ 1,370	0,413 $\pm$ 0,274	0,118 $\pm$ 0,053
		MSC-E	0,021 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,000	0,002 $\pm$ 0,000	0,050 $\pm$ 0,007	0,001 $\pm$ 0,000	0,005 $\pm$ 0,000
		MSC-C	2,416 $\pm$ 0,253	0,546 $\pm$ 0,747	0,430 $\pm$ 0,472	1,327 $\pm$ 1,047	1,492 $\pm$ 1,462	0,181 $\pm$ 0,051
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,768 $\pm$ 0,330	0,261 $\pm$ 0,127	0,647 $\pm$ 0,000	0,732 $\pm$ 0,516	0,715 $\pm$ 0,514	0,301 $\pm$ 0,176
		MSC-E	0,011 $\pm$ 0,004	0,002 $\pm$ 0,002	0,034 $\pm$ 0,046	0,046 $\pm$ 0,039	0,003 $\pm$ 0,003	0,003 $\pm$ 0,005
		MSC-C	1,354 $\pm$ 0,468	0,181 $\pm$ 0,213	0,970 $\pm$ 0,358	3,017 $\pm$ 1,437	0,894 $\pm$ 0,955	0,623 $\pm$ 0,135
COX2	MHC-compatible	MSC-SE	0,947 $\pm$ 0,756	0,142 $\pm$ 0,139	0,238 $\pm$ 0,253	0,396 $\pm$ 0,278	1,141 $\pm$ 0,546	0,249 $\pm$ 0,019
		MSC-E	0,673 $\pm$ 0,376	0,105 $\pm$ 0,000	0,054 $\pm$ 0,000	1,066 $\pm$ 1,143	0,012 $\pm$ 0,005	0,015 $\pm$ 0,000
		MSC-C	32,122 $\pm$ 4,744	1,942 $\pm$ 0,816	3,309 $\pm$ 1,393	24,132 $\pm$ 13,349	5,654 $\pm$ 1,823	3,964 $\pm$ 0,174
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,430 $\pm$ 0,447	0,150 $\pm$ 0,062	0,038 $\pm$ 0,014	0,310 $\pm$ 0,176	0,107 $\pm$ 0,119	0,055 $\pm$ 0,040
		MSC-E	0,089 $\pm$ 0,038	0,039 $\pm$ 0,018	0,246 $\pm$ 0,407	0,352 $\pm$ 0,207	0,051 $\pm$ 0,011	0,022 $\pm$ 0,004
		MSC-C	6,100 $\pm$ 1,849	1,106 $\pm$ 0,342	2,694 $\pm$ 0,678	4,774 $\pm$ 1,549	2,973 $\pm$ 2,131	4,854 $\pm$ 1,381
IDO1	MHC-compatible	MSC-SE	0,032 $\pm$ 0,025	0,021 $\pm$ 0,021	0,058 $\pm$ 0,088	0,020 $\pm$ 0,010	0,128 $\pm$ 0,174	0,008 $\pm$ 0,006
		MSC-E	1,531 $\pm$ 0,747	0,079 $\pm$ 0,000	0,133 $\pm$ 0,000	0,928 $\pm$ 0,586	0,050 $\pm$ 0,009	0,021 $\pm$ 0,000
		MSC-C	0,923 $\pm$ 0,830	0,102 $\pm$ 0,117	0,020 $\pm$ 0,006	0,259 $\pm$ 0,062	0,078 $\pm$ 0,016	0,032 $\pm$ 0,018
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,011 $\pm$ 0,009	0,004 $\pm$ 0,005	0,002 $\pm$ 0,000	0,010 $\pm$ 0,010	0,004 $\pm$ 0,001	0,003 $\pm$ 0,001
		MSC-E	0,035 $\pm$ 0,020	0,003 $\pm$ 0,001	0,712 $\pm$ 1,230	0,450 $\pm$ 0,523	0,013 $\pm$ 0,004	0,012 $\pm$ 0,007
		MSC-C	0,026 $\pm$ 0,014	0,009 $\pm$ 0,001	0,009 $\pm$ 0,001	0,054 $\pm$ 0,052	0,016 $\pm$ 0,004	0,004 $\pm$ 0,003
iNOS2	MHC-compatible	MSC-SE	2,685 $\pm$ 1,973	9,122 $\pm$ 14,915	0,590 $\pm$ 0,721	2,138 $\pm$ 2,776	23,439 $\pm$ 30,090	1,501 $\pm$ 1,894
		MSC-E	0,107 $\pm$ 0,003	0,004 $\pm$ 0,000	0,012 $\pm$ 0,000	0,004 $\pm$ 0,000	0,010 $\pm$ 0,012	0,004 $\pm$ 0,000
		MSC-C	1,369 $\pm$ 0,809	0,708 $\pm$ 0,577	2,090 $\pm$ 1,951	1,997 $\pm$ 1,269	1,582 $\pm$ 0,583	0,132 $\pm$ 0,033
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,152 $\pm$ 0,109	0,366 $\pm$ 0,457	0,242 $\pm$ 0,060	0,454 $\pm$ 0,368	0,310 $\pm$ 0,294	0,184 $\pm$ 0,173
		MSC-E	0,019 $\pm$ 0,013	0,004 $\pm$ 0,006	0,003 $\pm$ 0,003	0,023 $\pm$ 0,025	0,019 $\pm$ 0,008	0,003 $\pm$ 0,001
		MSC-C	0,101 $\pm$ 0,000	0,654 $\pm$ 0,006	1,169 $\pm$ 0,441	0,594 $\pm$ 0,424	0,761 $\pm$ 0,413	0,976 $\pm$ 0,731
VCAM1	MHC-compatible	MSC-SE	32,427 $\pm$ 16,103	7,698 $\pm$ 7,780	5,637 $\pm$ 5,847	122,589 $\pm$ 79,877	137,058 $\pm$ 100,538	9,451 $\pm$ 6,045
		MSC-E	0,071 $\pm$ 0,005	0,005 $\pm$ 0,000	0,004 $\pm$ 0,000	0,033 $\pm$ 0,006	0,027 $\pm$ 0,006	0,007 $\pm$ 0,000
		MSC-C	7,008 $\pm$ 6,087	27,025 $\pm$ 30,812	25,017 $\pm$ 27,979	20,219 $\pm$ 4,493	14,046 $\pm$ 14,740	3,733 $\pm$ 0,663
	MHC-incompatible	MSC-SE	27,964 $\pm$ 25,698	10,411 $\pm$ 8,416	13,884 $\pm$ 15,130	33,569 $\pm$ 18,120	6,646 $\pm$ 0,166	5,454 $\pm$ 5,046
		MSC-E	0,105 $\pm$ 0,039	0,033 $\pm$ 0,032	0,052 $\pm$ 0,045	0,036 $\pm$ 0,028	0,017 $\pm$ 0,004	0,018 $\pm$ 0,019
		MSC-C	10,497 $\pm$ 7,818	6,472 $\pm$ 5,988	24,749 $\pm$ 11,754	4,804 $\pm$ 2,193	4,238 $\pm$ 2,200	13,106 $\pm$ 9,815
CD40	MHC-compatible	MSC-SE	0,221 $\pm$ 0,079	0,476 $\pm$ 0,075	0,750 $\pm$ 0,691	0,477 $\pm$ 0,115	0,934 $\pm$ 0,370	1,216 $\pm$ 0,408
		MSC-E	0,051 $\pm$ 0,037	0,033 $\pm$ 0,000	0,065 $\pm$ 0,000	0,160 $\pm$ 0,156	0,106 $\pm$ 0,069	0,315 $\pm$ 0,000
		MSC-C	0,485 $\pm$ 0,140	0,623 $\pm$ 0,373	0,436 $\pm$ 0,192	0,210 $\pm$ 0,086	0,549 $\pm$ 0,459	0,866 $\pm$ 0,225
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,508 $\pm$ 0,194	1,203 $\pm$ 0,281	0,741 $\pm$ 0,574	0,328 $\pm$ 0,069	0,747 $\pm$ 0,287	0,973 $\pm$ 0,413
		MSC-E	0,167 $\pm$ 0,046	0,472 $\pm$ 0,187	0,228 $\pm$ 0,147	0,208 $\pm$ 0,078	0,470 $\pm$ 0,044	0,269 $\pm$ 0,129
		MSC-C	0,628 $\pm$ 0,323	0,396 $\pm$ 0,202	1,733 $\pm$ 0,652	0,650 $\pm$ 0,451	0,377 $\pm$ 0,212	0,801 $\pm$ 0,228
CD80	MHC-compatible	MSC-SE	0,384 $\pm$ 0,030	0,377 $\pm$ 0,155	0,286 $\pm$ 0,055	0,537 $\pm$ 0,372	0,690 $\pm$ 0,656	0,610 $\pm$ 0,400
		MSC-E	1,390 $\pm$ 0,087	0,982 $\pm$ 0,000	1,059 $\pm$ 0,000	0,417 $\pm$ 0,360	0,158 $\pm$ 0,046	0,133 $\pm$ 0,000
		MSC-C	3,276 $\pm$ 2,685	2,183 $\pm$ 1,189	4,766 $\pm$ 3,191	1,804 $\pm$ 0,133	1,777 $\pm$ 1,762	0,848 $\pm$ 0,069
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,421 $\pm$ 0,140	1,281 $\pm$ 0,363	0,470 $\pm$ 0,226	0,263 $\pm$ 0,186	0,797 $\pm$ 0,305	0,767 $\pm$ 0,598
		MSC-E	1,730 $\pm$ 0,761	3,217 $\pm$ 0,357	1,118 $\pm$ 0,844	1,671 $\pm$ 1,371	1,302 $\pm$ 0,595	2,233 $\pm$ 1,728
		MSC-C	8,249 $\pm$ 2,518	2,828 $\pm$ 2,649	4,485 $\pm$ 0,935	2,236 $\pm$ 1,904	1,201 $\pm$ 0,305	5,446 $\pm$ 1,796
MHC-I	MHC-compatible	MSC-SE	1,994 $\pm$ 1,051	0,624 $\pm$ 0,123	0,592 $\pm$ 0,379	0,729 $\pm$ 0,165	0,557 $\pm$ 0,306	0,332 $\pm$ 0,156
		MSC-E	0,491 $\pm$ 0,172	0,336 $\pm$ 0,000	0,522 $\pm$ 0,000	1,394 $\pm$ 0,789	0,562 $\pm$ 0,094	0,598 $\pm$ 0,000
		MSC-C	0,104 $\pm$ 0,067	0,303 $\pm$ 0,459	0,197 $\pm$ 0,271	0,484 $\pm$ 0,498	0,328 $\pm$ 0,407	1,078 $\pm$ 0,849
	MHC-incompatible	MSC-SE	0,978 $\pm$ 1,027	0,420 $\pm$ 0,170	0,107 $\pm$ 0,131	1,668 $\pm$ 0,518	0,858 $\pm$ 1,197	0,130 $\pm$ 0,117
		MSC-E	0,611 $\pm$ 0,821	0,452 $\pm$ 0,578	1,395 $\pm$ 2,394	2,093 $\pm$ 2,843	0,797 $\pm$ 1,073	0,963 $\pm$ 1,632
		MSC-C	165,267 $\pm$ 212,489	84,321 $\pm$ 119,210	68,219 $\pm$ 96,457	139,500 $\pm$ 229,111	45,957 $\pm$ 72,329	60,337 $\pm$ 90,328
MHC-II	MHC-compatible	MSC-SE	3,781 $\pm$ 0,408	2,910 $\pm$ 2,078	6,965 $\pm$ 1,054	2,596 $\pm$ 1,725	3,935 $\pm$ 1,576	11,894 $\pm$ 0,889
		MSC-E	77,052 $\pm$ 27,883	41,573 $\pm$ 0,000	16,148 $\pm$ 0,000	5,256 $\pm$ 2,807	12,437 $\pm$ 2,252	24,742 $\pm$ 0,000
		MSC-C	12,773 $\pm$ 4,309	60,233 $\pm$ 7,368	17,571 $\pm$ 12,554	6,897 $\pm$ 4,837	10,443 $\pm$ 0,889	70,327 $\pm$ 11,260
	MHC-incompatible	MSC-SE	3,918 $\pm$ 2,865	8,213 $\pm$ 2,029	7,470 $\pm$ 5,896	2,006 $\pm$ 0,728	17,650 $\pm$ 12,723	12,837 $\pm$ 2,215
		MSC-E	24,307 $\pm$ 3,342	35,366 $\pm$ 8,239	13,606 $\pm$ 10,416	8,169 $\pm$ 5,594	34,979 $\pm$ 6,251	34,919 $\pm$ 6,857
		MSC-C	8,118 $\pm$ 5,415	19,879 $\pm$ 10,781	11,355 $\pm$ 2,135	4,209 $\pm$ 2,486	8,586 $\pm$ 3,224	38,131 $\pm$ 20,811

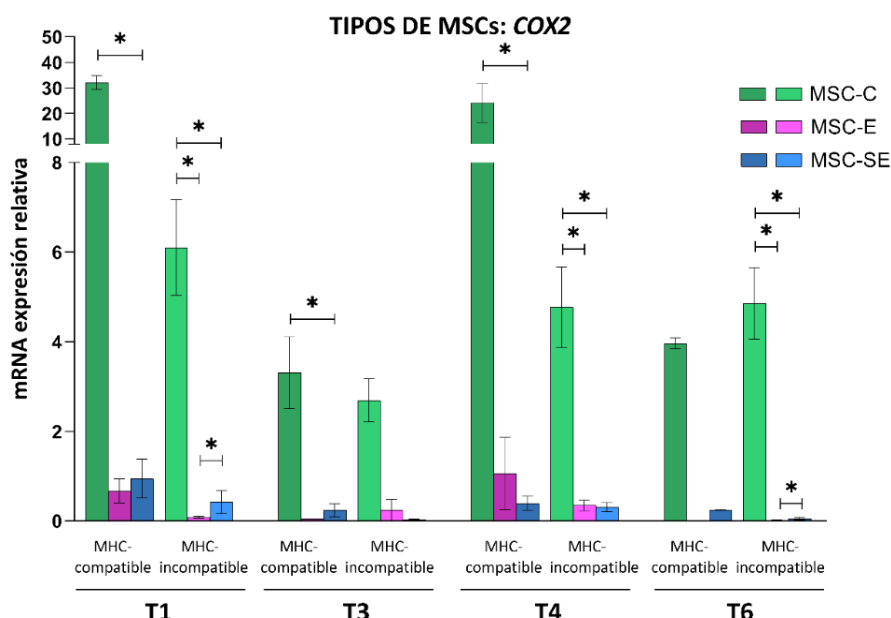
### 5.1. Influencia del tipo de MSCs

Al analizar el efecto del tipo de MSCs recibidas (MSC-SE, MSC-E y MSC-C) se observaron diferencias significativas para todos los genes estudiados excepto para *MHC-I*.

Respecto a *COX2*, en el grupo MHC-compatible se observó una mayor expresión en las MSC-C respecto a las MSC-SE ( $p < 0,05$ ) en T1, T3 y T4. De forma similar, en el grupo MHC-incompatible también se observó una mayor expresión de *COX2* en las MSC-C respecto tanto a las MSC-SE como a las MSC-E en T1, T4 y T6 ( $p < 0,05$  en todos los casos). También se observó un aumento

de la expresión de *COX2* en las MSC-SE respecto tanto a las MSC-E en el primer (T1) y último tiempo (T6) ( $p < 0,05$ ) (Gráfica 1).

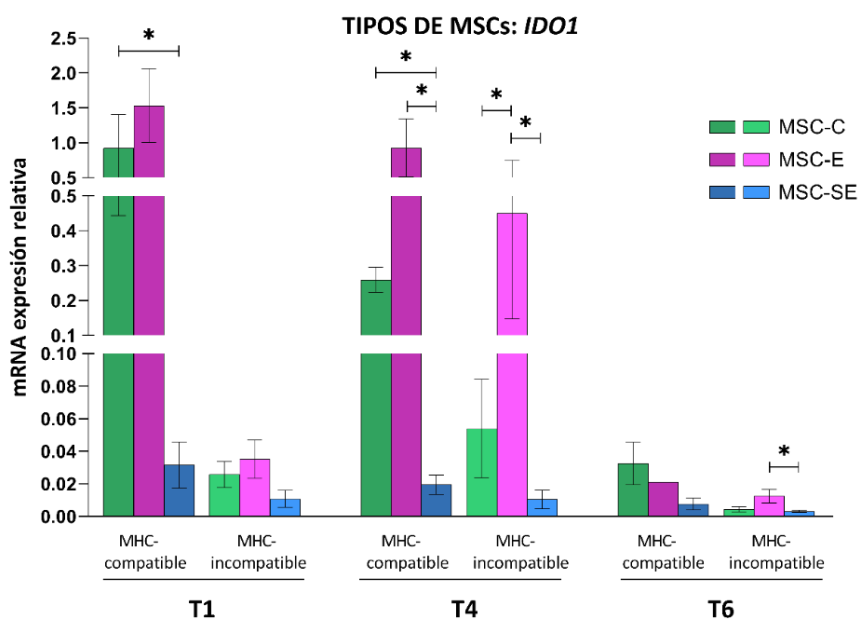
En definitiva, es notable el aumento de la expresión de este gen en el caso de las MSC diferenciadas a condrocito, tanto en el grupo MHC-compatible como en el MHC-incompatible y, sobre todo, justo tras cada una de las dos administraciones. En otros estudios *in vitro* este aumento lo han observado tras estimular las MSCs con citoquinas proinflamatorias (Cassano *et al.*, 2018; Caffi *et al.*, 2020). Cassano *et al.*, 2018 emplearon IFN- $\gamma$  mientras que Caffi *et al.*, 2020 emplearon TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y ambos. En este último estudio, concluyeron que con el uso combinado de ambas citoquinas se conseguía una mayor expresión de *COX2*. Sin embargo, en este estudio hemos observado *in vivo* que la expresión de *COX2* en las MSC-E ha sido similar a la de las MSC-SE. Esto puede deberse a que el efecto del tratamiento con citoquinas proinflamatorias se pierda a lo largo del tiempo una vez las MSC-E son administradas.



Gráfica 1. Expresión relativa de *COX2* entre MSCs en los grupos MHC-compatible y MHC-incompatible.

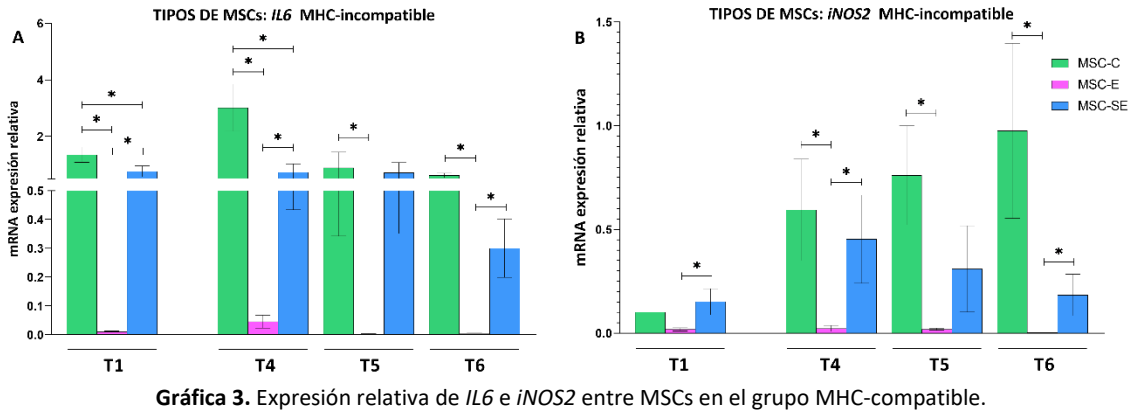
La expresión del gen *IDO1* también fue significativamente mayor en las MSC-C respecto a las MSC-SE en el grupo MHC-compatible a T1 y T4 ( $p < 0,05$ ). Además, en T4 se observó mayor expresión en las MSC-E respecto a las MSC-SE tanto en el grupo MHC-compatible como en el MHC-incompatible ( $p < 0,05$ ). Por otra parte, en el grupo MHC-incompatible las MSC-E mostraron mayor expresión de *IDO1* que los otros dos tipos de células tanto en T4 y como en T6 ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en T6 los niveles de expresión de *IDO1* fueron inferiores respecto a T1 y T4, indicando que el efecto inmunomodulador se reduciría a lo largo del tiempo (Gráfica 2). Otros estudios señalan un aumento de la expresión de *IDO1* en las MSCs tras su estimulación con citoquinas proinflamatorias *in vitro* (Cassano *et al.*, 2018; Caffi *et al.*, 2020; Lee, Jung y Kim,

2021). En este estudio *in vivo* no hay un aumento respecto a los valores basales (todos los valores de expresión relativa son similares o inferiores a 1), pero sí se observa que las MSC-E son capaces de mantener una mayor expresión de *IDO1*, seguidas por las MSC-C, aunque la expresión de este gen tiende a reducirse a lo largo del tiempo. La ausencia de un marcado aumento en la expresión de este gen, que se caracteriza por ser inducido por la inflamación, podría reflejar que las MSCs no generan una respuesta inmune relevante y por tanto no se ven expuestas a un ambiente lo bastante inflamatorio.

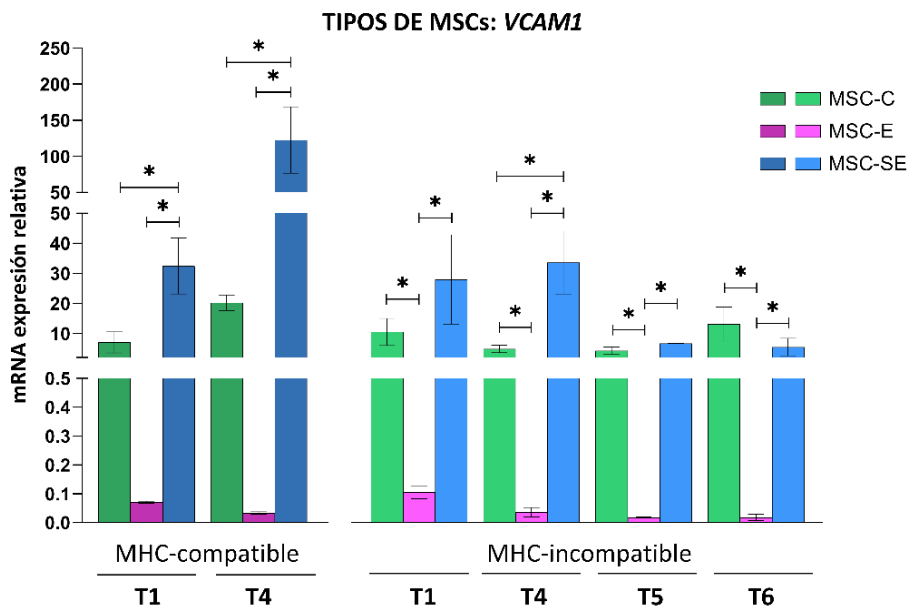


Gráfica 2. Expresión relativa de *IDO1* entre MSCs en los grupos MHC-compatibles y MHC-incompatibles.

Tanto para *IL-6* como para *iNOS2* solo se observaron diferencias significativas en el grupo MHC-incompatible. La expresión de *IL6* en las MSC-C fue significativamente mayor respecto a las MSC-E y MSC-SE en T1 y T4 ( $p < 0,05$ ). En el caso de *iNOS2* se observó mayor expresión también en las MSC-C respecto a las MSC-E ( $p < 0,05$ ), que en general mostraron valores muy bajos. De hecho, en T1, T4 y T6, la expresión de *iNOS2* en MSC-E fue significativamente menor que en las MSC-SE ( $p < 0,05$ ). En T5 y T6, tanto en *IL6* como en *iNOS2*, se observó mayor expresión en las MSC-C respecto a las MSC-E ( $p < 0,05$ ) (Gráfica 3). Por tanto, la estimulación con citoquinas proinflamatorias parece no aumentar la expresión de ninguno de estos dos genes tras administrar las MSC-E *in vivo*, lo que resulta contradictorio con trabajos *in vitro* que obtuvieron una mayor expresión de *IL6* (Connard *et al.*, 2021) e *iNOS2* (Lee, Jung y Kim, 2021) tras su estimulación con citoquinas proinflamatorias. Caffi *et al.*, 2020 también detectaron un aumento de ambos genes tras dicha estimulación. Sin embargo, de forma similar a lo observado para *IDO1*, parece que estos efectos no se mantendrían en el tiempo una vez las MSCs son administradas *in vivo*.

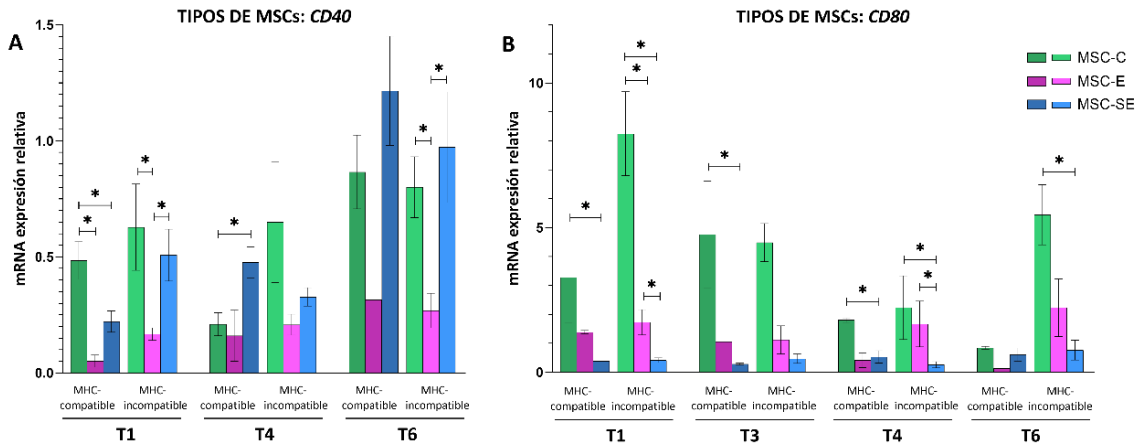


Respecto a *VCAM1*, en T1 y T4 se observó un aumento de su expresión en las MSC-SE respecto a las MSC-C y MSC-E en el grupo MHC-compatibile ( $p < 0,05$ ). En el grupo MHC-incompatibile, el incremento de la expresión de *VCAM1* en las MSC-SE en comparación con las MSC-C solo se observó tras la reexposición (T4). Sin embargo, en T1, T4, T5 y T6 se observó una disminución significativa de la expresión de *VCAM1* en las MSC-E en comparación con las MSC-C y las MSC-SE en el grupo MHC-incompatibile (**Gráfica 4**). Por tanto, la expresión de *VCAM1* en las MSC-E fue muy baja e inferior en comparación con su respectivo implante control, mientras que su expresión estuvo incrementada tanto en las MSC-SE como en las MSC-C observándose valores ligeramente mayores en todos los tiempos en las MSC-SE. En otro estudio, y en consonancia con nuestros resultados, han observado que la expresión de este gen, aunque aumenta en MSC-E tras la estimulación, disminuye tras 7 días *in vitro* resultando en valores incluso más bajos que los de las MSC-SE (Barrachina *et al.*, 2017).



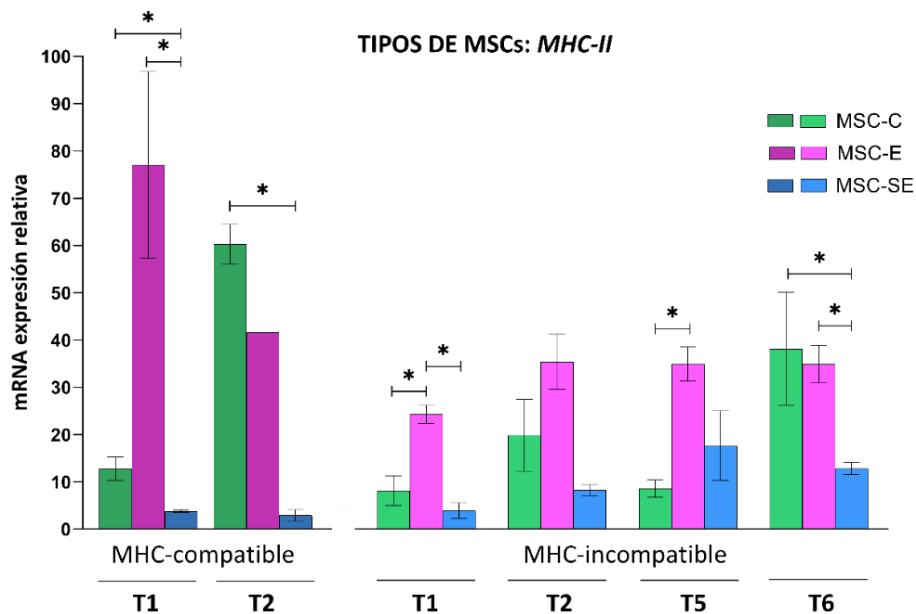
De acuerdo con los resultados de las moléculas inmunogénicas, en el grupo MHC-compatible se observó que la expresión de *CD40* fue significativamente mayor en las MSC-C respecto a las MSC-E y las MSC-SE en T1, y solo respecto a MSC-SE en T4 ( $p < 0,05$  en todos los casos). En el grupo MHC-incompatible, se observó tanto en el primer implante (T1) como en el último (T6) que la expresión de *CD40* era menor en las MSC-E en comparación con las MSC-C y MSC-SE ( $p < 0,05$ ) (**Gráfica 5, A**). Lee, Jung y Kim, 2021 observaron que tras la estimulación de las MSCs con TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  los niveles de ARNm de *CD40* aumentaban, al contrario que en nuestro estudio, en el que la expresión de este marcador fue mayor tanto en las MSC-SE como en las MSC-C en comparación con las MSC-E. Como se ha comentado anteriormente, esto podría deberse a que el efecto de la estimulación se perdiera a lo largo del tiempo *in vivo*, al no encontrar las MSC-E un ambiente lo suficientemente inflamatorio como podría ocurrir tras una lesión como han descrito otros autores (Barrachina *et al.*, 2018a). Según los resultados de nuestro estudio, la estimulación de las MSCs con citoquinas proinflamatorias les permitiría evadir el sistema inmune (Ankrum, Ong y Karp, 2014; Berglund *et al.*, 2017) al encontrarse los niveles de expresión de *CD40* inferiores a los respectivos implantes controles. Sin embargo, la sobreexpresión de los genes inmunomoduladores en las MSC-E solo fue destacable en el caso de *IDO1* y la compensación podría no ser suficiente para lograr esa evasión.

La expresión de *CD80* estuvo aumentada en las MSC-C del grupo MHC-incompatible en todos los tiempos. En el grupo MHC-compatible, se observó un aumento de su expresión en las MSC-C respecto a las MSC-SE en T1, T3 y T4. Además, la expresión de *CD80* en las MSC-SE también fue significativamente menor que en MSC-C y MSC-E en el grupo MHC-incompatible a T1 y T4 ( $p < 0,05$ ). En el grupo MHC-incompatible, se observó un aumento en la expresión de *CD80* en las MSC-C respecto a las MSC-E en T1 y a las MSC-SE en T6 ( $p < 0,05$ ) (**Gráfica 5, B**). En consonancia con nuestros resultados, estudios realizados en MSCs humanas han mostrado que, tras la estimulación con citoquinas proinflamatorias, las MSCs no aumentan la expresión de *CD80* e incluso puede verse reducida (Van Megen *et al.*, 2019; Ozdemir *et al.*, 2021). Por lo tanto, la evasión del sistema inmune sería más eficaz por parte de las MSC-SE y las MSC-E aplicadas en individuos MHC-compatibles.



Gráfica 5. Expresión relativa de *CD40* (A) y *CD80* (B) entre MSCs en los grupos MHC-compatibile y MHC-incompatibile.

En el caso de *MHC-II*, se puede observar cómo tiende a una mayor expresión en las MSC-E. En el grupo MHC-compatibile, se observó un aumento significativo de *MHC-II* en las MSC-E y MSC-C en comparación a las MSC-SE en T1 ( $p < 0,05$  en ambos casos) y T2 ( $p < 0,05$  en las MSC-C). En el grupo MHC-incompatibile, se observó lo mismo a T6 ( $p < 0,05$ ). Además, las MSC-E MHC-incompatibles mostraron los mayores niveles de expresión de *MHC-II* en comparación a las MSC-C y las MSC-SE en T1 ( $p < 0,05$  en ambos casos) y T5 ( $p < 0,05$  en las MSC-C) (Gráfica 6). Otros autores revelan que la expresión de *MHC-II* tras la estimulación de las MSCs con citoquinas proinflamatorias es mayor (Schnabel *et al.*, 2014; Barrachina *et al.*, 2017; Cassano *et al.*, 2018), de acuerdo a lo observado en nuestro estudio *in vivo*, que también ha revelado que los niveles de expresión de este marcador son incluso mayores en las MSC-C.



Gráfica 6. Expresión relativa de *MHC-II* entre MSCs en los grupos MHC-compatibile y MHC-incompatibile.

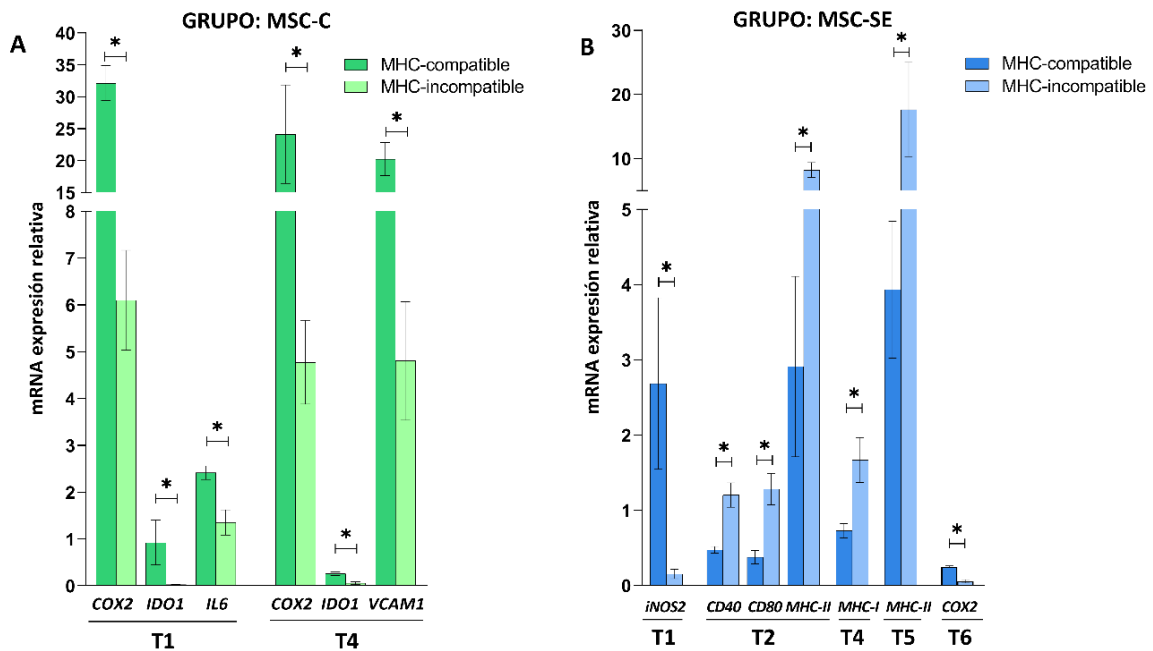
Los resultados presentados sobre el efecto del tipo de MSCs muestran que los genes inmunomoduladores tendieron a expresarse más en las MSCs diferenciadas a condrocito, seguidas por las MSC-SE, que también mostraron en general valores mayores a los de las MSC-E. El único gen que tras la estimulación con citoquinas proinflamatorias tuvo una mayor expresión en comparación a los otros dos tipos celulares fue *IDO1*, aunque sus niveles de expresión en las MSC-C también fueron similares. Estos resultados podrían sugerir que la máxima eficacia terapéutica se conseguiría con el uso de MSC-C o MSC-SE. Sin embargo, ambos tipos celulares también mostraron los mayores niveles de expresión de los genes inmunogénicos: en *CD40* se observó mayor expresión en las MSC-C y MSC-SE y en *CD80* en las MSC-C. Pero debido a la menor expresión de *CD80* y *MHC-II* en las MSC-SE, podrían considerarse más inmunoevasivas que las MSC-C. Por otro lado, en el caso de *MHC-II*, las MSC-E mostraron los valores más elevados, al igual que sucedía con *IDO1*. Sin embargo, cabe considerar que la expresión de diferentes genes en los tres tipos celulares y a lo largo del tiempo de exposición se encontró disminuida en comparación a los respectivos implantes basales, lo que sugiere que el ambiente *in vivo* no induciría cambios relevantes en el perfil inmune de las MSCs.

### 5.2. Influencia de la compatibilidad

Respecto a la influencia de la compatibilidad para el MHC, se observaron diferencias significativas en la expresión génica de las MSC-C y MSC-SE según se administraran a receptores MHC-compatibles o MHC-incompatibles. En las MSC-C se observó un aumento de la expresión de *COX2*, *IDO1* e *IL6* en el grupo MHC-compatibile respecto al MHC-incompatibile a T1 ( $p < 0,05$ ) (**Gráfica 7, A**). Asimismo, en el primer tiempo tras la reexposición (T4), se observó este mismo incremento en *COX2*, *IDO1* y también *VCAM1* en las MSC-C administradas al grupo MHC-compatibile ( $p < 0,05$ ) (**Gráfica 7, A**). Por consiguiente, para las MSC-C solo se observaron diferencias significativas en los genes inmunomoduladores, aumentando su expresión en el grupo MHC-compatibile.

En cuanto a las MSC-SE, se observó un aumento significativo de la expresión génica de las moléculas inmunomoduladoras *iNOS2* en T1 y *COX2* en T6 en el grupo MHC-compatibile respecto al MHC-incompatibile ( $p < 0,05$ ) (**Gráfica 7, B**). Cabe destacar que en ninguno de los tres tipos celulares (MSC-SE, MSC-E y MSC-C) se observó un aumento significativo de las moléculas inmunomoduladoras en el grupo MHC-incompatibile en comparación al grupo MHC-compatibile (**Tabla 3**). Sin embargo, tras analizar las moléculas inmunogénicas en los grupos en los que se administraron MSC-SE, se observó en el grupo MHC-incompatibile un aumento significativo de la expresión de *CD40*, *CD80* y *MHC-II* en T2, *MHC-I* en T4 y *MHC-II* en T5 respecto al grupo MHC-compatibile ( $p < 0,05$  en todos los tiempos) (**Gráfica 7, B**). En definitiva, la expresión génica de

las moléculas inmunogénicas aumentó en los animales MHC-incompatibles respecto a los MHC-compatibles, mientras que en estos últimos se observó un aumento de las moléculas inmunomoduladoras.



Gráfica 7. Expresión relativa de MSC-C (A) y MSC-SE (B) entre grupos.

Aunque no hubo diferencias significativas en la expresión génica de MSC-E dependiendo del tipo de receptor, para MSC-SE y MSC-C se puede observar un aumento de las moléculas inmunomoduladoras al administrarlas en el grupo MHC-compatibles y, por el contrario, un aumento de la inmunogenicidad en las MSC-SE aplicadas a animales MHC-incompatibles.

Estos resultados indicarían que las MSC-C son inmunomoduladoras, al contrario de lo descrito en estudios anteriores en la especie equina (Van Hecke *et al.*, 2021) y en roedores (Ryan *et al.*, 2014). Por tanto, en las condiciones de nuestro estudio, la compatibilidad para el MHC parece no influir sobre la inmunogenicidad de las MSC-C, ya que no se observaron diferencias significativas entre el grupo MHC-compatibles y MHC-incompatibles, y además aumentó su perfil inmunomodulador al administrarlas a receptores MHC-compatibles.

Sin embargo, en las MSC-SE, en el grupo MHC-incompatibles sí que se observó un aumento de la expresión de los marcadores inmunogénicos y una disminución de los inmunomoduladores, lo que las haría menos inmunoevasivas. Rowland *et al.*, 2021 administraron a nivel intraarticular MSC-SE en caballos MHC-compatibles e MHC-incompatibles y observaron un aumento de la respuesta inmune humoral a nivel sistémico y de la reacción inflamatoria a nivel local en el último caso, lo que refuerza la importancia de la compatibilidad para el MHC en el momento de instaurar una terapia con dicho tipo de MSCs.

### 5.3. Cambios en las MSCs equinas a lo largo del tiempo de exposición *in vivo*

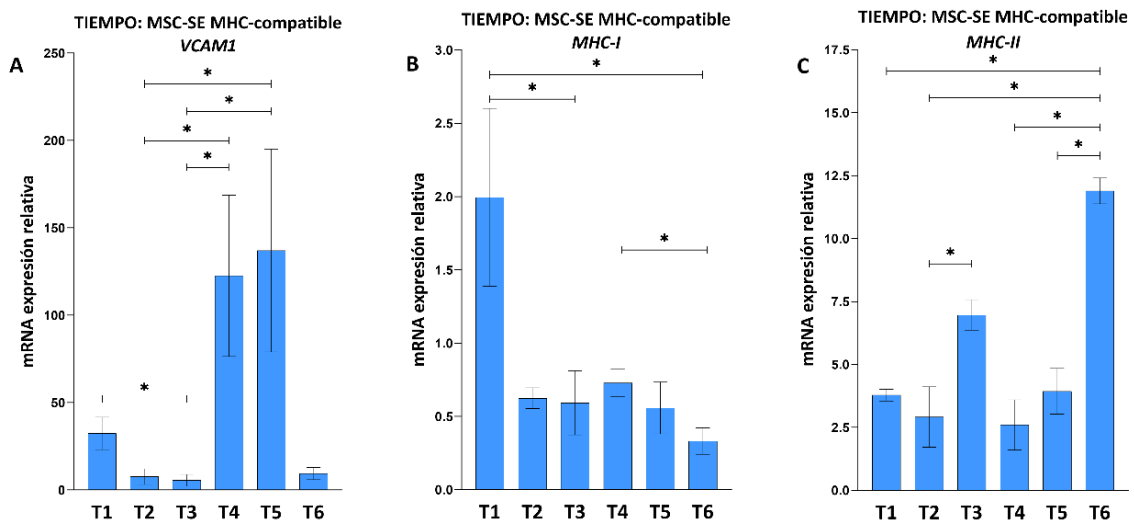
En la valoración de los cambios en la expresión génica a lo largo de los diferentes tiempos, se observaron diferencias significativas en los genes *VCAM1*, *MHC-I* y *MHC-II* en el grupo de animales MHC-compatibles que recibieron MSC-SE. En *VCAM1* se observó un aumento de su expresión en T1, T4 y T5 respecto a T3 ( $p < 0,05$ ) y también en los tiempos T4 y T5 respecto a T2 ( $p < 0,01$ ) (**Gráfica 8, A**). Estos resultados podrían sugerir que tras una segunda administración (T4 y T5) de MSC-SE en animales MHC-compatibles, las interacciones entre ellas y los linfocitos aumentan mediante moléculas de adhesión como *VCAM1*, y como consecuencia en estas condiciones ejercerían un mayor efecto inmunomodulador (Pourgholaminejad *et al.*, 2016; Foo *et al.*, 2021).

En el caso de *MHC-I*, se observó un aumento de su expresión en T1 aunque en los siguientes tiempos volvió a reducirse, siendo significativo respecto a T3 ( $p < 0,05$ ) y T6 ( $p < 0,001$ ). Además, la expresión de *MHC-I* tras la segunda administración (T4) también se observó aumentada respecto a T6 ( $p < 0,05$ ) (**Gráfica 8, B**). Por lo tanto, la mayor expresión de *MHC-I* se observó tras cada administración, tanto en el primer tiempo del estudio (T1) como en el primer tiempo de la reexposición (T4), pero siendo mucho mayor en T1 aunque la diferencia no fue significativa respecto a T4. De hecho, a excepción de T1, en el resto de tiempos la expresión de *MHC-I* fue inferior a la del implante control (**Tabla 3**). Sin embargo, para *MHC-II*, el mayor aumento se observó en el último tiempo tras cada exposición. Esta sobreexpresión fue significativa en T3 respecto a T2 ( $p < 0,05$ ) (primera administración), y en T6 respecto a los tiempos T1, T2, T4 y T5 ( $p < 0,05$ ) (segunda administración) (**Gráfica 8, C**). De esta forma, tras cada administración, la expresión de *MHC-I* aumentó temprano (especialmente tras la primera administración) pero volvió a disminuir, mientras que la expresión génica de *MHC-II* incrementó de forma más progresiva y se encontró más elevada al final de la reexposición.

Tras el análisis de la expresión del *MHC-I*, cabe destacar su aumento brusco tras la primera administración aun siendo MHC-compatibles mientras que lo esperable sería que el organismo no las reconociera como extrañas. Este aumento podría explicarse a que tras la cirugía se produjera un ambiente inflamatorio a nivel local que activará la expresión de este marcador. Sin embargo, en T4 el aumento no fue tan marcado y podría asociarse a cierta tolerancia inmune (Schnabel *et al.*, 2014).

Respecto al *MHC-II*, tras la primera administración también se detectó un aumento de su expresión, y además fue creciente durante el tiempo de interacción entre las MSCs y el organismo. Este aumento inicial podría explicarse por el ambiente inflamatorio desencadenado por la cirugía, de igual forma que para *MHC-I*. Sin embargo, el incremento de expresión del *MHC-*

II detectado a lo largo del tiempo podría explicarse debido a que éste tiene mayor poder inmunogénico que el *MHC-I* y, por lo tanto, una menor tolerancia inmune (Berglund *et al.*, 2017). La expresión de *MHC-II* ha sido analizada *in vitro* en MSCs equinas por (Schnabel *et al.*, 2014), concluyendo que su nivel de expresión depende fundamentalmente del donante, pero también de su estado inmune, de su genética y de la calidad del aspirado de médula. Debido a que las MSCs de los caballos que expresan *MHC-II* estimulan la producción de una respuesta inmune *in vitro*, recomiendan que los animales que vayan a ser donantes alogénicos sean inmunofenotipados para seleccionar aquellos que posean una baja expresión del *MHC-II*. Sin embargo, la expresión del *MHC* en las MSCs puede diferir tras su administración *in vivo*. Broeckx *et al.*, 2019 realizaron un estudio similar con 12 caballos sanos a los que indujeron osteoartritis en la articulación metacarpofalángica. En dicho estudio se administraron intraarticularmente MSCs alogénicas diferenciadas a condrocito con baja expresión para el *MHC-I* y *MHC-II* y la respuesta inflamatoria local fue muy ligera, similar a la inoculación de suero salino. Sin embargo, en este estudio no se valoraron los haplotipos de los donantes y receptores, lo que podría haber aportado más información.



Gráfica 8. Expresión relativa de *VCAM1* (A), *MHC-I* (B) y *MHC-II* (C) a lo largo del tiempo en las MSC-SE en el grupo MHC-compatibile.

### 6. Conclusiones

En las condiciones de nuestro estudio, las conclusiones a las que hemos llegado son las siguientes:

- Respecto al tipo de MSCs (MSC-SE, MSC-E, MSC-C), las MSC-C podrían ser más inmunorreguladoras que las MSC-E *in vivo*, presentando estas últimas el menor perfil inmunomodulador y el más inmunogénico de los tres tipos celulares estudiados.
- En caso de instaurar un tratamiento con MSC-C, la compatibilidad para el MHC parece que no influye en la seguridad del tratamiento e incluso podrían ser más eficaces al presentar mayor perfil inmunomodulador. Por el contrario, en el caso de las MSC-SE, la compatibilidad para el MHC podría afectar a la seguridad y eficacia de dichos tratamientos debido al aumento de su perfil inmunogénico y disminución del inmunomodulador.
- El perfil inmunomodulador e inmunogénico de las MSC-C y MSC-E en los diferentes grupos no se ve influenciado a lo largo del tiempo de exposición *in vivo* de las mismas. Por otro lado, las MSC-SE MHC-compatibles presentan cambios en su perfil inmunogénico en distintos momentos tras la primera administración, sin observarse cambios relevantes en su inmunogenicidad tras la segunda aplicación.
- Como conclusión final, los resultados obtenidos en este estudio *in vivo* sobre el equilibrio inmunomodulación-inmunogenicidad de las MSCs difieren de la mayor parte de los estudios *in vitro* publicados en la especie equina. Por ello, es necesario realizar más estudios *in vivo* para esclarecer la respuesta inmune tras la administración de MSCs alogénicas equinas y así lograr terapias más eficaces y seguras.

## 6. Conclusions

Under the conditions of our study, the following conclusions can be drawn:

- Regarding the type of MSCs (MSC-SE, MSC-E, MSC-C), MSC-C may be more immunoregulatory than MSC-E *in vivo*, the latter having the lowest immunomodulatory profile and the most immunogenic one among the three types of cells studied.
- If a treatment is done with MSC-C, MHC-matching between donor and recipient does not seem to influence the safety of the therapy and it may even be more effective as MSC-C have a higher immunomodulatory profile. In contrast, MHC-mismatching could affect the safety and efficacy of MSC-SE administration because of their increased immunogenic profile and decreased immunomodulatory one.
- The immunomodulatory and immunogenic profiles of MSC-C and MSC-E in the different groups is not influenced by the duration of their exposure to the *in vivo* environment. On the other hand, MHC-matched MSC-SE show changes in their immunogenic profile at different times after the first administration. Nevertheless, no relevant changes in their immunogenic profile were found after the second application.
- As a final conclusion, the results obtained in this *in vivo* study on the equine MSC immunomodulatory-immunogenicity balance differ from most of the published *in vitro* studies in the equine species, highlighting the need of further *in vivo* experiments to understand and manage the immune response after the administration of allogeneic equine MSCs, which will result in more effective and safer therapies.

### 7. Valoración personal

Realizar este trabajo en primer lugar me ha abierto las puertas de un mundo dentro de nuestra profesión: la investigación. En primero de carrera era de las salidas profesionales que menos conocía ya que estaba la clínica, la producción, las oposiciones e incluso los alimentos, pero la investigación, no. Descubrir la cantidad de trabajo que hay detrás de cada avance en las terapias disponibles me ha hecho valorar mucho más las opciones que tenemos a nuestro alcance. Y me he dado cuenta de que para demostrar que algo sucede si haces un cambio, primero tienes que demostrar lo que sucede sin ese cambio, en resumen, la importancia de los controles. Un gran porcentaje de las muestras que analizamos en el laboratorio fueron controles. También he podido reconocer la importancia de la planificación. Gracias a Alina y a sus fantásticos diseños de placas conseguimos avanzar muy rápido en la preparación de las placas de RT-qPCR empleando pipetas multicanales y multidispensadoras.

A parte de todo ello, este TFG me ha enseñado a buscar bibliografía, a seleccionar las fuentes de información fiables, a mejorar mi inglés y a redactar adecuadamente. Además de poder conocer a fondo la inmunomodulación e inmunogenicidad de las MSCs, he aprendido a trabajar en un laboratorio y realizar técnicas como la retrotranscripción y la RT-qPCR, a pipetear, a optimizar el tiempo y, finalmente, a planificarme y organizarme para poder terminarlo en la fecha adecuada.

Finalizada mi valoración personal me gustaría empezar con los agradecimientos.

Primero de todo me gustaría agradecer a mis tutores, Alina y Antonio, por toda su ayuda, por todo el tiempo que han invertido en mí y por hacer que la realización de este trabajo no me haya resultado difícil, sino todo lo contrario, porque siempre que dudaba en algo estaban ahí para responderme. Me gustaría destacar los audios de 2-3 minutos de Alina con sus explicaciones y las correcciones de Antonio: “pon lesiones en lugar de lesión”. Gracias, de corazón.

También me gustaría agradecer a todo el equipo de caballos del Hospital Veterinario de la Universidad de Zaragoza (HVUZ), tanto a los profesores como a los internos de este año y del anterior. No solo por participar en este estudio en lo que respecta a los pasos que se realizaron con los caballos, que doy fe de ello, sino por hacer del HVUZ mi segunda casa en estos dos últimos años. Tampoco me gustaría olvidarme de Laura y Elvira, siempre dispuestas a ayudarme. Quiero agradecer a mi familia por estar siempre conmigo, por apoyarme y por darme ánimos para no rendirme y continuar el camino.

Y, por último, me gustaría agradecer a mis niños, a los que quiero con locura, por ser lo más bonito que tengo y la mejor razón para seguir adelante.

## 8. Bibliografía

- Alvites, R. *et al.* (2022) «Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity—Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential», *Pharmaceutics*, 14(2). doi: 10.3390/pharmaceutics14020381.
- Ankrum, J. A., Ong, J. F. y Karp, J. M. (2014) «Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged», *Nature Biotechnology*, 32(3), pp. 252-260. doi: 10.1038/nbt.2816.
- Barrachina, L. *et al.* (2016a) «Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 182, pp. 74-78. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.10.005.
- Barrachina, L. *et al.* (2016b) «Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, pp. 57-65. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.02.007.
- Barrachina, L. *et al.* (2017) «Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential», *Stem Cells and Development*, 26(1), pp. 15-24. doi: 10.1089/scd.2016.0209.
- Barrachina, L. *et al.* (2018a) «Assessment of effectiveness and safety of repeat administration of proinflammatory primed allogeneic mesenchymal stem cells in an equine model of chemically induced osteoarthritis», *BMC Veterinary Research*, 14(1), pp. 1-17. doi: 10.1186/s12917-018-1556-3.
- Barrachina, L. *et al.* (2018b) «Differentiation of equine bone marrow derived mesenchymal stem cells increases the expression of immunogenic genes», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 200, pp. 1-6. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.04.004.
- Barrachina, L. *et al.* (2018c) «Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse», *Veterinary Journal*, 238, pp. 49-57. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.07.004.
- Barrachina, L. *et al.* (2020) «Allo-antibody production after intraarticular administration of mesenchymal stem cells (MSCs) in an equine osteoarthritis model: Effect of repeated administration, MSC inflammatory stimulation, and equine leukocyte antigen (ELA) compatibility», *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1), pp. 1-12. doi: 10.1186/s13287-020-1571-8.
- Bastos, F. Z. *et al.* (2017) «Collection, processing and freezing of equine bone marrow cells», *Cryobiology*, 78, pp. 95-100. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.06.006.
- Bellas, E. *et al.* (2014) «Equine model for soft-tissue regeneration», *Journal of Biomedical*

*Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 103(6), pp. 1217-1227. doi: 10.1002/jbm.b.33299.

- Berenbaum, F. (2013) «Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)», *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), pp. 16-21. doi: 10.1016/j.joca.2012.11.012.

- Berg, L. C. *et al.* (2009) «Chondrogenic potential of mesenchymal stromal cells derived from equine bone marrow and umbilical cord blood», *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 22(5), pp. 363-370. doi: 10.3415/VCOT-08-10-0107.

- Berglund, A. K. *et al.* (2017) «Immunoprivileged no more: Measuring the immunogenicity of allogeneic adult mesenchymal stem cells», *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), pp. 1-7. doi: 10.1186/s13287-017-0742-8.

- Bertuglia, A. *et al.* (2014) «Epidemiology of musculoskeletal injuries in a population of harness Standardbred racehorses in training», *BMC Veterinary Research*, 10(1), pp. 1-9. doi: 10.1186/1746-6148-10-11.

- Broeckx, S. Y. *et al.* (2019) «The use of equine chondrogenic-induced mesenchymal stem cells as a treatment for osteoarthritis: A randomised, double-blinded, placebo-controlled proof-of-concept study», *Equine Veterinary Journal*, 51(6), pp. 787-794. doi: 10.1111/evj.13089.

- Caffi, V. *et al.* (2020) «Pre-conditioning of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Increases Their Immunomodulatory Capacity», *Frontiers in Veterinary Science*, 7(June), pp. 1-13. doi: 10.3389/fvets.2020.00318.

- Carrade Holt, D. D. *et al.* (2014) «Equine mesenchymal stem cells inhibit T cell proliferation through different mechanisms depending on tissue source», *Stem Cells and Development*, 23(11), pp. 1258-1265. doi: 10.1089/scd.2013.0537.

- Cassano, J. M. *et al.* (2018) «Equine mesenchymal stromal cells from different tissue sources display comparable immune-related gene expression profiles in response to interferon gamma (IFN)- $\gamma$ », *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 202, pp. 25-30. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.06.008.

- Cequier, A. *et al.* (2021) «The usefulness of mesenchymal stem cells beyond the musculoskeletal system in horses», *Animals*, 11(4), pp. 1-28. doi: 10.3390/ani11040931.

- Cequier, A. *et al.* (2022) «Equine Mesenchymal Stem Cells Influence the Proliferative Response of Lymphocytes : Effect of Inflammation , Differentiation and MHC-Compatibility», *Animals*, 12(8), pp. 1-25. doi: 10.3390/ani12080984.

- Colbath, A. C. *et al.* (2017a) «Autologous and Allogeneic Equine Mesenchymal Stem Cells Exhibit Equivalent Immunomodulatory Properties *In Vitro*», *Stem cells and development*, 26(7), pp. 503-511. doi: 10.1089/scd.2016.0266.

- Colbath, A. C. *et al.* (2017b) «Equine Models for the Investigation of Mesenchymal Stem Cell Therapies in Orthopaedic Disease», *Operative Techniques in Sports Medicine*, 25(1), pp. 41-49. doi: 10.1053/j.otsm.2016.12.007.
- Connard, S. S. *et al.* (2021) «Effects of continuous passage on the immunomodulatory properties of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells *in vitro*», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 234(February), p. 110203. doi: 10.1016/j.vetimm.2021.110203.
- Deloitte (2022). II Estudio del Impacto del Sector Ecuestre en España. Disponible en: <https://estudioecuestre.rfhe.com/estudio-completo/> [Consultado 22-06-2022]
- Derveaux, S., Vandesompele, J. y Hellemans, J. (2010) «How to do successful gene expression analysis using real-time PCR», *Methods*, 50(4), pp. 227-230. doi: 10.1016/j.ymeth.2009.11.001.
- Ding, D. C., Shyu, W. C. y Lin, S. Z. (2011) «Mesenchymal stem cells», *Cell Transplantation*, 20(1), pp. 5-14. doi: 10.3727/096368910X.
- Dominici, M. *et al.* (2006) «Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement», *Cytotherapy*, 8(4), pp. 315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Engiles, J. B. *et al.* (2017) «A diagnostic pathologist's guide to carpal disease in racehorses», *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 29(4), pp. 414-430. doi: 10.1177/1040638717710238.
- Fan, X. L. *et al.* (2020) «Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy», *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(14), pp. 2771-2794. doi: 10.1007/s00018-020-03454-6.
- Foo, J. B. *et al.* (2021) «Comparing the Therapeutic Potential of Stem Cells and their Secretory Products in Regenerative Medicine», *Stem Cells International*, 2021. doi: 10.1155/2021/2616807.
- Fortier, L. A. *et al.* (2020) «One health in regenerative medicine: Report on the second Havemeyer symposium on regenerative medicine in horses», *Regenerative Medicine*, 15(6), pp. 1775-1787. doi: 10.2217/rme-2019-0143.
- Glotzbach, J. P. *et al.* (2011) «Regenerative Medicine», *Current Problems in Surgery*, 48(3), pp. 148-212. doi: 10.1067/j.cpsurg.2010.11.002.
- Goodrich, L. R. y Nixon, A. J. (2006) «Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review», *Veterinary Journal*, 171(1), pp. 51-69. doi: 10.1016/j.tvjl.2004.07.008.
- Han, Y. *et al.* (2022) «The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases», *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1). doi: 10.1038/s41392-022-00932-0.

- Van Hecke, L. *et al.* (2021) «Repeated intra-articular administration of equine allogeneic peripheral blood-derived mesenchymal stem cells does not induce a cellular and humoral immune response in horses», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 239(July), p. 110306. doi: 10.1016/j.vetimm.2021.110306.
- Ho, T. *et al.* (2022) «Hydrogels : Properties and Applications in Biomedicine», *Molecules*, 27(9), pp. 1-29. doi: 10.3390/molecules27092902.
- Iacono, E. *et al.* (2015) «Equine Bone Marrow and Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: Cytofluorimetric Characterization, *In Vitro* Differentiation, and Clinical Application», *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(2), pp. 130-140. doi: 10.1016/j.jevs.2014.12.010.
- Kolios, G. y Moodley, Y. (2012) «Introduction to stem cells and regenerative medicine», *Respiration*, 85(1), pp. 3-10. doi: 10.1159/000345615.
- Kondělková, K. *et al.* (2010) «Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders.», *Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové*, 53(2), pp. 73-77. doi: 10.14712/18059694.2016.63.
- Krueel, A. V. S. *et al.* (2021) «Orthobiologics in the treatment of hip disorders», *World Journal of Stem Cells*, 13(4), pp. 304-316. doi: 10.4252/wjsc.v13.i4.304.
- Lee, H. J., Jung, H. y Kim, D. K. (2021) «IDO and CD40 may be key molecules for immunomodulatory capacity of the primed tonsil-derived mesenchymal stem cells», *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). doi: 10.3390/ijms22115772.
- Liang, X. *et al.* (2014) «Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: Current status and perspectives», *Cell Transplantation*, 23(9), pp. 1045-1059. doi: 10.3727/096368913X667709.
- Livak, K. J. y Schmittgen, T. D. (2001) «Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method», *Methods*, 25(4), pp. 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Loeser, R. F. *et al.* (2012) «Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ», *Arthritis and Rheumatism*, 64(6), pp. 1697-1707. doi: 10.1002/art.34453.
- Ma, S. *et al.* (2014) «Immunobiology of mesenchymal stem cells», *Cell Death and Differentiation*, 21(2), pp. 216-225. doi: 10.1038/cdd.2013.158.
- Mao, A. S. y Mooney, D. J. (2015) «Regenerative medicine: Current therapies and future directions», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(47), pp. 14452-14459. doi: 10.1073/pnas.1508520112.
- Mason, C. y Dunnill, P. (2008) «A brief definition of regenerative medicine», *Regenerative Medicine*, 3(1), pp. 1-5. doi: 10.2217/17460751.3.1.1.
- Van Megen, K. M. *et al.* (2019) «Activated mesenchymal stromal cells process and present

antigens regulating adaptive immunity», *Frontiers in Immunology*, 10(APR), pp. 1-10. doi: 10.3389/fimmu.2019.00694.

- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). El sector equino español en 2020: principales magnitudes e indicadores económicos.

- Munn, D. H. y Mellor, A. L. (2016) «IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance», *Trends in Immunology*, 37(3), pp. 193-207. doi: 10.1016/j.it.2016.01.002.

- Murray, R. C. *et al.* (2006) « Association of type of sport and performance level with anatomical site of orthopaedic injury diagnosis», *Equine Veterinary Journal*, 36(S36), pp. 411-416. doi: 10.1111/j.2042-3306.2006.tb05578.x.

- Murray, R. C. *et al.* (2010) «Identification of risk factors for lameness in dressage horses», *Veterinary Journal*, 184(1), pp. 27-36. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.03.020.

- Ortvad, K. F. (2018) «Regenerative Medicine and Rehabilitation for Tendinous and Ligamentous Injuries in Sport Horses», *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 34(2), pp. 359-373. doi: 10.1016/j.cveq.2018.04.012.

- Ozdemir, A. T. *et al.* (2021) «The Effects of Preconditioning with IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10 on Costimulatory Ligand Expressions of Mesenchymal Stem Cells», *International Journal of Medical Biochemistry*, 4(2), pp. 121-130. doi: 10.14744/ijmb.2021.77487.

- Parlamento Europeo y Consejo (2001) "Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano", Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 28 de noviembre de 2001, (311), pp 67-128.

- Parlamento Europeo y Consejo (2007) "Reglamento (CE) nº 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que se modifica la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) nº 726/2004", Diario Oficial de la Unión Europea, 10 de diciembre de 2007, (324), pp. 121-143.

- Pourgholaminejad, A. *et al.* (2016) «The effect of pro-inflammatory cytokines on immunophenotype, differentiation capacity and immunomodulatory functions of human mesenchymal stem cells», *Cytokine*, 85, pp. 51-60. doi: 10.1016/j.cyto.2016.06.003.

- Ramzan, P. H. L. y Palmer, L. (2011) «Musculoskeletal injuries in Thoroughbred racehorses: A study of three large training yards in Newmarket, UK (2005-2007)», *Veterinary Journal*, 187(3), pp. 325-329. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.12.019.

- Ranera, B. *et al.* (2011) «Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1-2), pp. 147-154. doi:

10.1016/j.vetimm.2011.06.033.

- Real Federación Hípica Española (2022). Real Federación Hípica Española. Disponible en: <https://rfhe.com/> [Consultado 22-06-2022]
- Remacha, A. R. *et al.* (2015) «Expression of genes involved in immune response and *in vitro* immunosuppressive effect of equine MSCs», *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 165(3-4), pp. 107-118. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.04.004.
- Ren, G. *et al.* (2008) «Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide», *Cell Stem Cell*, 2(2), pp. 141-150. doi: 10.1016/j.stem.2007.11.014.
- Ribitsch, I. *et al.* (2020) «Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do», *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(August), pp. 1-28. doi: 10.3389/fbioe.2020.00972.
- Ribitsch, I., Oreff, G. L. y Jenner, F. (2021) «Regenerative medicine for equine musculoskeletal diseases», *Animals*, 11(1), pp. 1-30. doi: 10.3390/ani11010234.
- Rowland, A. L. *et al.* (2021) «Cross-matching of allogeneic mesenchymal stromal cells eliminates recipient immune targeting», *Stem Cells Translational Medicine*, 10(5), pp. 694-710. doi: 10.1002/sctm.20-0435.
- Ryan, A. E. *et al.* (2014) «Chondrogenic differentiation increases antidonor immune response to allogeneic mesenchymal stem cell transplantation», *Molecular Therapy*, 22(3), pp. 655-667. doi: 10.1038/mt.2013.261.
- Sadeghi, R. *et al.* (2018) «MHC haplotype diversity in Persian Arabian horses determined using polymorphic microsatellites», *Immunogenetics*, 70(5), pp. 305-315. doi: 10.1007/s00251-017-1039-x.
- De Schauwer, C. *et al.* (2011) «Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity», *Theriogenology*, 75(8), pp. 1431-1443. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.008.
- De Schauwer, C. *et al.* (2014) «Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources», *Stem Cell Research and Therapy*, 5(1), pp. 1-13. doi: 10.1186/scrt395.
- Schnabel, L. V. *et al.* (2013) «Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when?», *Veterinary Journal*, 197(3), pp. 570-577. doi: 10.1016/j.tvjl.2013.04.018.
- Schnabel, L. V. *et al.* (2014) «Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response *in vitro*», *Stem Cell Research and Therapy*, 5(1), pp. 1-13. doi: 10.1186/scrt402.
- Sethu, S. *et al.* (2012) «Immunogenicity to biologics: Mechanisms, prediction and reduction»,

*Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 60(5), pp. 331-344. doi: 10.1007/s00005-012-0189-7.

- Singh, C. y Roy-Chowdhuri, S. (2016) «Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances», *Methods in Molecular Biology*, 1392, pp. 161-176. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0.

- Stewart, M. C. y Stewart, A. A. (2011) «Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action», *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 27(2), pp. 243-261. doi: 10.1016/j.cveq.2011.06.004.

- Su, J. *et al.* (2014) «Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species», *Cell Death and Differentiation*, 21(3), pp. 388-396. doi: 10.1038/cdd.2013.149.

- Torricelli, P. *et al.* (2011) «Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses», *International Orthopaedics*, 35(10), pp. 1569-1576. doi: 10.1007/s00264-011-1237-3.

- Voleti, P. B., Buckley, M. R. y Soslowsky, L. J. (2012) «Tendon healing: Repair and regeneration», *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14, pp. 47-71. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150122.

- Wang, Y. *et al.* (2022) «Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: A Novel Intervention Mechanism in Cardiovascular Disease», *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(January), pp. 1-16. doi: 10.3389/fcell.2021.742088.

- Watts, A. E., Ackerman-Yost, J. C. y Nixon, A. J. (2013) «A comparison of three-dimensional culture systems to evaluate *in vitro* chondrogenesis of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells», *Tissue Engineering - Part A*, 19(19-20), pp. 2275-2283. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0479.

- van Weeren, P. R. y Back, W. (2016) «Musculoskeletal Disease in Aged Horses and Its Management», *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 32(2), pp. 229-247. doi: 10.1016/j.cveq.2016.04.003.