



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice

1	Resumen / <i>abstract</i>	1
2	Introducción	1
3	Justificación y objetivos	3
4	Metodología.....	4
5	Resultados y discusión	4
5.1	Definición y clasificación de las células madre	4
5.2	Caracterización de las MSCs	5
5.2.1	Inmunofenotipo	5
5.2.2	Multipotencia.....	6
5.3	Fuentes y cultivo de las MSCs	7
5.4	Mecanismos de acción terapéutica de las MSCs	7
5.4.1	Migración, integración y diferenciación	8
5.4.2	Acción paracrina.....	8
5.4.2.1	Efectos tróficos.....	8
5.4.2.2	Efecto anti-fibrótico	9
5.4.2.3	Quimioatracción	10
5.4.2.4	Inmunomodulación.....	10
5.5	Aplicaciones terapéuticas	11
5.5.1	Oftalmología.....	11
5.5.1.1	Úlceras corneales y queratitis ulcerativa	12
5.5.1.2	Uveítis recurrente equina	13
5.5.1.3	Queratitis inmunomediada equina	14
5.5.2	Reproducción	15
5.5.2.1	Endometritis.....	15
	• Endometritis persistente inducida por el servicio	16
	• Endometriosis.....	16
5.5.2.2	Otras aplicaciones de MSCs en el aparato reproductor equino	18
	• Patologías ováricas	18
	• Patologías testiculares.....	18
5.5.3	Sistema tegumentario	18
5.5.3.1	Heridas	18
5.5.3.2	Úlceras de decúbito	20
5.5.3.3	Laminitis.....	21

5.5.4	Desórdenes metabólicos.....	22
5.5.4.1	Síndrome metabólico equino.....	22
5.5.5	Sistema respiratorio	23
5.5.5.1	Asma equino	23
5.5.6	Neurología.....	24
5.5.6.1	Daño en los nervios periféricos.....	24
5.5.6.2	Síndrome de Wobbler	25
5.5.6.3	Hemiplejía laríngea o neuropatía laríngea recurrente	26
6	Conclusiones / <i>conclusions</i>	26
7	Valoración personal.....	27
8	Bibliografía	27

1 Resumen / abstract

El potencial terapéutico de las células madre mesenquimales (MSCs) se basa en sus propiedades únicas, ejercidas principalmente mediante mecanismos paracrinós que incluyen efectos tróficos e inmunomoduladores. En la clínica equina, las MSCs se han usado preferentemente en el tratamiento de patologías del aparato locomotor. Aunque estas lesiones son de las más frecuentes, la alteración de otros sistemas tiene también gran relevancia en estos animales, pudiendo ser algunas de estas patologías además buenos modelos para la medicina humana. Por ello, el objetivo de este trabajo fin de grado es conocer el uso actual de MSCs equinas en patologías diferentes a las del sistema músculo-esquelético mediante una revisión bibliográfica.

Las MSCs equinas se han empleado en oftalmología, reproducción, sistema tegumentario, desórdenes metabólicos y procesos respiratorios y neurológicos, habiéndose realizado mayores avances en las patologías corneales, las heridas y la endometritis. Aunque se han observado resultados prometedores, se requiere mayor investigación antes de que un tratamiento efectivo y seguro esté disponible, resultando fundamental un mayor conocimiento sobre los mecanismos de acción de las MSCs.

The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSCs) is based on their unique properties, mainly exerted by paracrine mechanisms that include trophic and immunomodulatory effects. In equine practice, MSCs have been mostly used in the treatment of musculoskeletal injuries. Even though these lesions are among the most frequent in horses, the alteration of other systems also has great relevance, and some of these pathologies can also be a good model for human medicine. Therefore, the objective of this final degree dissertation is to provide an update on the use of equine MSCs in pathologies other than those of the musculoskeletal system through a literature review.

Equine MSCs have been used in ophthalmology, reproduction, tegumentary system, metabolic disorders, respiratory and neurological processes. The greatest advancement has been made in corneal pathologies, wounds and endometritis. While promising results have been observed, more research is needed before effective and safe treatments are available, for which greater knowledge of the MSC mechanisms of action is essential.

2 Introducción

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, la población mundial de équidos se estima en 58 millones de animales, de los cuales el porcentaje dedicado al ocio y al deporte sigue creciendo. España, país ligado históricamente al caballo, cuenta con un censo de más de 600.000 animales en 2020, según datos del Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, siendo así el 4º país europeo con mayor número de équidos. Además de esta relevancia cuantitativa, la industria equina es un sector de gran importancia económica, representando el 0'51% del PIB español (Real Federación Hípica Española, 2013).

Debido a la ya mencionada dedicación deportiva, las patologías del aparato musculo-esquelético son de gran importancia en la especie equina, suponiendo cerca del 82% de los problemas relacionados con la disminución de rendimiento en caballos de carreras (Torricelli *et al.*, 2011). La limitada capacidad de reparación de tendones, ligamentos y cartílago articular ha llevado a que, en los últimos años, hayan cobrado especial importancia las terapias biológicas avanzadas (Stewart & Stewart, 2011), más conocidas como medicina regenerativa. Estas nuevas terapias están orientadas a restaurar o restablecer la estructura y funciones normales de un órgano o tejido utilizando los propios mecanismos del cuerpo (Reddie, 2003). Según lo indicado en la legislación (Reglamento (CE) nº 1394/2007; Directiva 2001/83/CE), dichas terapias avanzadas se pueden dividir en terapias génicas (basadas en ácidos nucleicos recombinantes), terapias celulares (basadas en células somáticas sometidas a ciertas manipulaciones, como el cultivo celular) e ingeniería de tejidos (basada en tejidos y células manipulados mediante ingeniería), así como las combinaciones de las anteriores. Las células madre mesenquimales (MSCs, de sus siglas en inglés *mesenchymal stem cells*) son células troncales multipotentes, obtenidas del individuo adulto. Por sí solas, entrarían en la clasificación de terapia celular, pero son también de gran interés para las estrategias de ingeniería tisular (Li *et al.*, 2019).

Inicialmente, el uso de las MSCs estaba justificado por su habilidad para diferenciarse en varios tipos celulares e integrarse en la arquitectura tisular, considerándose que promovían así una regeneración directa del tejido dañado. Sin embargo, varios estudios han demostrado que estas células producen mejora funcional sin necesidad de integración (Stewart & Stewart, 2011), ya que presentan también otras propiedades, que ejercen principalmente de forma paracrina, mediante la síntesis de diversas moléculas bioactivas con capacidad trófica, anti-fibrótica, quimioatrayente e inmunomoduladora (da Silva Meirelles *et al.*, 2009). El descubrimiento de estas propiedades ha supuesto un gran cambio en la visión que se tenía acerca de las MSCs, lo que ha permitido aumentar el rango de sus aplicaciones terapéuticas (De Schauwer *et al.*, 2013).

El primer trabajo publicado basado en la aplicación terapéutica de MSCs en la especie equina data de 2003 y tenía por objetivo el tratamiento de lesiones tendinosas en caballos de deporte (Smith *et al.*, 2003). Desde entonces, la investigación y uso de dichas células ha crecido enormemente en todo el mundo, principalmente enfocadas al tratamiento de patologías musculo-esqueléticas equinas (Stewart & Stewart, 2011). A pesar de la relevancia del aparato locomotor en esta especie, estos animales también sufren con frecuencia diversas patologías relacionadas con otros sistemas, como el síndrome abdominal agudo, úlceras corneales, heridas o problemas reproductivos, como la endometriosis, entre otros, que también suponen un importante impacto económico y para el bienestar animal (Horseman *et al.*, 2016). Las actuales estrategias terapéuticas para diversas patologías están limitadas por la anatomía y la fisiología del caballo, como en el caso de las heridas, cuya curación se dificulta frecuentemente con complicaciones como la excesiva formación de tejido cicatricial o la dehiscencia, (Theoret *et al.*, 2013) o pueden basarse únicamente en medidas paliativas, como la administración de corticosteroides en procesos inmunomediados como el asma, cuyo uso continuado además acarrea problemas secundarios (Couëtil *et al.*, 2016).

En contraste con el uso mayoritario de las MSCs en patologías del aparato locomotor equino, en medicina humana dichas células se emplean para tratar patologías en una amplia variedad de sistemas (Borjesson & Peroni, 2011). Como muestra, a día 25 de agosto de 2020 existen 1172 ensayos clínicos en distintas fases para evaluar la aplicación de estas células en diversas enfermedades, como diabetes *mellitus*, infartos de miocardio o cirrosis, entre otros (<http://www.clinicaltrials.gov>). Es importante destacar que numerosas patologías infecciosas y autoinmunes, alergias y atopias comparten similar etiopatogenia entre los seres humanos y los animales domésticos (Gershwin, 2007). En el caso del caballo, la *Food and Drug Administration* de los Estados Unidos (FDA) concluyó que esta especie es el modelo animal más apropiado para evaluar los efectos de las terapias celulares para el tratamiento del cartílago articular, lo que también explica parte del interés despertado por este campo de investigación en el caballo. Pero además, también se ha propuesto al caballo como un interesante modelo para otras patologías como el asma (Bullone & Lavoie, 2015) o la uveítis recurrente (Witkowski *et al.*, 2016). Por ello, la medicina equina puede aprender de la humana, a la vez que los caballos pueden ser un modelo de gran valor para evaluar la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos, sin limitarse solo al aparato locomotor.

Gracias a la mencionada similitud surge el concepto de *One Medicine* y la rama de la medicina comparativa, que persigue trasladar los resultados obtenidos en una especie para el beneficio de otras (Gyles, 2016). De esta forma, los datos generados en los estudios de medicina humana podrían extrapolarse a la clínica equina y aumentar el rango de patologías en las que emplear las MSCs en esta especie. Junto a esto, los avances en el conocimiento de la biología y los mecanismos de acción de las MSCs derivados de su aplicación en patologías del aparato locomotor abren un nuevo camino para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas en multitud de patologías equinas.

3 Justificación y objetivos

Aunque las patologías del sistema locomotor tienen gran importancia en los caballos, no son las únicas relevantes en la clínica equina, existiendo diversos desórdenes sin un tratamiento definitivo. Este hecho, junto con el valor del caballo como modelo de enfermedades humanas, ha derivado en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. Gracias a sus propiedades, especialmente sus efectos paracrinos, las MSCs podrían llevar a cabo este papel. Por tanto, el objetivo de este trabajo es revisar el estado actual, las aplicaciones, las limitaciones y las futuras proyecciones de la aplicación de las MSCs en patologías equinas diferentes a las del sistema locomotor. Para ello, se realizará una revisión bibliográfica planteando los siguientes objetivos específicos:

1. Describir los mecanismos de acción y propiedades atribuidas a las MSCs
2. Identificar en qué patologías puede ser relevante el uso de MSCs de acuerdo a estos mecanismos
3. Revisar el avance científico realizado para el tratamiento de cada una de estas patologías, sus limitaciones, y su posible aplicación como modelo en medicina humana.

4 Metodología

La estrategia empleada para alcanzar los objetivos propuestos ha consistido en la revisión de bibliografía sobre el uso de MSCs en patologías equinas no relacionadas con el sistema locomotor, para lo cual se han consultado libros especializados, artículos científicos, actas de congresos y trabajos académicos. Las herramientas empleadas para la búsqueda de la información han sido bases de datos como Web of Science, Pubmed, Elsevier y Google Scholar. Las principales palabras clave han sido: "equine", "mesenchymal stem cells" y "cell therapy". A partir de los resultados encontrados, se amplió la búsqueda a términos más concretos relacionados con las distintas aplicaciones, como "uveitis", "endometrosis", "asthma", "wounds", "metabolic syndrome" o "recurrent laryngeal nerve". Solo se ha consultado bibliografía redactada en inglés o en español y publicada a partir del 2010, aunque se han incluido algunas citas más antiguas debido a su relevancia. Asimismo, en algunos puntos también se ha incluido bibliografía relevante en otros modelos animales y medicina humana para cubrir los aspectos menos conocidos en la especie equina. Finalmente, para la administración de las citas bibliográficas se ha empleado el gestor bibliográfico "Mendeley".

5 Resultados y discusión

5.1 Definición y clasificación de las células madre

Las células madre son células indiferenciadas, presentes en distintos tejidos y fases de desarrollo, que poseen gran capacidad de autorrenovación y proliferación, además de un potencial de diferenciación en un amplio rango de tipos celulares (Stewart & Stewart, 2011). Debido a su variedad, existen distintas formas de clasificarlas, siendo las más comunes las que se refieren a su potencial de diferenciación y a su origen (Kalra & Tomar, 2014).

Atendiendo a su capacidad de diferenciación, de mayor a menor potencial, las células madre se pueden dividir en totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes. Así, las células totipotentes son aquellas con potencial para diferenciarse en un organismo vivo completo, dando lugar a células de cualquiera de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo) e incluyendo estructuras extraembrionarias como la placenta. Las células madre pluripotentes pueden diferenciarse en células de las tres capas germinales, mientras que las células madre multipotentes están restringidas a los distintos tipos celulares dentro de una de las capas germinales. Finalmente, las células oligopotentes y las unipotentes pueden dar lugar a unos pocos o a un único tipo celular, respectivamente (Kalra & Tomar, 2014).

Por otra parte, según la fase de desarrollo del organismo, las células madre se pueden agrupar en células embrionarias o células adultas, conforme estén presentes en la masa celular de la mórula y del blastocisto o en los tejidos del cuerpo, respectivamente (Wang & Zhao, 2013). Las células embrionarias pueden diferenciarse en cualquier tipo de célula adulta, siendo totipotentes o pluripotentes según el estadio de desarrollo embrionario, mientras que las células madre adultas poseen diferente potencial de diferenciación, pudiendo ser multipotentes, oligopotentes o unipotentes. La función de las células madre adultas es mantener el tejido o el

órgano donde se encuentran, para lo cual existen varios tipos celulares: células madre mesenquimales, hematopoyéticas, intestinales, neurales, hepáticas, del hueso o del cartílago, pancreáticas, oculares y epidérmicas (revisado por Prochazkova *et al.*, 2015).

Un tipo especial en esta clasificación son las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs, del inglés *induced pluripotent stem cells*), que no están presentes de forma natural en el organismo sino que son fruto de la intensa investigación en el campo de las células madre, lo cual ha permitido reprogramar células adultas diferenciadas, como por ejemplo los fibroblastos, en células madre pluripotentes, mediante la introducción de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (Nagy *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha descrito que pueden formar teratomas y su uso por ahora se centra en generar modelos *in vitro* (Bressan *et al.*, 2020).

Con base a la clasificación expuesta, las MSCs se consideran células madre adultas multipotentes que derivan de la capa embrionaria del mesodermo, lo cual las hace capaces de diferenciarse a distintas células originarias de esta capa, como adipocitos, condrocitos y osteoblastos, entre otros (Wang & Zhao, 2013).

5.2 Caracterización de las MSCs

Las MSCs fueron descritas por primera vez en 1970 en células del bazo y de la médula ósea de conejillos de Indias por Friedenstein, que las denominó “unidades formadoras de colonias con morfología fibroblástica” (CFU-F) por sus propiedades observadas *in vitro* (Friedenstein, *et al.*, 1970). En 2006, debido a la dificultad de comparación y estandarización de los ensayos clínicos realizados hasta entonces, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, de sus siglas en inglés *International Society of Cellular Therapy*) propuso los requisitos que las células madre humanas deben cumplir para ser consideradas como MSCs: deben ser adherentes al plástico del sistema de cultivo, expresar determinados marcadores de superficie (inmunofenotipo) y ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006). Aunque estos criterios se establecieron en un intento de estandarizar el uso de las MSCs, los estudios han ido desvelando que son una población muy heterogénea, presentando variaciones entre especies e incluso entre los distintos tejidos de una misma especie (Tárnok, 2010). Por ello, es importante caracterizar las MSCs de especies y fuentes de interés, con el fin de identificarlas correctamente antes de su aplicación terapéutica.

5.2.1 Inmunofenotipo

El inmunofenotipo es el conjunto de marcadores o antígenos expresados en la superficie de las células, identificados normalmente por medio de un panel de anticuerpos mediante citometría de flujo (Wang & Lebrech, 2017). Teniendo en cuenta que las MSCs son una población heterogénea, la ISCT propuso que más del 95% de la población de MSCs debe expresar las moléculas CD105 (endoglina), CD73 (ecto-5' nucleotidasa) y CD90 (Thy-1). Además, menos de un 2% de las células deben expresar CD45 (marcador de leucocitos), CD34 (marcador hematopoyético), CD14 o CD11b (marcadores de macrófagos), CD79a o CD19 (marcadores de linfocitos B) y el antígeno leucocitario humano (HLA, de sus siglas en inglés *human leukocyte antigen*) tipo II (Dominici *et al.*, 2006).

Aunque los criterios establecidos por la ISCT se refieren a las MSCs humanas, el interés de estas células se extiende también a modelos animales en investigación y a su aplicación en la clínica veterinaria. Por ello, en un intento de estandarización, la caracterización de las MSCs de distintas especies animales, incluida la equina, ha seguido los mismos criterios que los empleados en las MSCs humanas. Sin embargo, caracterizar el inmunofenotipo en esta especie se ha visto limitado por la escasez de anticuerpos monoclonales comerciales específicos (Pascucci *et al.*, 2011). Además de por citometría de flujo, la expresión génica de estos marcadores puede ser detectada cuantitativamente mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), por lo que la combinación de ambas técnicas podría facilitar el estudio del inmunofenotipo de las MSCs equinas (Radcliffe *et al.*, 2010).

Numerosos estudios han demostrado que las MSCs equinas expresan de forma variable otros marcadores de superficie, como CD29 (integrina beta 1), CD44 (H-CAM), CD146 (MCAM o molécula de adhesión celular de melanoma) o CD117 (KIT), entre otros. Estas diferencias se han atribuido a los distintos métodos empleados en la obtención, aislamiento y cultivo, así como a las enzimas empleadas para la digestión de los tejidos en el aislamiento celular (Radcliffe *et al.*, 2010; Ranera *et al.*, 2011). A nivel de expresión génica también se han observado diferencias, como por ejemplo en la expresión de CD34, significativamente mayor en MSCs derivadas del tejido adiposo respecto a las derivadas de médula ósea, pese a ser un marcador considerado negativo (Ranera *et al.*, 2011). En un intento de estandarizar los resultados obtenidos en las diversas investigaciones realizadas, en 2011 De Schauwer *et al.* propusieron que las MSCs equinas debían ser positivas para CD29, CD44 y CD90 y negativas para CD14, CD79 y MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad II). Aunque todavía 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.

5.2.2 Multipotencia

Según los criterios ya citados, las MSCs deben ser capaces de diferenciarse a células del linaje mesodérmico, considerándose como criterio mínimo la diferenciación tri-linaje a osteoblastos, condrocitos y adipocitos cuando se encuentran en las condiciones adecuadas. Además, las MSCs equinas son capaces de diferenciarse en otras células del mesodermo, como miocitos o hepatocitos, y se ha observado *in vitro* la transdiferenciación a tipos celulares de otros linajes como las neuronas (Al Naem *et al.*, 2019). La capacidad de diferenciación tri-linaje se ha confirmado en las MSCs equinas de distintos orígenes como médula ósea, tejido adiposo o cordón umbilical (Barberini *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha observado que dicha capacidad es heterogénea según las fuentes. La capacidad de diferenciación osteogénica de las MSCs es mayor en las células obtenidas de médula ósea (BM-MSCs, *bone marrow MSCs*), mientras que la diferenciación a condrocitos es superior en aquellas procedentes del cordón umbilical (UC-MSCs, *umbilical cord MSCs*) (Burk *et al.*, 2013). Además, las BM-MSCs y las MSCs obtenidas del tejido adiposo (AT-MSCs, *adipose tissue MSCs*) presentan una capacidad de diferenciación más rápida (Barberini *et al.*, 2014).

5.3 Fuentes y cultivo de las MSCs

Las MSCs están presentes en numerosos tejidos y fluidos del organismo de los équidos, como médula ósea, tejido adiposo, músculo y periostio, sangre (PB-MSCs, *peripheral blood MSCs*), tejidos dentales, tendón, membrana y líquido sinoviales, endometrio y folículos capilares, entre otros (revisado por Gugjoo *et al.*, 2019). Además, también pueden encontrarse en tejidos perinatales, como en el cordón umbilical, en su sangre (UCB-MSCs, *umbilical cord blood MSCs*) o en la gelatina de Wharton (Iacono *et al.*, 2012a), así como en la membrana amniótica (Lovati *et al.*, 2011). De hecho, se considera que pueden encontrarse prácticamente en cualquier tejido (da Silva Meirelles, 2006). A pesar de la amplia variedad de fuentes, no todas son adecuadas para su aplicación clínica. En la actualidad, las fuentes más investigadas y utilizadas en la especie equina son la médula ósea y el tejido adiposo, debido a su abundancia y a la facilidad de acceso a ellas. Sin embargo, la sangre periférica y los tejidos perinatales están generando interés debido a que son fuentes no invasivas. Además, las MSCs obtenidas de tejidos perinatales son menos inmunogénicas, lo que las haría más apropiadas para su aplicación alogénica (Tessier *et al.*, 2015).

El proceso de obtención de las BM-MSCs en caballos comienza mediante la extracción de médula ósea del esternón o del ilion (Lombana *et al.*, 2015), mientras que el tejido adiposo se obtiene de la zona subcutánea supragluteal (de Mattos Carvalho *et al.*, 2009). Si las MSCs provienen de muestras líquidas se aíslan mediante protocolos basados en centrifugación en gradiente de densidad, mientras que si provienen de fuentes sólidas es necesario emplear digestión enzimática y mecánica para una óptima separación de células. Tras el aislamiento, comienzan a observarse colonias de células adherentes, que van cubriendo progresivamente la placa de cultivo hasta que confluyen, momento en el que se siembran en nuevas placas a menor densidad. Este procedimiento, llamado pase, se repite hasta obtener las células necesarias (Barrachina *et al.*, 2018).

Las MSCs se cultivan utilizando medios de cultivo celulares, como *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), a los que se añaden concentraciones variables de suero fetal bovino (SFB), factores de crecimiento, antibióticos y aminoácidos como glutamina (Pall *et al.*, 2016). El SFB contiene hormonas, nutrientes, proteínas de adhesión y factores de crecimiento, pero su uso plantea una serie de limitaciones éticas y de heterogeneidad entre lotes que han llevado al estudio nuevas opciones, como el lisado plaquetario, suero autólogo o medios *serum-free* comerciales (Schwarz *et al.*, 2012).

5.4 Mecanismos de acción terapéutica de las MSCs

Al igual que ocurre en medicina humana, en medicina equina las MSCs son frecuentemente las células de elección en las terapias avanzadas, debido a su facilidad de aislamiento y cultivo, su carácter multipotencial y su habilidad para migrar al tejido dañado (Da Silva Meirelles *et al.* 2009), pero principalmente por su capacidad de promover la reparación y regeneración de tejidos, de evitar la formación de fibrosis cicatricial y de modular la respuesta inmune y la inflamación (De Schauwer *et al.*, 2013). Numerosos estudios *in vivo* han demostrado el potencial terapéutico de las MSCs, pero sus mecanismos actuales aun son objeto de investigación. Al contrario de lo que se creía inicialmente, las MSCs no necesitan integrarse o diferenciarse en células de un tejido concreto

para ejercer sus acciones beneficiosas, lo que incrementa la variedad de potenciales usos terapéuticos en los que se pueden emplear (Stewart & Stewart, 2011).

5.4.1 Migración, integración y diferenciación

Las MSCs son capaces de migrar hacia los tejidos dañados cuando son administradas de forma sistémica (da Silva Meirelles, 2008), propiedad que se atribuye a la expresión de diversos factores de crecimiento, quimioquinas y receptores de la matriz extracelular localizados en su superficie celular. La migración de las MSCs mediada por estos factores es dosis-dependiente y está estimulada por la citoquina pro-inflamatoria TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), lo que permite a las MSCs dirigirse a los lugares donde se ha producido inflamación (Roddy *et al.*, 2011).

Además, las MSCs son capaces de unirse al endotelio, ya que en situación de daño tisular, las células endoteliales expresan la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1 o CD106) y la E-selectina (CD62E), que son ligandos de ciertas moléculas de superficie expresadas por las MSCs: CD29 y CD44, respectivamente (Rüster *et al.*, 2006). CD44 también es capaz de unirse a la osteopontina, sintetizada por los osteocitos bajo condiciones de hipoxia (Raheja *et al.*, 2008) y al hialuronano, incrementado en casos de fallo renal (Herrera *et al.*, 2007), de lo que se deduce que CD44 es una molécula de gran importancia en la migración y anidamiento de las MSCs. Sin embargo, pese a la capacidad de migración de las MSCs, debe tenerse en cuenta que su administración intravenosa puede resultar en el secuestro de las MSCs en el pulmón en las horas siguientes a la administración (Eggenhofer *et al.*, 2012).

Una vez que las MSCs han llegado al tejido dañado, ya sea migrando o bien porque se las administra de forma local, se ha observado que no permanecen durante un largo tiempo en dicha localización (Eggenhofer *et al.*, 2012), lo que puede limitar su capacidad terapéutica (Ankrum, 2014). Por ello, la tendencia clásica a considerar que las MSCs implantadas o inyectadas colonizan el tejido dañado, diferenciándose en los tipos celulares y actuando directamente en la regeneración, no refleja completamente sus capacidades terapéuticas.

5.4.2 Acción paracrina

A pesar de que se sigue considerando que los mecanismos de integración y diferenciación participan en la acción terapéutica de las MSCs, la investigación llevada a cabo en los últimos años ha resaltado la relevancia de otras propiedades de las MSCs, ejercidas principalmente mediante su acción paracrina (Stewart & Stewart, 2011) (Figura 1). Dicha acción se lleva a cabo mediante la liberación por parte de las células de diversos mediadores, cuyos efectos se pueden dividir en tróficos, anti-fibróticos o anti-cicatriciales, quimioatrayentes e inmunomoduladores. A su vez, los efectos tróficos pueden subdividirse en anti-apoptóticos, de soporte (estimulación de la mitosis, proliferación y diferenciación de las células progenitoras propias del órgano o tejido) y angiogénicos.

5.4.2.1 Efectos tróficos

La apoptosis es un tipo de muerte celular regulada por mecanismos intrínsecos de las propias células (Wyllie, 2010). Las MSCs son capaces de disminuir el grado de esta muerte celular, lo que se ha observado en

diversos modelos animales (Chen *et al.*, 2018; Chang *et al.*, 2020). Las moléculas que se han visto implicadas en este mecanismo son el factor de crecimiento endotelial (VEGF), el factor de crecimiento hepatocítico (HCG) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), los cuales mejoran la supervivencia celular (Tögel *et al.*, 2007). Otros factores anti-apoptóticos son la estaniocalcina-1 (Block *et al.*, 2009), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), el factor básico de crecimiento fibroblástico (bFGF o FGF2) y el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Además, se ha observado que la expresión de estas moléculas por las MSCs aumenta bajo condiciones de hipoxia, como las producidas en un primer estadio de daño tisular, lo que podría ayudar a controlar las lesiones en sus fases iniciales (Liu *et al.*, 2010).

En cuanto a los efectos de estimulación del crecimiento celular y proliferación, las MSCs son capaces de secretar moléculas responsables del reclutamiento y mantenimiento de precursores de las células del tejido dañado. Algunas de estas moléculas son el factor de células madre (SCF), el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1 o CXCL12), el factor inhibidor de leucemia (LIF), la interleucina 6 (IL-6) y el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF) (Kocan *et al.*, 2017). De este modo, más allá de diferenciarse en células e integrarse en los tejidos dañados, las MSCs reclutan y mantienen a otras células progenitoras mediante la secreción de mediadores.

Los efectos pro-angiogénicos se consideran de gran importancia, ya que el restablecimiento del riego sanguíneo es fundamental para la recuperación de los tejidos dañados (da Silva Meirelles *et al.*, 2009). En esta función intervienen moléculas como bFCG, VEGF, factor de crecimiento placentario (PlGF) y proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) (Kinnaird *et al.*, 2004). También intervienen algunos de los factores anti-apoptóticos mencionados anteriormente, que inhiben la muerte de las células endoteliales en condiciones de hipoxia (Hung *et al.*, 2007). Además de estos factores solubles, las MSCs proveen de componentes de la matriz extracelular, que sirven de sustrato para las células endoteliales que formarán los nuevos vasos sanguíneos (Sorell, 2009).

Además de sus propiedades de regeneración tisular, es interesante resaltar el potencial antimicrobiano de las MSCs equinas, capaces de inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. aureus*, bacterias comúnmente presentes en heridas, y de secretar factores que comprometan la integridad de la membrana de estos microorganismos (Cortés-Araya *et al.*, 2018; Harman *et al.*, 2017).

5.4.2.2 Efecto anti-fibrótico

Lo ideal durante la reparación de un daño tisular es la formación de tejido de características similares al original y que sea capaz de restaurar la funcionalidad anterior (Theoret & Wilmink, 2013). Aunque el efecto anti-fibrótico de las MSCs se ha demostrado en varios modelos animales, todavía no se conocen exactamente los mecanismos moleculares responsables. En la mayoría de los casos, la administración de las MSCs solo es efectiva si se realiza tempranamente, antes de que se haya establecido una fibrosis excesiva (Da Silva Meirelles, 2009). Parece ser que, en situación de daño tisular, las MSCs perivasculares proliferan y secretan las moléculas

bFGF y HGF, las cuales contribuyen a evitar la fibrosis exagerada. Estos factores, junto con la producción de moléculas inmunosupresoras que regulan la actividad de las células inflamatorias como la prostaglandina E2 (PGE2), la interleucina-10 (IL-10) y el óxido nítrico (NO), disminuyen el proceso de fibrosis. Otra molécula que se ha visto implicada en este efecto es la adrenomedullina (Seo & Jung, 2016).

5.4.2.3 Quimioatracción

Las MSCs secretan una amplia variedad de moléculas que favorecen el reclutamiento y regulación de diversas células, muchas de las cuales se encuentran involucradas en el proceso de inflamación. Algunas de estas moléculas quimioatrayentes son los ligandos de quimiocinas CC (CCL), como CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1a) o CCL4 (MIP-1b), y los ligandos de quimiocinas CXC (CXCL), como CX3CL1 (fractalquina), CXCL5 (ENA-78) o CXCL1 (GRO α), entre otras (da Silva Meirelles *et al.*, 2008). Estas moléculas son capaces de influir en las funciones de proliferación, maduración, activación o producción de citoquinas de diversas células inmunes, (como monocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfocitos T y B, células *natural killer* (NK), células dendríticas y progenitores hematopoyéticos y endoteliales).

5.4.2.4 Inmunomodulación

Actualmente, los mecanismos exactos por los cuales las MSCs ejercen un efecto inmunomodulador no están del todo claros. Además de la secreción de factores solubles, los mecanismos de contacto directo con la células inmunes también parecen estar implicados (Stewart & Stewart, 2011).

La constatación de los efectos inmunomoduladores de las MSCs se produjo al observar su capacidad de inhibir la proliferación de los linfocitos T (Martinet *et al.*, 2009) y de evitar la lisis producida por los linfocitos T citotóxicos (Rasmusson *et al.*, 2007). Además de estas acciones, las MSCs tienen la capacidad de suprimir la activación de las células NK (Sotiropoulou *et al.*, 2006), y de modular la acción de las células dendríticas (Aggarwal & Pittenger, 2005) y de los macrófagos (Németh *et al.*, 2009). Aunque aun se desconocen la mayoría de los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen un efecto supresor sobre los linfocitos B, son capaces de inhibir (Asari, *et al.*, 2009) o promover (Traggiai *et al.*, 2008) su proliferación, según su concentración sea mayor o menor, respectivamente, así como de inhibir la producción de inmunoglobulinas (Rafei *et al.*, 2008).

El número de mediadores secretados por las MSCs que está descrito que participan en su función inmunomoduladora aumenta cada vez más y varían entre especies e incluso entre tejidos de origen (Ren *et al.*, 2009). De los conocidos actualmente, destacan PGE-2, TGF- β , HGF, la indoleamina 2,3- dioxigenasa (IDO), la enzima sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), IL-6, IL-10, LIF, HLA-G y la proteína inducida por TNF α 6 (TSG-6). Para liberar estos factores inmunomoduladores, las MSCs requieren ser activadas mediante exposición a factores pro-inflamatorios, como el interferón gamma (IFN- γ), TNF- α , IL-1 o lipopolisacáridos liberados por bacterias, que promueven tanto la migración de estas células al sitio donde se localiza el daño tisular como la secreción por parte de las mismas de moléculas inmunomoduladoras (Shi *et al.*, 2012).

En la especie equina, las BM-MSCs y UCB-MSCs producen NO, mientras que las AT-MSCs no secretan niveles significativos de esta molécula. También varía la manera en que las MSCs equinas de distintos orígenes inhiben la proliferación de los linfocitos T, ya que mientras las BM-MSCs y las UCB-MSCs detienen el ciclo celular, las AT-MSCs y las UC-MSCs inducen su apoptosis (Carrade *et al.*, 2012). Sin embargo, a pesar de presentar mecanismos diferentes, la capacidad inmunomoduladora es similar entre las MSCs equinas de distintos orígenes cuando son expuestas a estímulos inflamatorios (Cassano *et al.*, 2018).

Debido a la ya mencionada evidencia de que las MSCs requieren de una exposición a mediadores pro-inflamatorios para activar sus propiedades inmunomoduladoras, el ambiente donde son administradas influye de gran manera en su función. Por ello, conocer las moléculas presentes en un entorno inflamatorio y los mediadores secretados por las MSCs en respuesta es fundamental para optimizar la aplicación terapéutica. Sin embargo, muchas veces identificar las moléculas responsables se ve dificultado por la complejidad de las interacciones entre las MSCs y las células inmunes (Barrachina *et al.*, 2016).

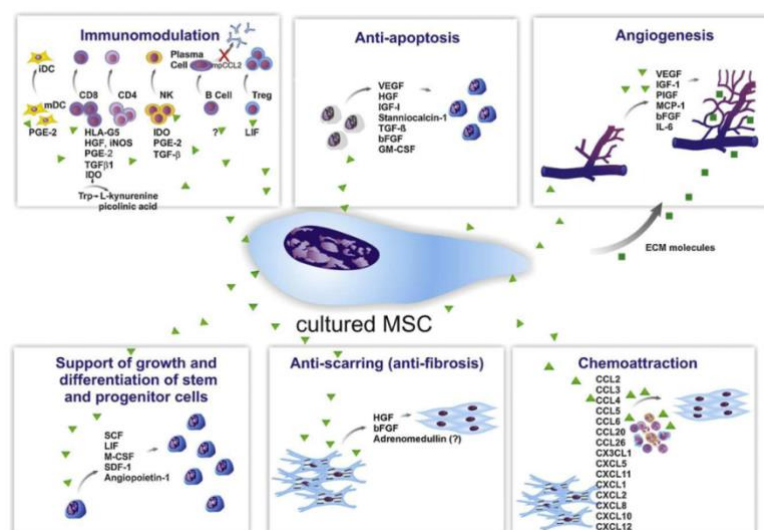


Fig. 1: acciones ejercidas por las células madre mesenquimales mediante la secreción paracrina de diversas moléculas (tomado de da Silva Meirelles *et al.*, 2009)

5.5 Aplicaciones terapéuticas

Las características y propiedades de las MSCs que se han descrito han llevado a explorar su uso terapéutico en diferentes patologías equinas, que se desarrollarán a continuación:

5.5.1 Oftalmología

Los beneficios de utilizar tratamientos basados en MSCs para patologías oculares están ampliamente documentados. Se ha demostrado que las MSCs de diversas especies, incluida la humana, son capaces de diferenciarse en células epiteliales de la córnea, tanto *in vivo* como *in vitro*, pudiendo sustituir así la pérdida de LSCs (células madre limbares, de sus siglas en inglés *limbal stem cells*) (Jiang *et al.*, 2010) que se produce en situaciones de daño corneal, y evitar los problemas que esto acarrea. El epitelio de la córnea es el principal encargado de conservar la transparencia e integridad de la superficie ocular, y se mantiene a partir de las LSCs,

localizadas en el epitelio basal del limbo, por lo que la deficiencia parcial o total de las LSCs afecta a la integridad y estabilidad de la superficie ocular. En una córnea gravemente dañada, tanto el epitelio central como el limbal desaparecen y las células epiteliales conjuntivales invaden la superficie corneal. Esto se acompaña de opacidad corneal, inflamación crónica, cicatrices estromales, persistencia del epitelio aberrante y neovascularización, lo que disminuye la visión y aumenta la fotofobia (Gu et al., 2009; Jiang et al., 2010).

Por otra parte, las MSCs también son capaces de disminuir el estrés oxidativo y suprimir la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, reduciendo así la inflamación corneal y la neovascularización, que disminuye la transparencia corneal, como se ha observado en varios estudios realizados en roedores con daño corneal grave (Cejka et al., 2016; Cejkova et al., 2013).

5.5.1.1 Úlceras corneales y queratitis ulcerativa

Las úlceras corneales son un problema frecuente en la especie equina, representando el 35% de los casos oftalmológicos (Utter et al., 2010). Los caballos son más susceptibles a sufrir daño corneal debido al gran tamaño de sus globos oculares y su localización lateral y prominente. Además, el activo movimiento de su cabeza expone las córneas a una mayor contaminación bacteriana y fúngica (Greenberg, 2019). Algunas de estas úlceras pueden ser graves debido a la excesiva actividad de las proteasas y llegar a suponer una pérdida de visión o a la perforación de la córnea si no se controlan, por lo que es importante diagnosticarlas tempranamente e instaurar un tratamiento adecuado.

Las úlceras corneales en caballos son muy dolorosas, y el tratamiento tópico es difícil de llevar a cabo (Lassaline & Wilkie, 2015). La estrategia terapéutica habitual incluye antibióticos tópicos como profilaxis ante una posible infección, compuestos con actividad anti-proteasa para limitar la destrucción de la córnea, y midriáticos o ciclopléjicos para evitar adherencias, controlar la reacción de la úvea y el dolor asociado (Brooks et al., 2017). El objetivo final es que la úlcera se resuelva sin que se formen cicatrices que reduzcan la transparencia corneal y generen problemas de visión (Marfe et al., 2012). Las MSCs podrían ser una alternativa terapéutica prometedora en el tratamiento de las úlceras corneales, debido a su capacidad para disminuir la inflamación y estimular la proliferación de fibroblastos para cerrar la lesión, acelerando así la curación. Además, gracias a sus propiedades anti-fibróticas, se evitaría la formación de una cicatriz excesiva o desorganizada, la cual lleva a la opacidad corneal (Cejkova et al., 2013; Cejka et al., 2016).

Se ha evaluado la efectividad de las BM-MSCs y su sobrenadante (MSC-Sp) en un modelo de herida corneal *in vitro*, mediante la creación de defectos lineares en cultivos celulares de células estromales provenientes de globos oculares de caballos eutanasiados. Los resultados mostraron que, comparados con el grupo control, los modelos tratados con las BM-MSCs y MSC-Sp aceleraron el cierre del defecto, lo que plantea la posibilidad de emplear un producto derivado de MSCs pero acelular, con las ventajas de su baja inmunogenicidad y facilidad de almacenamiento y administración (Sherman et al., 2017).

In vivo, el uso de LSCs y MSCs ha sido descrito como tratamiento de lesiones corneales en numerosas especies de mamíferos (Jiang *et al.*, 2010; Cejkova *et al.*, 2013; Cejka *et al.*, 2016), incluido el caballo. En un caso de queratitis ulcerosa de origen bacteriano, sin respuesta frente a los tratamientos convencionales, se emplearon PB-MSCs autólogas mediante una única aplicación intra-vascular sistémica (vena yugular) y local (arteria facial transversa), junto con instilaciones locales tres veces al día durante diez días consecutivos. Al cabo de dos semanas, tanto la inflamación como la producción de lágrimas, el dolor y la irritación habían disminuido notablemente, desapareciendo al cabo de tres meses, al igual que la práctica totalidad de la úlcera (Spaas *et al.*, 2011). Similares resultados se observaron en una queratitis ulcerativa bacteriana y dos úlceras corneales refractarias a los tratamientos convencionales. En estos tres procesos se realizó una única administración intra-vascular en la arteria oftálmica de PB-MSCs autólogas, junto con administraciones locales llevadas a cabo por los propietarios tres veces al día durante dos semanas, tras las cuales se observó una disminución de la reacción inflamatoria y del tamaño de las úlceras, desapareciendo éstas al cabo de un periodo variable de uno a tres meses (Marfe *et al.*, 2012).

A pesar de estos prometedores resultados, los estudios son todavía bastante limitados y es necesaria una mayor investigación para entender completamente el mecanismo de actuación de las MSCs y proponer un protocolo estandarizado de tratamiento.

5.5.1.2 Uveítis recurrente equina

La uveítis recurrente equina (ERU, de sus siglas en inglés *equine recurrent uveitis*) es una patología inmunomediada que cursa con una inflamación crónica de la úvea o capa vascular del ojo, incluyendo el iris, el cuerpo ciliar y el coroides. Se caracteriza por episodios de inflamación recurrente, que pueden estar separados por semanas o incluso por años (Gilger & Hollingsworth, 2016).

El ojo se considera un órgano inmunoprivilegiado, debido a su separación del sistema inmune mediante la barrera hemato-ocular y al mantenimiento de un ambiente inhibitorio, lo que le permite limitar las respuestas locales inmunes e inflamatorias, con el fin de preservar la visión (Zhou & Caspi, 2010). La rotura de este inmunoprivilegio mediante una infección por *Leptospira interrogans* se ha relacionado con el desarrollo de la ERU, aunque la etiología no se conoce completamente (Sauvage *et al.*, 2019). La consiguiente respuesta inmune a dicha infección incluye la liberación de citoquinas y quimioquinas que atraen y promueven la activación de los linfocitos T, especialmente los linfocitos T colaboradores 1 y 17 (Regan *et al.*, 2012), que causan la destrucción del tracto uveal del ojo. Dentro de esta cascada de moléculas, en caballos se ha observado que los niveles de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 aparecen considerablemente elevados, lo que sugiere que tenga un papel importante en la ERU (Curto *et al.*, 2016).

Actualmente, no existe un tratamiento definitivo y los principales objetivos terapéuticos son conservar la visión y reducir y controlar la inflamación ocular y el dolor. Además de terapia antiinflamatoria sistémica y ciclopléjicos o midriáticos tópicos, el uso de corticoides locales es la opción terapéutica más extendida, siendo el

acetato de prednisolona y la dexametasona los más empleados. Sin embargo, aparte de conseguir únicamente ralentizar la progresión de la inflamación, su administración a largo plazo implica efectos secundarios, tales como incrementar la susceptibilidad a infecciones secundarias o potenciar la pérdida de epitelio corneal (Gilger & Hollingsworth, 2016), además del problema del doping en el caso de caballos de deporte (Barghi *et al.*, 2015). La ceguera es el desenlace en aproximadamente el 56% de los casos y más del 60% de los animales afectados no puede volver a su actividad anterior o no lo hace al mismo nivel, pudiendo llegar a ser necesaria la eutanasia (Gerding & Gilger, 2016).

Las MSCs constituyen una prometedora opción terapéutica en el tratamiento de la ERU, ya que se ha observado en diferentes especies veterinarias su capacidad de transformar los linfocitos Th1 y Th17 en subtipos reguladores, además de reducir la expresión de citoquinas pro-inflamatorias implicadas en la patología, como IFN- γ (Arzi *et al.*, 2016; Kol *et al.*, 2016). Asimismo, este efecto de regulación de la inflamación se ha comprobado *in vitro* en équidos mediante el cocultivo de linfocitos T obtenidos de animales afectados con ERU y AT-MSCs, lo que sugiere su posible aplicación como terapia de la ERU (Saldinger *et al.*, 2020). Además, se ha probado a nivel clínico la administración de MSCs equinas vía intravenosa en tres pacientes equinos con ERU, produciéndose una mejoría clínica significativa. Sin embargo, se desconoce si las MSCs podrían llegar al ojo y empeorar la inflamación de este órgano (Saldinger *et al.*, 2020). Por ello, se requiere más investigación para evaluar los efectos de la administración de las MSCs en la inflamación ocular *in vivo*.

Por otro lado, las características clínicas de la ERU son muy similares a las observadas en la uveítis endógena en humanos, por lo que los caballos pueden representar un modelo valioso de enfermedad natural para estudiar la uveítis autoinmune humana (Witkowski *et al.*, 2016). Sin embargo, se requieren más estudios que evalúen los efectos de las MSCs en la inflamación ocular *in vivo*.

5.5.1.3 Queratitis inmunomediada equina

La queratitis inmunomediada equina (IMMK, de sus siglas en inglés *immune-mediated keratitis*) es un término genérico empleado para describir a un grupo heterogéneo de procesos no ulcerativos, crónicos o recurrentes, de la córnea. Se caracterizan por opacidad corneal, con ausencia de uveítis, debido a la infiltración linfocítica y plasmática de la misma. Estos signos se acompañan normalmente de diversos grados de neovascularización, edema y fibrosis de la córnea. La patogenia no es totalmente conocida, pero estos hallazgos la hacen compatible con una respuesta inmune, interviniendo en la misma una compleja cascada de citoquinas que conduce a un ambiente pro-inflamatorio (Brooks *et al.*, 2017).

Como tratamiento, suele ser necesaria la terapia local inmunosupresora de larga duración, normalmente a base de corticosteroides, combinada con terapia anti-inflamatoria para controlar y tratar las recidivas (Matthews & Gilger, 2010). Esto puede suponer un problema a los propietarios y, además, las opciones terapéuticas alternativas en los casos que no responden al tratamiento convencional son limitadas (Gilger *et al.*, 2014). Gracias a su habilidad para disminuir la apoptosis celular, reducir los niveles de citoquinas pro-

inflamatorias y la excesiva formación de vasos sanguíneos asociada a estas moléculas, así como la opacidad de la córnea, las MSCs pueden ser una importante estrategia en el manejo de la IMMK (Cejkova *et al.*, 2013; Cejka *et al.*, 2016).

En un caso de IMMK con vascularización, edema e intensa inflamación, sin respuesta al tratamiento convencional, se realizaron dos administraciones intra-vasculares en la arteria oftálmica de PB-MSCs autólogas, junto con instilaciones locales llevadas a cabo por los propietarios tres veces al día durante dos semanas. Al cabo de tres meses, se produjo una completa desaparición de los síntomas, sin recaídas en los dos meses posteriores (Marfe *et al.*, 2012). En otros cuatro casos de caballos con IMMK, también refractarios a los tratamientos anti-inflamatorios e inmunosupresores convencionales, se inyectaron BM-MSCs autólogas vía subconjuntival durante 3-4 semanas, manteniéndose también sus tratamientos habituales. Tres de ellos mostraron una respuesta positiva tres semanas después de comenzar el tratamiento, con disminución de la opacidad corneal, de la fibrosis, la neovascularización y la irregularidad de la superficie corneal, manteniéndose estables un año después. Se desconoce la causa de la falta de respuesta del cuarto caso, aunque su presentación era atípica, más severa, difusa y profunda en el tejido corneal (Davis *et al.* 2019).

El espacio subconjuntival es usado comúnmente en oftalmología como vía de administración debido a que es capaz de suministrar a la córnea y a las estructuras de la cámara anterior del ojo altas concentraciones de medicamentos durante largos periodos de tiempo (Gelatt *et al.* , 2013), por lo que la vía subconjuntival podría ser un método adecuado y sencillo para la administración local de MSCs en patologías oftálmicas. Aunque los datos disponibles son todavía limitados, estos resultados muestran la potencial eficacia de una solución innovadora a base de MSCs para la IMMK, justificando que se siga avanzando en esta línea de investigación.

5.5.2 Reproducción

Gracias al potencial de las MSCs para modular la respuesta inmune y para remodelar tejidos dañados, ya sea mediante la secreción de un amplio rango de moléculas bioactivas o mediante el mantenimiento de precursores celulares, podrían ser una estrategia terapéutica adecuada para recuperar y mantener la función de tejidos reproductivos dañados, lo cual se ha observado en modelos de diferentes especies, como la rata (Zhao *et al.*, 2015). De este modo, la administración de MSCs se ha propuesto como tratamiento de patologías endometriales en las yeguas, incluyendo la endometritis persistente inducida por el servicio (EPIS) y la endometriosis o endometritis degenerativa crónica.

5.5.2.1 Endometritis

La endometritis es la inflamación infecciosa o no infecciosa del endometrio y se considera la primera causa de infertilidad en yeguas y la tercera patología más común que puede afectar a los caballos (Canisso *et al.*, 2020). La etiología es diversa (post-servicio, bacteriana, traumática o post-parto), y el grado y la duración del daño producido en el tejido endometrial depende del origen de la inflamación, la edad y la historia reproductiva previa de la yegua. La inflamación endometrial crónica puede llevar al desarrollo de endometriosis, la cual se acompaña de fibrosis, junto con alteraciones de las glándulas (Leblanc & Causey, 2009).

Especialmente importantes en la salud reproductiva de las yeguas son la EPIS o PBIE (*persistent breeding-induced endometritis*) y la endometriosis.

- **Endometritis persistente inducida por el servicio**

La PBIE es una inflamación aguda producida como respuesta a la presencia de semen y otras sustancias extrañas en el endometrio, unida a la incapacidad de expulsar los fluidos producidos durante la respuesta inflamatoria que ocurre de forma fisiológica durante el estro con el fin de preparar el útero para la implantación del embrión. Es una patología que afecta a yeguas de cría de todas las razas, y dificulta la gestación en al menos el 15% de ellas, produciendo pérdidas económicas significativas (Woodward *et al.*, 2013).

En los últimos años, la ausencia de eficacia de los tratamientos tradicionales y el aumento de las antibiorresistencias han llevado a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas capaces de modular la respuesta inflamatoria endometrial (Canisso *et al.*, 2020). Debido a sus propiedades de diferenciación, inmunomodulación y migración, las MSCs podrían constituir una interesante opción en el tratamiento de patologías inflamatorias uterinas en las yeguas.

Para explorar este potencial, se han realizado estudios en sujetos sanos, con el fin de realizar una primera aproximación a los efectos de las MSCs en los tejidos reproductivos y posteriormente desarrollar esta terapia biológica en ensayos clínicos. En un estudio *in vivo* se administraron intrauterinamente, mediante un catéter de inseminación, MSCs endometriales autólogas obtenidas de biopsias uterinas rutinarias de siete yeguas sanas. Dicha administración se realizó durante el diestro con el fin de evitar la eliminación de las células por parte del lumen uterino y se observó una reacción inflamatoria moderada tras la administración intrauterina, que fue atenuada por la presencia de las MSCs (Rink *et al.*, 2018). También se ha observado que la aplicación intrauterina de BM-MSCs alogénicas 24 horas antes de la inseminación es capaz de disminuir la respuesta inflamatoria fisiológica producida en el útero debido a la exposición a los espermatozoides, mediante la disminución de la migración de neutrófilos hacia el lumen (Ferris *et al.*, 2014). En un estudio en el que se indujo PBIE en nueve yeguas sanas, se administraron AT-MSCs y MSCs endometriales alogénicas, observándose que las células reducían la inflamación producida, independientemente de su origen, y que la integración era limitada un mes después de la aplicación, lo que confiere mayor importancia a las propiedades paracrinas de las células (Navarrete *et al.*, 2020). Estos estudios sugieren que las MSCs podrían emplearse en el tratamiento de la endometritis persistente y de otras patologías inflamatorias uterinas.

- **Endometriosis**

La endometriosis equina se define como una fibrosis activa o inactiva de las zonas periglandulares y/o estromales del endometrio, incluyendo alteraciones de las glándulas tales como quistes y atrofia o hipertrofia del epitelio. El grado de endometriosis aumenta con la edad pero no se ha demostrado una correlación con el número de partos, no estando su etiopatogenia del todo esclarecida (Hoffmann *et al.*, 2009). Las lesiones que se producen se consideran irreversibles y actualmente no existe un tratamiento efectivo, por lo que una meta en

el manejo de esta patología es lograr nuevas opciones terapéuticas, papel que las MSCs equinas podrían cumplir (Buczowska *et al.*, 2014).

En un modelo *ex vivo* en el que se cultivaron AT-MSCs alogénicas con biopsias uterinas obtenidas de yeguas, tanto sanas como con el tejido endometrial afectado, se observó que dichas células pueden infiltrar tanto el espacio periglandular como las propias glándulas del tejido afectado por la endometriosis (Falomo *et al.*, 2015). *In vivo*, se han inyectado BM-MSCs autólogas directamente en el útero mediante un catéter vía vaginal en yeguas con historial de subfertilidad y tejido endometrial histológicamente degenerado. En dicho estudio no se observaron alteraciones clínicas, cambios histológicos ni edema del endometrio, ni durante el tratamiento ni después del mismo (Alvarenga *et al.*, 2016). Los resultados de ambos trabajos sugieren la seguridad y eficacia de las MSCs en esta localización, además de situar a estas células como una potencial opción terapéutica para la fibrosis endometrial y otras patologías del útero de las yeguas.

También se ha observado que las MSCs son capaces de anidar y migrar a los tejidos endometriales, tanto glandulares como no glandulares, cuando son inoculadas de forma intrauterina mediante una técnica mínimamente invasiva y de realización simple, similar a la empleada en la inseminación artificial (Mambelli *et al.*, 2013). El éxito de las terapias con MSCs depende en parte de la forma en que se administren, que debe asegurar una amplia distribución celular y migración al tejido dañado, lo cual puede lograrse mediante la técnica descrita por Mambelli y colaboradores. En otro estudio en el que se empleó la misma técnica de administración de las MSCs, se observó mejoría de los cambios histológicos asociados con la endometriosis y se sugirió que los mecanismos ejercidos por las MSCs en esta situación incluirían la migración a los espacios fibróticos glandulares y periglandulares y la estimulación de la proliferación de células epiteliales, así como efectos anti-fibróticos y reguladores capaces de modificar los perfiles de proteínas secretadas por las glándulas endometriales hacia los habituales en un útero sano (Mambelli *et al.*, 2014).

Por otro lado, se ha observado que las MSCs derivadas de la membrana amniótica también presentan potencial para incrementar la reposición celular uterina cuando la escasez o la baja proliferación de las células endometriales se asocia con abortos (Corradetti *et al.*, 2014), lo que las convierte en unas adecuadas candidatas para el tratamiento de la endometriosis. Las MSCs endometriales, comparadas con las BM-MSCs, tienen mayor capacidad para diferenciarse a músculo liso (Rink *et al.*, 2017), y mayor potencial inmunomodulador y migratorio (Cortés-Araya *et al.*, 2018). Además, estas células pueden cultivarse a partir de biopsias endometriales, cuya obtención en yeguas es un procedimiento diagnóstico seguro y rutinario, pudiendo ser realizado repetidamente y sin necesidad de sedación o anestesia local (Snider *et al.*, 2011). Todo ello sugiere que esta nueva fuente de MSCs podría constituir una opción accesible, eficaz y segura en el tratamiento de procesos inflamatorios en el útero.

5.5.2.2 Otras aplicaciones de MSCs en el aparato reproductor equino

Estos prometedores resultados para el tratamiento de distintos tipos de endometritis han abierto la puerta a la realización de más ensayos que evalúen las posibilidades de las MSCs en diversas aplicaciones relacionadas con el aparato reproductor equino.

- **Patologías ováricas**

Otro ejemplo de aplicación reproductiva de las MSCs es el estudio de la tolerancia a inyecciones intra-ováricas de BM-MSCs alogénicas, con el fin de comprobar su capacidad de mejorar o restaurar la función ovárica en yeguas de edad avanzada. Aunque no hubo efectos adversos, tampoco se observaron cambios significativos en el número de folículos, en la tasa de recuperación y la maduración de oocitos ni en el número de blastocitos (Grady *et al.*, 2019). Esto contrasta con los efectos beneficiosos conseguidos con la administración de MSCs en ovarios dañados por quimioterapia en otras especies (Takehara *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

- **Patologías testiculares**

Las patologías producidas en los testículos se caracterizan por la alteración o inactivación de la función de los mismos, lo que constituye un importante problema reproductivo en los sementales (Maia *et al.*, 2015). En situaciones de isquemia o daño tisular grave, las MSCs son atraídas al sitio en el que se ha producido la alteración, donde secretan moléculas capaces de modular la reparación y regeneración tisular (Wright *et al.*, 2011). Esto, junto con los efectos inmunomoduladores, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos, sugiere que las MSCs podrían aportar beneficios terapéuticos en las lesiones producidas en los testículos, como se ha observado en un modelo de torsión testicular en ratas (Hsiao *et al.*, 2015).

En caballos, se han evaluado los efectos *in vivo* de la inyección intratesticular de BM-MSCs alogénicas en sementales sanos y sus efectos en los parámetros seminales y la fertilidad. Los resultados mostraron ausencia de signos de inflamación y de cambios en los parámetros seminales, lo que apoya la hipótesis de que la aplicación intratesticular de MSCs es un procedimiento potencialmente seguro, que podría llegar a constituir una alternativa en el tratamiento de patologías degenerativas de los testículos, aunque se requiere mayor investigación (Papa *et al.*, 2020).

5.5.3 Sistema tegumentario

5.5.3.1 Heridas

Debido a su propia naturaleza y a su instinto de supervivencia, que deriva en una exagerada respuesta de amenaza, la especie equina está predispuesta a padecer heridas (Theoret *et al.*, 2013). Aunque el impacto no está bien documentado, el tratamiento de heridas es una práctica habitual en la medicina equina (Sole *et al.*, 2015; Theoret *et al.*, 2016) y, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, el 16-27% de las eutanasias practicadas a caballos menores de 20 años se deben a traumas o heridas previos. Las heridas traumáticas se producen comúnmente en las partes distales de las extremidades de los caballos y su cicatrización se suele retrasar debido a la alta tensión a la que están sometidas, la pobre vascularización de la

zona y a la respuesta inflamatoria aberrante que se produce. En estos casos, se produce una inflamación prolongada pero inefectiva, en la que se libera TGF- β 1, que conduce a una respuesta fibroproliferativa y a una hipoxia regional con oclusión de los microvasos (Deschene *et al.*, 2012). Además, la epitelización es lenta y la capacidad de contracción de la herida es mínima en esta localización. Como consecuencia, se produce retraso en la cicatrización, que normalmente conlleva formación de tejido de granulación exuberante (Theoret *et al.*, 2013).

Si es posible, la resolución se realiza mediante cierre primario, ya que es más rápido y estético, pero acarrea problemas de dehiscencia, por lo que, según un estudio retrospectivo, solo se consigue en el 24% de los casos (Wilmink *et al.*, 2010). En los casos en que el cierre primario no se puede llevar a cabo debido a la dehiscencia o por la excesiva contaminación o pérdida de tejido, la cicatrización debe llevarse a cabo mediante segunda intención (Elce, 2017). Esta situación no es la ideal, ya que las heridas en caballos tienden a cerrar mediante epitelización antes que por contracción, lo que acarrea la formación de una cicatriz más extensa y débil (Wilmink, 2017). Por otra parte, los injertos son una opción interesante, sobre todo para las heridas de miembros distales que cicatrizan lentamente (Schumacher & Wilmink, 2016). Sin embargo, la tasa de éxito en su integración no es muy elevada, ya que se produce inflamación, acumulación de fluido y movimiento (Theoret, 2009). La complejidad de los mecanismos implicados en la reparación de heridas cutáneas dificulta aún más el establecimiento de protocolos eficaces cuando el proceso de reparación natural no es el adecuado. Sin embargo, cada vez se conocen mejor los mecanismos implicados en la curación y en los procesos que llevan a las heridas hacia la cronicidad, lo que ha permitido desarrollar y evaluar nuevas terapias, como el uso de MSCs (Theoret, 2009).

In vitro se ha observado que las MSCs equinas promueven el cierre de defectos con una monocapa de fibroblastos mediante la movilización de los mismos y el incremento en estos de la expresión de genes relacionados con el proceso de cicatrización, como la metalopeptidasa-1, la fibronectina, IL-8 o la cathepsina K (Bussche *et al.*, 2015). En un estudio *in vivo* de modelos de heridas distales en seis caballos, se evaluó la aplicación de UCB-MSCs alogénicas, comparando a las células en condiciones normóxicas e hipóxicas, así como su aplicación mediante inyección directa en la herida o administración tópica por medio de un gel de fibrina. Los resultados mostraron que las MSCs favorecen la cicatrización temprana, que ocurrió más rápidamente en el caso de las heridas tratadas mediante administración directa de las MSCs, aunque no se apreciaron ventajas en el uso de MSCs en condiciones hipóxicas (Textor *et al.*, 2018). En otro estudio en el que se crearon quirúrgicamente heridas estandarizadas en el lateral de la caña (tercer metacarpo) y en un hemitórax de dos caballos, se administraron UCB-MSCs alogénicas de forma sistémica vía intravenosa, observándose que las células se integraron y anidaron preferentemente en las heridas durante las fases agudas de la cicatrización, en ausencia de efectos adversos frente a la administración sistémica (Mund *et al.*, 2020). Esto sugiere que la aplicación sistémica de grandes cantidades de MSCs es un procedimiento seguro y eficaz, ya que, aunque la

inyección directa de las células en la lesión es un procedimiento intuitivo, puede acarrear complicaciones como daño tisular por la aguja y no siempre mejora el anidamiento de las MSCs (Kean *et al.*, 2013).

En cuanto a la aplicación de las MSCs en heridas producidas de forma natural, se realizó un estudio que incluyó cuatro heridas crónicas localizadas en los miembros distales y refractarias al tratamiento convencional, en las cuales se administraron PB-MSCs autólogas, tanto localmente mediante inyección directa en los bordes de la herida como de forma sistémica vía intravenosa. En todas las heridas tratadas se formó tejido de granulación tras cuatro semanas desde la aplicación de las MSCs, lo que significa una mejora respecto al tratamiento convencional, que requiere más tiempo para conseguir la cicatrización. Además, al igual que en el estudio de Mund *et al.*, no se observaron efectos adversos tras la aplicación sistémica de las MSCs (Spaas *et al.*, 2013). Estos resultados muestran una utilidad prometedora de las MSCs para acelerar y mejorar la cicatrización de heridas crónicas.

Un aspecto importante es que los humanos y los caballos comparten características anatómicas similares y habitualmente sufren heridas extrapolables en ambas especies, siendo las únicas especies en las que se producen los fenómenos fibroproliferativos anteriormente mencionados, lo que convierte a la especie equina en un modelo animal ideal para estudiar determinadas patologías de la piel y la aplicación de nuevas terapias (Theoret & Wilmink, 2013). En ambas especies, el coste económico de tratar las heridas y sus complicaciones asociadas es alto, y determinados tipos de heridas crónicas no responden a las terapias convencionales (Harman *et al.*, 2019). Debido a esto, son necesarias nuevas opciones terapéuticas que consigan la curación de heridas en el menor tiempo posible y con los mínimos efectos secundarios, junto con una correcta regeneración de la piel afectada. Las MSCs podrían ser unas candidatas adecuadas, como sugieren los estudios mencionados. Sin embargo, la mayoría de estos estudios no han sido del todo controlados, y podría haberse producido la curación siguiendo su proceso natural, sin estar del todo clara la implicación de las MSCs. Por ello, es necesaria una mayor investigación con el fin de estandarizar los protocolos de uso de estas células.

5.5.3.2 Úlceras de decúbito

Las cualidades de las MSCs también se han estudiado para su aplicación en úlceras de decúbito, causadas por las excesivas fuerzas de presión, fricción y tensión que se producen cuando el paciente está tumbado por largos periodos de tiempo y que conllevan isquemia y necrosis de los tejidos (Agrawal & Chauhan, 2012). Se trata, por tanto, de un mecanismo patogénico con diferencias respecto a las heridas traumáticas que se han desarrollado anteriormente. Los potros neonatos son particularmente propensos a padecer este tipo de desórdenes, debido a su delgada piel y a las patologías concomitantes que les obligan a permanecer largo tiempo en decúbito (Knottenbelt, 2009). Tras el daño tisular, se debe formar un nuevo epitelio para cerrar la herida y recuperar la funcionalidad, lo que requiere la proliferación y migración de queratinocitos, fibroblastos y MSCs, las cuales son esenciales para mantener la homeostasis de la piel y repararla mediante sus capacidades de diferenciación celular, inmunomodulación y secreción de factores de crecimiento (Chen *et al.*, 2009).

En un estudio en el que se trataron graves úlceras de decúbito en potros neonatos hospitalizados con MSCs obtenidas de líquido amniótico y plasma rico en plaquetas embebidos en discos de gelatina, se observó una curación más rápida que la ocurrida en aquellas heridas tratadas únicamente con gel de aloe (Iacono *et al.*, 2012b). En otro estudio en que se aplicaron MSCs obtenidas de la misma fuente, empleando en este caso gel de carboximetilcelulosa para aplicarlas, se observaron igualmente resultados satisfactorios (Iacono *et al.*, 2016). Más recientemente, se ha comprobado la efectividad en la curación de úlceras del uso de MSCs derivadas de la gelatina de Wharton en un caso de una potra con una gran úlcera en el corvejón, causada por un decúbito prolongado debido a las deformidades congénitas que presentaba al nacer (Lanci *et al.*, 2019).

5.5.3.3 Laminitis

A pesar de que el casco del caballo podría considerarse como parte del sistema locomotor y, por tanto, no debería incluirse en el presente trabajo, la parte distal de la tercera falange situada dentro de este estuche córneo está recubierta por tejido epitelial, y debido a esto se ha incluido la laminitis como parte del sistema tegumentario. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la laminitis es un proceso multifactorial y sistémico, con consecuencias que afectan a todo el organismo del caballo (Katz & Bailey, 2012).

La laminitis o infosura es un proceso que afecta a las pezuñas de los ungulados, especialmente de los équidos, en los cuales la incidencia puede llegar a ser del 34% (Wylie *et al.*, 2019). Constituye un grave problema de bienestar animal con un fuerte impacto económico para la industria equina, siendo la eutanasia necesaria en un número considerable de casos en los que la laminitis se llega a desarrollar de forma crónica (Dryden *et al.*, 2013). Aunque la etiopatogenia exacta aún se desconoce, el pie del caballo es una compleja estructura que debe soportar un gran peso y múltiples tensiones (Pollitt, 2010) y se han descrito numerosos factores que pueden desencadenar la laminitis, tanto inflamatorios, como endocrinos o vasculares (Katz & Bailey, 2012). Esta patología se caracteriza por la inflamación del corion laminar, que es el tejido que une el casco al hueso y que se encuentra muy vascularizado e inervado. Los mecanismos moleculares y celulares implicados incluyen la liberación de citoquinas y de mediadores pro-inflamatorios, la activación de las metaloproteinasas y la destrucción de la membrana basal. El edema, la compresión vascular, la hipoxia y necrosis celulares que se producen como consecuencia de la inflamación pueden llevar a comprometer la unión entre el estuche córneo del casco y la tercera falange, pudiendo llegar a desprenderse el casco (Engiles, 2010).

Sea cual sea la causa desencadenante, el tejido laminar de un casco afectado con laminitis no tiende a recuperar la normalidad, requiriendo atención constante para mantener el confort y cierto grado de funcionalidad. La estrategia terapéutica actual, dificultada por la falta de conocimiento de los mecanismos etiopatogénicos, consiste en una combinación de tratamientos locales y sistémicos junto con soporte mecánico y herrajes terapéuticos, lo que resulta en un alto coste que no siempre va acompañado de resultados satisfactorios (Morrison, 2010). Se ha observado que la expresión de p63, un marcador de las células madre epidermales, está disminuida en las láminas epidermales de cascos afectados por laminitis crónica, lo que

sugiere que en dichos tejidos el potencial de proliferación del epitelio está disminuido (Carter *et al.*, 2011). Esto, junto con el daño vascular que se produce como consecuencia de los microtrombos, los factores mecánicos y la isquemia, plantea a la terapia con MSCs como una prometedora opción capaz de establecer un ambiente antiinflamatorio y pro-angiogénico, además de estimular al tejido dañado para que recupere su funcionalidad.

En el caso de la laminitis crónica refractaria, se ha evaluado el efecto de las UCB-MSCs alogénicas como terapia adyuvante a los tratamientos convencionales, administradas mediante perfusión regional (vena digital). En aquellos casos en los que la aplicación de las células se realizó en los primeros 30 días tras el comienzo de la fase crónica de la laminitis, se observaron efectos positivos en la evolución del proceso, que se reflejaron en la disminución, apreciable radiográficamente, de la distancia entre el tejuelo y la pared del casco (Morrison, 2011; Dryden *et al.*, 2013). Asimismo, se ha visto que las BM-MSCs se distribuyen más ampliamente por la cuartilla y el casco si se administran mediante perfusión regional respecto a si se administran localmente mediante inyecciones intralesionales (Sole *et al.*, 2012), lo que se plantea como una alternativa en aquellos procesos en los que no se pueda acceder a la zona dañada. En un estudio reciente de nueve casos de laminitis crónica, se emplearon AT-MSCs, tanto autólogas como alogénicas, suspendidas en plasma rico en plaquetas y administradas mediante perfusión regional en la vena digital palmar, observándose mejora de la vascularización y de la estructura del casco, así como de su función y movilidad, lo que permitió a los animales tratados mejorar su calidad de vida y recuperar el nivel de actividad previo al desarrollo de la patología (Angelone *et al.*, 2017).

Aunque la terapia celular a base de MSCs se presenta como un prometedor tratamiento adyuvante en la rehabilitación de casos graves de laminitis, cabe destacar que su papel no está del todo esclarecido y que puede complementar el abordaje convencional, pero no ser un tratamiento único. Esto hace que en los estudios realizados hasta ahora no quede claro el papel que desempeñan realmente las MSCs, por lo que es necesario realizar más estudios con controles adecuados y para proponer un protocolo estandarizado de la administración de las MSCs, así como para evaluar la calidad del tejido reparado creado mediante la toma de muestras para biopsias.

5.5.4 Desórdenes metabólicos

5.5.4.1 Síndrome metabólico equino

Los problemas metabólicos se han convertido en un problema en la clínica equina durante los últimos años. El síndrome metabólico equino (SME) es un desorden endocrino caracterizado por obesidad, resistencia a la insulina y predisposición a padecer laminitis, junto con otras alteraciones asociadas al exceso de peso, como hiperinsulinemia e inflamación. El tejido adiposo de los depósitos anormales de grasa se comporta como un órgano secretor, produciendo gran variedad de moléculas, como hormonas (leptina, adiponectina) y citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, TNF- α y otras) (Frank *et al.*, 2010). Además, la funcionalidad hepática se ve afectada produciéndose fenómenos de apoptosis, estrés oxidativo, excesiva acumulación de lípidos e inflamación (Marycz *et al.*, 2018).

En cuanto al tratamiento, el manejo dietético y el ejercicio son las opciones más empleadas. Por otro lado, se han probado diferentes moléculas empleadas en medicina humana, como la metformina y la pioglitazona, con éxito limitado en caballos (Hustace *et al.*, 2009; Wearn *et al.*, 2011), aunque se ha comprobado que la metformina estimula la proliferación y reduce la apoptosis de las AT-MSCs aisladas de caballos afectados con SME (Smieszek *et al.*, 2019). Debido a ello, es necesario encontrar una opción terapéutica eficaz para aumentar la sensibilidad a la insulina y regular los procesos inflamatorios, de lo que podrían ser capaces las MSCs modulando la respuesta inflamatoria sistémica producida por los adipocitos gracias a su potencial inmunorregulador y anti-inflamatorio.

Se han evaluado los efectos de la aplicación *in vivo* de AT-MSCs autólogas en un caso de SME, mediante administración sistémica intravenosa, observándose que los niveles de determinadas enzimas específicas del hígado se redujeron, lo que sugiere que las MSCs serían capaces de mejorar el metabolismo hepático, deteriorado a causa del SME (Marycz *et al.*, 2019). Estos prometedores resultados alientan a realizar una mayor investigación para determinar las rutas de administración, dosis y momentos de aplicación. Además, se ha observado que las AT-MSCs obtenidas de caballos afectados con SME se caracterizan por senescencia, apoptosis y disminución de la viabilidad y de la capacidad de diferenciación, en comparación con las células obtenidas de animales sanos (Marycz, *et al.*, 2016a; Marycz, *et al.*, 2016b; Marycz, *et al.*, 2016c), por lo que otro parámetro a evaluar en futuros estudios es la seguridad del tratamiento con MSCs alogénicas.

5.5.5 Sistema respiratorio

5.5.5.1 Asma equino

El término “asma equino” hace referencia a los procesos inflamatorios de origen no infeccioso de las vías aéreas (Couëtil *et al.*, 2016). Los desórdenes respiratorios en caballos suponen una de las principales causas de pérdida de rendimiento deportivo de origen no locomotor, por lo que tiene un gran impacto en la industria equina (Pirie, 2017). Actualmente el asma equino engloba dos procesos: forma juvenil leve o moderada y forma adulta grave, cuya diferenciación se basa en la severidad de los signos clínicos asociados y que equivalen a los procesos anteriormente conocidos como enfermedad inflamatoria de las vías aéreas y obstrucción recurrente de las vías aéreas, respectivamente (Couëtil *et al.*, 2016). Aunque los mecanismos etiopatogénicos no se conocen con exactitud, estos procesos se caracterizan por acumulación de neutrófilos, hiperreactividad bronquial y broncoespasmo en respuesta a diversos estímulos ambientales, sospechándose de un papel principal de la disregulación de los macrófagos alveolares, por lo que se considera un proceso inmunomediado (Bond *et al.*, 2018).

La estrategia terapéutica está limitada al manejo del ambiente, terapia inmunomoduladora y broncodilatadores. La administración de corticosteroides, comúnmente empleados como tratamiento principal, puede no ser adecuada para todos los caballos y dar problemas a largo plazo. Además, la administración de fármacos por vía inhalatoria puede suponer un problema económico y de manejo para los propietarios (Couëtil

et al., 2016). Por ello, una posible alternativa en el manejo del asma equino sería la terapia a base de MSCs, que ya ha mostrado su potencial en otros estudios animales (Dai *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018).

En el caballo, se ha observado *in vitro* el descenso de la producción de TNF- α en macrófagos alveolares tras la exposición de los mismos a MSCs derivadas del líquido amniótico (Zucca *et al.*, 2016), lo que sugiere que pueden ser capaces de regular procesos inflamatorios en el pulmón equino. Hasta la fecha, no hay ensayos realizados con MSCs *in vivo* en caballos, aunque se han evaluado los efectos de la fracción mononuclear de médula ósea autóloga en ocho caballos con historial de patología respiratoria grave, comparándolos con el tratamiento convencional a base de dexametasona. Los resultados mostraron que la terapia convencional solo causó regresión de la enfermedad, mientras que la terapia celular, además de mejorar los signos clínicos y disminuir la inflamación, fue capaz de incrementar la tolerancia a los alérgenos e incluso de promover la reparación tisular de las vías aéreas (Barussi *et al.*, 2016).

Los mencionados estudios plantean a las MSCs como una opción terapéutica beneficiosa, teniendo en cuenta que es necesaria mayor investigación en cuanto a las dosis requeridas y los métodos de administración empleados. Como valor añadido, el asma equino es similar al asma humano, con la diferencia de que el primero se caracteriza por la presencia de neutrófilos, mientras que en humanos son los eosinófilos las células predominantes (Bullone & Lavoie, 2015), por lo que podría usarse como modelo en medicina comparativa.

5.5.6 Neurología

En caballos, las patologías más comunes relacionadas con el sistema nervioso son la mieloencefalopatía equina, el síndrome de la motoneurona equina, el daño en los nervios periféricos, el daño de médula espinal y la hemiplejía laríngea. Los efectos neuroprotectores de las MSCs han sido descritos ampliamente e incluyen mecanismos anti-inflamatorios, inmunomoduladores, angiogénicos y tróficos (Wright *et al.*, 2011; Schaakxs *et al.*, 2013). Asimismo, gracias a la capacidad de las MSCs de reemplazar células dañadas o secretar factores tróficos y citoquinas inmunomoduladoras, los síntomas clínicos observados en los desórdenes degenerativos pueden reducirse (Sadan *et al.*, 2009) y se ha observado que las MSCs de diversas especies animales, incluyendo la equina, son capaces de diferenciarse *in vitro* a células de tipo nervioso (Jamnig *et al.* 2012; Villagrán *et al.*, 2014, 2016). Debido a estas propiedades, el uso de MSCs puede ser una alternativa terapéutica en la reparación de tejido nervioso, incluyendo daño de los nervios periféricos y daño de la médula espinal.

5.5.6.1 Daño en los nervios periféricos

Los caballos pueden sufrir daños en los nervios periféricos debido a traumas, desórdenes metabólicos o genéticos, toxinas y patologías degenerativas e infecciosas (James *et al.*, 2010). Las consecuencias incluyen disminución del rendimiento, discapacidad o incluso muerte. El grado de restauración de la funcionalidad del nervio depende de la gravedad y cronicidad del daño producido, teniendo peor pronóstico aquellos casos en los que el nervio está completamente seccionado (Cho *et al.*, 2010). Existen diversas técnicas quirúrgicas para la reparación de los nervios, pero ninguna de ellas permite obtener resultados clínicos evidentes (Kuffler, 2014), por lo que la aplicación de MSCs podría ser una interesante opción terapéutica.

En un modelo de daño nervioso agudo periférico, en el que se seccionó quirúrgicamente la rama comunicante del nervio del metacarpo de tres caballos, se aplicaron BM-MSCs alogénicas en la fascia neural. Sin embargo, no se observó evidencia de regeneración en los nervios seccionados, ni tampoco se apreciaron diferencias histológicas entre los nervios tratados con MSCs respecto a los controles tratados con solución salina isotónica (Villagrán *et al.*, 2016). Los escasos resultados positivos de los estudios realizados hasta la fecha requieren mayor investigación en la modelización y en el protocolo de aplicación de las MSCs, para evaluar su efecto real en las células de los tejidos nerviosos.

5.5.6.2 Síndrome de Wobbler

El síndrome de Wobbler, mielopatía estenótica vertebral cervical (MEVC) o síndrome de incoordinación equina es una patología que se caracteriza por ataxia y debilidad debido al estrechamiento del canal vertebral cervical con o sin malformación de las vértebras cervicales, resultando en la compresión continua o intermitente de la médula espinal. El tratamiento empleado incluye el uso de drogas anti-inflamatorias, como corticosteroides, anti-inflamatorios no esteroideos y dimetilsulfóxido, junto con restricción del ejercicio y de la dieta. La resolución quirúrgica podría ser una opción para muchos caballos, pero es cara, conlleva riesgos y cuidados postoperatorios prolongados (Furr & Reed, 2015). De este modo, en la clínica equina los desórdenes neurológicos que afectan al cerebro y a la médula espinal representan un desafío, y muchos de los animales afectados acaban desarrollando secuelas nerviosas tras la aplicación de los tratamientos convencionales, por lo que, debido a las ya mencionadas propiedades de las MSCs, podrían ser una futura opción terapéutica para estos pacientes.

La administración intratecal permite distribuir más ampliamente las células en el líquido cefalorraquídeo y es una técnica más viable en el tratamiento de patologías equinas del sistema nervioso central. Para probar la seguridad de esta vía de administración, se realizó un estudio con BM-MSCs autólogas, inyectadas en caballos sanos, observándose que no se producían alteraciones clínicas. Estos resultados sugirieron que la administración intratecal es un procedimiento viable y seguro (Maia *et al.*, 2015), lo que abrió camino a la realización de ensayos clínicos en caballos afectados de MEVC. De este modo, en un estudio posterior se realizó la administración intratecal de una dosis más alta de AT-MSCs alogénicas en caballos, tanto sanos como con MEVC. Los resultados mostraron que la administración intratecal de dosis relativamente altas de MSCs alogénicas es tolerada en caballos sanos, independientemente de que las células se hayan administrado en el espacio atlantooccipital (AO) o lumbosacro (LS), lo que sugiere que, si la barrera hematoencefálica no está alterada, no se produce una respuesta inflamatoria sistémica a la presencia de células alogénicas. Asimismo, debido al flujo cráneo-caudal del líquido cefalorraquídeo, la administración AO permite que las células se distribuyan mejor en el espacio subaracnoideo de la zona cervical a lumbosacra, lo que sugiere que esta vía es más adecuada para lesiones craneales de la médula espinal. En cuanto a los tres caballos afectados de MEVC, las MSCs inyectadas no pudieron encontrarse en el lugar de la lesión 15 días tras su administración, lo que podría deberse a que no

habían tenido tiempo suficiente para llegar hasta allí o a que no fueron capaces de sobrevivir en la médula espinal en cantidad suficiente como para ser detectadas (Barberini *et al.*, 2018).

5.5.6.3 Hemiplejía laríngea o neuropatía laríngea recurrente

La hemiplejía laríngea es una patología de las vías respiratorias altas de los caballos caracterizada por diversos grados de parálisis del cartílago aritenoides, siendo el lado izquierdo el más comúnmente afectado. La prevalencia puede alcanzar el 35% en algunas poblaciones equinas, y la etiología exacta aún se desconoce. Se describe como una axonopatía del nervio laríngeo recurrente junto a lesiones de demielinización, que conduce a la deinervación y consiguiente atrofia de los músculos de la laringe (Draper & Piercy, 2018). Los caballos afectados emiten ruidos respiratorios anormales durante el ejercicio, y en los casos más severos también presentan intolerancia al mismo. Actualmente, el tratamiento más común es la cirugía de laringoplastia, acompañada o no de ventriculocordectomía. Aunque la tasa de éxito de estas intervenciones es elevada, las complicaciones post-quirúrgicas, como la pérdida gradual de la abducción, son comunes (Biasutti *et al.*, 2017).

En un estudio *in vivo* realizado con cinco caballos sanos, se administraron MSCs derivadas del músculo mediante inyección directa en el nervio laríngeo recurrente guiada por electroestimulación, con el fin de evaluar la viabilidad y seguridad de esta técnica, lo que se confirmó por la ausencia de cambios funcionales en la endoscopia y de signos clínicos (Sandersen *et al.*, 2018). Estos resultados abren la puerta a la investigación de la realización de esta técnica en caballos afectados con hemiplejía laríngea.

6 Conclusiones / conclusions

- La constatación de que las MSCs no ejercen su acción terapéutica únicamente mediante mecanismos de integración y diferenciación, sino que sus propiedades paracrinas presentan mayor relevancia, ha abierto la puerta a investigar su aplicación en un número cada vez mayor de patologías, tanto en medicina equina como humana. / *The finding that MSCs do not exercise their therapeutic action solely through integration and differentiation mechanisms but by means of paracrine properties, has opened the door to investigate their application in an increasing number of pathologies, both in equine and human medicine.*

- Sin tener en cuenta el aparato locomotor, las patologías equinas para cuyo tratamiento pueden ser de interés las MSCs son las oftálmicas, reproductivas, heridas, laminitis, síndrome metabólico equino, asma equino y neurológicas. / *Regardless of the locomotor system, the equine pathologies that can be potentially treated by MSCs are ophthalmic and reproductive disorders, wounds, laminitis, equine metabolic syndrome, equine asthma and neurological disorders.*

- Los mayores avances en la clínica equina se han llevado a cabo en el tratamiento de úlceras corneales, endometritis y heridas. En cuanto al resto de patologías, los reportes son anecdóticos y/o se encuentran en fases preliminares. Debido a su similitud con las patologías homólogas en medicina humana, destacan la uveítis recurrente equina, las patologías y los fenómenos fibroproliferativos de la piel y el asma, como posibles modelos de los que extrapolar información (*One Medicine*). / *The greatest advancement among the aforementioned*

pathologies has been made in the treatment of corneal ulcers, endometritis and wounds. As for the other pathologies, the reports are anecdotal and/or in preliminary stages. Due to the similarity with homologous pathologies in human medicine, recurrent equine uveitis, pathologies and fibroproliferative processes of the skin and asthma stand out as possible models from which extrapolating information (One Medicine).

- La aplicación de las MSCs en patologías no relacionadas con el sistema locomotor del caballo requiere mayor investigación en cuanto a dosis, momento y vía de administración, y comparación con grupos control, con el fin de establecer un protocolo terapéutico estandarizado. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora justifican seguir investigando para que, en un futuro, las MSCs puedan ayudar a solventar problemas de la clínica equina que hoy son insalvables. / *The application of MSCs in pathologies unrelated to the equine locomotor system requires further research, especially regarding dose, time and route of administration, as well as comparison with control groups, in order to establish a standardized therapeutic protocol. Nevertheless, the results obtained so far warrant further research to develop the use of MSCs for conditions that currently have very limited therapeutic options.*

7 Valoración personal

Durante la realización de este trabajo he podido ampliar mi conocimiento sobre los avances que ha experimentado el uso de células madre más allá de las patologías del sistema locomotor de los équidos. Esto me ha brindado la oportunidad de llegar a comprender su importancia, ya que, ante la ausencia de tratamientos efectivos frente a determinadas patologías comunes en la clínica equina, las MSCs pueden convertirse en una de las terapias más revolucionarias.

Por otro lado, me ha servido para formarme en la realización de revisiones bibliográficas de rigor científico, así como a manejar herramientas como los gestores de referencias y a aumentar mi vocabulario y capacidad de comprensión en inglés científico. Por último, agradecer a mis tutoras, Laura Barrachina Porcar y Alina Cequier Soler, sus consejos y opiniones a lo largo de la elaboración de esta revisión.

8 Bibliografía

- Aggarwal, S. & Pittenger, M. F. (2005) 'Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses'. *Blood*, 105(4), pp. 1815–1822.
- Agrawal, K. & Chauhan, N. (2012) 'Pressure ulcers: Back to the basics'. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(2), pp. 244–254.
- Al Naem, M., Bourebaba, L., Kucharczyk, K., Röcken, M. & Marycz, K. (2019) 'Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders'. *Stem Cell Reviews and Reports*, pp. 301–322.
- Alvarenga, M. A., do Carmo, M. T., Segabinazzi, L., Guastali, M., Maia, L. & Landim-Alvarenga, F. C. (2016) 'Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares'. *Journal of Equine Veterinary Science*, 42, pp. 12–18.
- Angelone, M., Conti, V., Biacca, C., Battaglia, B., Pecorari, L., Piana, F., Gnudi, G., Leonardi, F., Ramoni, R., Basini, G.,

- Dotti, S., Renzi, S., Ferrari, M. & Grolli, S. (2017) 'The contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: A proof of concept'. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10).
- Ankrum, J. A., Ong, J. F. & Karp, J. M. (2014) 'Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged'. *Nature Biotechnology*, 32(3), pp. 252–260.
- Cellular Tissue and Gene Therapies Advisory Commitee (2005). 'Cellular products for joint surface repair'. FDA Center for Biologics Evaluation and Research March 3–4.
- Arzi, B., Mills-Ko, E., Verstraete, F. J.M., Kol, A., Walker, N. J., Badgley, M. R., Fazel, N., Murphy, W. J., Vapniarsky, N. & Borjesson, D. L. (2016) 'Therapeutic Efficacy of Fresh, Autologous Mesenchymal Stem Cells for Severe Refractory Gingivostomatitis in Cats'. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(1), pp. 75–86.
- Asari, S., Itakura, S., Ferreri, K., Liu, C. P., Kuroda, Y., Kandeel, F. & Mullen, Y. (2009) 'Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation'. *Experimental Hematology*, 37(5), pp. 604–615.
- Barberini, D. J., Freitas, N., Magnoni, M. S., Maia, L., Listoni, A. J., Heckler, M. C., Sudano, M. J., Golim, M. A., Landim-Alvarenga, F. C. & Amorim, R. M. (2014) 'Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: Immunophenotypic characterization and differentiation potential'. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(1), pp. 1–11.
- Barberini, D. J., Aleman, M., Aristizabal, F., Spriet, M., Clark, K., Walker, N. J., Galuppo, L. D., Amorim, R. M., Woolard, K. D. & Borjesson, D. L. (2018) 'Safety and tracking of intrathecal allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in healthy and diseased horses'. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), pp. 1–11.
- Barghi, T. S., Kobarfard, F., Hashemian, A. & Zebardast, J. (2015) 'Long term and intensive use of ophthalmic topical corticosteroids and the risk of positive doping test in athletes: A case report'. *Asian Journal of Sports Medicine*, 6(3), pp. 80–81.
- Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P. Martín-Burriel, I. & Rodellar, C. (2016) 'Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties'. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 171, pp. 57–65.
- Barrachina, L., Romero, A., Zaragoza, P., Rodellar, C. & Vázquez, F. J. (2018) 'Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse'. *Veterinary Journal*, 238, pp. 49–57.
- Barussi, F. C. M., Bastos, F. Z., Leite, L. M.B., Fragoso, F. Y.I., Senegaglia, A. C., Brofman, P. R.S., Nishiyama, A., Pimpão, C. T. & Michelotto, P. V. (2016) 'Intratracheal therapy with autologous bone marrow-derived mononuclear cells reduces airway inflammation in horses with recurrent airway obstruction'. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 232, pp. 35–42.
- Biasutti, S., Dart, A. J. & Jeffcott, L. B. (2017) 'A review of recent developments in the clinical application of prosthetic laryngoplasty for recurrent laryngeal neuropathy: Indications, complications and outcome'. *Equine Veterinary Education*, 29(6), pp. 337–345.
- Block, G. J., Ohkouchi, S., Fung, F., Frenkel, J., Gregory, C., Pochampally, R., DiMattia, G., E. Sullivan, D.

- & Prockop, D. J. (2009) 'Multipotent Stromal Cells (MSCs) are Activated to Reduce Apoptosis in Part by Upregulation and Secretion of Stanniocalcin-1 (STC-1)'. *Stem Cells*, 27(3), pp. 670–681.
- Bond, S., Léguillette, R., Richard, E., Couetil, L., Lavoie, J. P., Martin, J. G. & Pirie, R. S. (2018) 'Equine asthma: Integrative biologic relevance of a recently proposed nomenclature'. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), pp. 2088–2098.
- Borjesson, D. L. & Peroni, J. F. (2011) 'The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease'. *Clinics in laboratory medicine*, 31(1), pp. 109–123.
- Bressan, F. F., Bassanezze, V., de Figueiredo Pessôa, L. V., Sacramento, C. B., Malta, T. M., Kashima, S.; Fantinato Neto, P., Strefezzi, R., Pieri, N., Krieger, J. E., Covas, D. T. & Meirelles, F. V. (2020) 'Generation of induced pluripotent stem cells from large domestic animals'. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), pp. 1–12.
- Brooks, D. E., Matthews, A. & Clode, A. B. (2017) 'Diseases of the cornea', en Gilger, B. C. (ed.) *Equine Ophtalmology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raš, A. & Mrowiec, J. (2014) 'Endometrosis - Significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods'. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(3), pp. 547–554.
- Bullone, M. & Lavoie, J. P. (2015) 'Asthma "of horses and men"-How can equine heaves help us better understand human asthma immunopathology and its functional consequences?'. *Molecular Immunology*, 66(1), pp. 97–105.
- Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszky, C. & Brehm, W. (2013) 'Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources'. *Veterinary Journal*, 195(1), pp. 98–106.
- Bussche, L., Harman, R. M., Syracuse, B. A., Plante, E., Lu, Y. C., Curtis, T. M., Ma, M. & Van De Walle, G. R. (2015) 'Microencapsulated equine mesenchymal stromal cells promote cutaneous wound healing in vitro'. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), pp. 1–15.
- Canisso, I. F., Segabinazzi, L. G. T. M. & Fedorka, C. E. (2020) 'Persistent breeding-induced endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology'. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4).
- Carrade, D. D., Lame, M. W., Kent, M. S., Clark, K. C., Walker, N. J. & Borjesson, D. L. *et al.* (2012) 'Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells '. *Cell Medicine*, 4(1), pp. 1–12.
- Cassano, J. M., Fortier, L. A., Hicks, R. B., Harman, R. M. & Van de Walle, G. R. (2018) 'Equine mesenchymal stromal cells from different tissue sources display comparable immune-related gene expression profiles in response to interferon gamma (IFN)- γ '. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 202, pp. 25–30.
- Cejka, C., Holan, V., Trosan, P., Zajicova, A., Javorkova, E. & Cejkova, J. (2016) 'The Favorable Effect of Mesenchymal Stem Cell Treatment on the Antioxidant Protective Mechanism in the Corneal Epithelium and Renewal of Corneal Optical Properties Changed after Alkali Burns'. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Publishing Corporation, 2016.

- Cejkova, J., Trosan, P., Cejka, C., Lencova, A., Zajicova, A., Javorkova, E., Kubinova, S., Sykova, E. & Holan, V. (2013) 'Suppression of alkali-induced oxidative injury in the cornea by mesenchymal stem cells growing on nanofiber scaffolds and transferred onto the damaged corneal surface'. *Experimental Eye Research*, 116, pp. 312–323.
- Cellular Tissue and Gene Therapies Advisory Committee (2005) 'Cellular products for joint surface repair'. FDA Center for Biologics Evaluation and Research March 3–4.
- Chang, H.-H., Hsu, S.-P. & Chien, C.-T. (2020) 'Intrarenal Transplantation of Hypoxic Preconditioned Mesenchymal Stem Cells Improves Glomerulonephritis through Anti-Oxidation, Anti-ER Stress, Anti-Inflammation, Anti-Apoptosis, and Anti-Autophagy Hao-Hsiang'. *Antioxidants*, 9, pp. 1–17.
- Chen, M., Przyborowski, M. & Berthiaume, F. (2009) 'Stem cells for skin tissue engineering and wound healing'. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, 37(4–5), pp. 399–421.
- Chen, S., Cui, G., Peng, C., Lavin, M. F., Sun, X., Zhang, E., Yang, Y., Guan, Y., Du, Z. & Shao, H. (2018) 'Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates pulmonary fibrosis of silicosis via anti-inflammatory and anti-apoptosis effects in rats'. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), pp. 1–12.
- Cho, H. H., Jang, S., Lee, S. C., Jeong, H. S., Park, J. S., Han, J. Y., Lee, K. H. & Cho, Y.B. (2010) 'Effect of neural-induced mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on facial nerve regeneration in an acute nerve injury model'. *Laryngoscope*, 120(5), pp. 907–913.
- Clinical Trials (2020). Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/> [Consultado el 25-08-2020]
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V. & Uccelli, A. (2006) 'Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions'. *Blood*, 107(1), pp. 367–372.
- Corradetti, B., Correani, A., Romaldini, A., Marini, M. G., Bizzaro, D., Perrini, C., Cremonesi, F. & Lange-Consiglio, A. (2014) 'Amniotic membrane-derived mesenchymal cells and their conditioned media: Potential candidates for uterine regenerative therapy in the horse'. *PLoS ONE*, 9(10), pp. 1–9.
- Cortés-Araya, Y., Amilon, K., Rink, B. E., Black, G., Lisowski, Z., Donadeu, F. X. & Esteves, C. L. (2018) 'Comparison of antibacterial and immunological properties of mesenchymal stem/stromal cells from equine bone marrow, endometrium, and adipose tissue'. *Stem Cells and Development*, 27(21), pp. 1518–1525.
- Couëtil, L. L., Cardwell, J. M., Gerber, V., Lavoie, J. P., Léguillette, R. & Richard, E. A. (2016) 'Inflammatory Airway Disease of Horses-Revised Consensus Statement'. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), pp. 503–515.
- Curto, E., Messenger, K. M., Salmon, J. H. & Gilger, B. C. (2016) 'Cytokine and chemokine profiles of aqueous humor and serum in horses with uveitis measured using multiplex bead immunoassay analysis'. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier B.V., 182, pp. 43–51.
- Davis, A. B., Schnabel, L. V. & Gilger, B. C. (2019) 'Subconjunctival bone marrow-derived mesenchymal stem cell therapy as a novel treatment alternative for equine immune-mediated keratitis: A case series'. *Veterinary Ophthalmology*, 22(5), pp. 674–682.
- Dai, R., Yu, Y., Yan, G., Hou, X., Ni, Y. & Shi, G. (2018) 'Intratracheal administration of adipose derived mesenchymal stem cells alleviates chronic asthma in a mouse model'. *BMC Pulmonary Medicine*, 18(1), pp. 1–9.
- Deschene, K., Céleste, C., Boerboom, D. & Theoret, C. L. (2012) 'Hypoxia regulates the expression of extracellular

- matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1'. *Journal of Dermatological Science*, 65(1), pp. 12–18.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. & Horwitz, E. M. (2006) 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement'. *Cytotherapy*. Elsevier, 8(4), pp. 315–317.
 - Draper, A. C. E. & Piercy, R. J. (2018) 'Pathological classification of equine recurrent laryngeal neuropathy'. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(4), pp. 1397–1409.
 - Dryden, V. C., Morrison, S., Bras, R. & Morrell, S. A. (2013) 'Using stem cells in clinical cases'. *Journal of Equine Veterinary Science*. Elsevier Inc, 33(10), pp. 872–873.
 - Eggenhofer, E., Benseler, V., Kroemer, A., Popp, F. C., Geissler, E. K., Schlitt, H. J., Baan, C. C., Dahlke, M. H. & Hoogduijn, M. J. (2012) 'Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion'. *Frontiers in Immunology*, 3(SEP), pp. 1–8.
 - Elce, Y. A. (2017) 'Approaches to Wound Closure', en Theoret, C. & Schumacher, J. (eds.) *Equine Wound Management*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 157–172.
 - Engiles, J. B. (2010) 'Pathology of the Distal Phalanx in Equine Laminitis: More Than Just Skin Deep'. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*, 26(1), pp. 155–165.
 - Falomo, M. E., Ferroni, L., Tocco, I., Gardin, C. & Zavan, B. (2015) 'Immunomodulatory role of adipose-derived stem cells on equine endometriosis'. *BioMed Research International*, 2015.
 - Ferris, R. A., Frisbie, D. D. & McCue, P. M. (2014) 'Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares'. *Theriogenology*. Elsevier Inc, 82(1), pp. 36–42.
 - Frank, N., Geor, R.J., Bailey, S.R., Durman, A.E. & Johnson, P.J. (2010) 'Equine metabolic syndrome'. *J Vet Intern Med*, 24, pp. 467–475.
 - Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. & Lalykina, K. S. (1970) 'The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells'. *Cell and tissue kinetics*, 3, pp. 393–403.
 - Furr, M. & Reed, S. (2015) 'Cervical Vertebral Stenotic Myelopathy', en *Equine Neurology* (2^a ed.) John Wiley & Sons, Inc., pp. 349–367.
 - Gelatt, K., Gilger, B. & Kern, T. V (2013) *Veterinary Ophthalmology*. 5th edn. Wiley-Blackwell.
 - Gerding, J. C. & Gilger, B. C. (2016) 'Prognosis and impact of equine recurrent uveitis'. *Equine Veterinary Journal*, 48(3), pp. 290–298.
 - Gershwin, L. (2007) 'Veterinary autoimmunity – autoimmune diseases in domestic animals'. *Ann NY Acad Sci.*, pp. 109–116.
 - Gilger, B. C., Stoppini, R., Wilkie, D. A., Clode, A. B., Pinto, N. H., Hempstead, J., Gerding, J. & Salmon, J. H. (2014) 'Treatment of immune-mediated keratitis in horses with episcleral silicone matrix cyclosporine delivery devices'. *Veterinary Ophthalmology*, 17(SUPPL.1), pp. 23–30.
 - Gilger, B. C. & Hollingsworth, S. R. (2016) 'Diseases of the uvea, uveitis, and recurrent uveitis', en Giler, B. C. (ed.) *Equine Ophthalmology* (3^a ed.) John Wiley & Sons, Inc., pp. 369–415.
 - Grady, S. T., Watts, A., Thompson, J. A., Penedo, M. C. T., Konganti, K. & Hinrichs, K. (2019) 'Effect of intra-ovarian

injection of mesenchymal stem cells in aged mares'. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(3), pp. 543–556.

- Greenberg, S. (2019) 'Ulcerative keratitis and keratomalacia in horses: Medical management and surgical considerations'. *Equine Veterinary Education*, 31(4), pp. 179–182.

- Gu, S., Xing, C., Han, J., Tso, M. O.M. & Hong, J. (2009) 'Differentiation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells into corneal epithelial cells in vivo and ex vivo Shaofeng'. *Molecular Vision*, 15, pp. 99–107.

- Gugjoo, M. B., Makhdoomi, D. M. & Sharma, G. T. (2019) 'Equine Mesenchymal Stem Cells: Properties, Sources, Characterization, and Potential Therapeutic Applications'. *Journal of Equine Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 72, pp. 16–27.

- Gyles, C. (2016) 'One Medicine, One Health, One World'. *Canadian Veterinary Journal*, 57, pp. 345–346.

- Harman, R. M. *et al.* (2017) 'Antimicrobial peptides secreted by equine mesenchymal stromal cells inhibit the growth of bacteria commonly found in skin wounds'. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), pp. 1–14.

- Harman, R. M., Theoret, C. L. & Van de Walle, G. R. (2019) 'The Horse as a Model for the Study of Cutaneous Wound Healing'. *Advances in Wound Care*, 00(00), pp. 1–19.

- Herrera, M. B., Bussolati, B., Bruno, S., Morando, L., Mauriello-Romanazzi, G., Sanavio, F., Stamenkovic, I., Biancone, L. & Camussi, G. (2007) 'Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury'. *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 72(4), pp. 430–441.

- Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B. & Schoon, H. A. (2009) 'The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis'. *Animal Reproduction Science*, 111(2–4), pp. 261–278.

- Horseman, S. V., Buller, H., Mullan, S. & Whay, H. R. (2016) 'Current welfare problems facing horses in Great Britain as identified by equine stakeholders'. *PLoS ONE*, 11(8), pp. 1–19.

- Hsiao, C. H., Ji, A. T., Chang, C. C., Cheng, C. J., Lee, L. M. & Ho, J. H. C. (2015) 'Local injection of mesenchymal stem cells protects testicular torsion-induced germ cell injury'. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), pp. 1–12.

- Hung, S.-C., Pochampally, R. R., Chen, S.-C., Hsu, S.-C. & Prockop, D. J. (2007) 'Angiogenic Effects of Human Multipotent Stromal Cell Conditioned Medium Activate the PI3K-Akt Pathway in Hypoxic Endothelial Cells to Inhibit Apoptosis, Increase Survival, and Stimulate Angiogenesis'. *Stem Cells*, 25(9), pp. 2363–2370.

- Hustace, J. L., Firshman, A. M. & Mata, J. E. (2009) 'Pharmacokinetics and bioavailability of metformin in horses'. *American Journal of Veterinary Research*, 70(5), pp. 665–668.

- Iacono, E., Brunori, L., Pirrone, A., Pagliaro, P. P., Ricci, F., Tazzari, P. L. & Merlo, B. (2012a) 'Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse'. *Reproduction*, 143(4), pp. 455–468.

- Iacono, E., Merlo, B., Pirrone, A., Antonelli, C., Brunori, L., Romagnoli, N. & Castagnetti, C. (2012b) 'Effects of mesenchymal stem cells isolated from amniotic fluid and platelet-rich plasma gel on severe decubitus ulcers in a septic neonatal foal'. *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 93(3), pp. 1439–1440.

- Iacono, E., Lanci, A., Merlo, B., Ricci, F., Pirrone, A., Antonelli, C., Mariella, J. & Castagnetti, C. (2016) 'Effects of amniotic fluid mesenchymal stem cells in carboxymethyl cellulose gel on healing of spontaneous pressure sores: Clinical

- outcome in seven hospitalized neonatal foals'. *Turkish Journal of Biology*, 40(2), pp. 484–492.
- James, F. M., Engiles, J. B. & Beech, J. (2010) 'Meningitis, cranial neuritis, and radiculoneuritis associated with *Borrelia burgdorferi* infection in a horse'. *Scientific Reports*, 237(10).
 - Jamnig, A. & Lepperdinger, G. (2012) 'From tendon to nerve: An msc for all seasons'. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90(3), pp. 295–306.
 - Jiang, T. S., Cai, L., Ji, W. Y., Hui, Y. N., Wang, Y. S., Hu, D. & Zhu, J. (2010) 'Reconstruction of the corneal epithelium with induced marrow mesenchymal stem cells in rats'. *Molecular Vision*, 16(July), pp. 1304–1316.
 - Kalra, K. & Tomar, P. C. (2014) 'Stem Cell: Basics, Classification and Applications'. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(7), pp. 919–930.
 - Katz, L. M. & Bailey, S. R. (2012) 'A review of recent advances and current hypotheses on the pathogenesis of acute laminitis'. *Equine Veterinary Journal*, 44(6), pp. 752–761.
 - Kean, T. J., Lin, P., Caplan, A. L. & Dennis, J. E. (2013) 'MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation'. *Stem Cells International*, 2013.
 - Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S. & Epstein, S. E. (2004) 'Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms'. *Circulation*, 109(12), pp. 1543–1549.
 - Knottenbelt, D. C. (2009) *Pascoe's Principles and Practice of Equine Dermatology* (2nd ed.)
 - Kocan, B., Maziarz, A., Tabarkiewicz, J., Ochiya, T. & Banaś-Ząbczyk, A. (2017) 'Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential'. *Stem Cells International*. Hindawi, 2017.
 - Kol, A., Walker, N. J., Nordstrom, M. & Borjesson, D. L. (2016) 'Th17 pathway as a target for Multipotent stromal cell therapy in dogs: Implications for translational research'. *PLoS ONE*, 11(2), pp. 1–14.
 - Kuffler, D. P. (2014) 'An assessment of current techniques for inducing axon regeneration and neurological recovery following peripheral nerve trauma'. *Progress in Neurobiology*. Elsevier Ltd, 116, pp. 1–12.
 - Lanci, A., Merlo, B., Mariella, J., Castagnetti, C. & Iacono, E. (2019) 'Heterologous Wharton's Jelly derived mesenchymal stem cells application on a large chronic skin wound in a 6-month-old filly'. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JAN), pp. 1–5.
 - Lassaline, M. & Wilkie, D. A. (2015) 'Clinical equine ophthalmology: The current state of the art'. *Equine Veterinary Journal*, 47(3), pp. 251–253.
 - Leblanc, M. & Causey, R. (2009) 'Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility'. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(SUPPL. 3), pp. 10–22.
 - Li, Y., Qu, T., Tian, L., Han, T., Jin, Y. & Wang, Y. (2018) 'Human placenta mesenchymal stem cells suppress airway inflammation in asthmatic rats by modulating Notch signaling'. *Molecular Medicine Reports*, 17(4), pp. 5336–5343.
 - Li, H., Shen, S., Fu, H., Wang, Z., Li, X., Sui, X., Yuan, M., Liu, S., Wang, G. & Guo, Q. (2019) 'Immunomodulatory functions of mesenchymal stem cells in tissue engineering'. *Stem Cells International*, 2019.
 - Liu, H., Xue, W., Ge, G., Luo, X., Li, Y., Xiang, H., Ding, X., Tian, P. & Tian, X. (2010) 'Hypoxic preconditioning advances

CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs'. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 401(4), pp. 509–515.

- Lombana, K. G., Goodrich, L. R., Phillips, J. N., Kisiday, J. D., Ruple-Czerniak, A. & Wayne Mcllwraith, C. (2015) 'An investigation of equine mesenchymal stem cell characteristics from different harvest sites: More similar than not'. *Frontiers in Veterinary Science*, 2(DEC), pp. 1–8.

- Lovati, A. B., Corradetti, B., Lange Consiglio, A., Recordati, C., Bonacina, E., Bizzaro, D. & Cremonesi, F. (2011) 'Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells'. *Veterinary Research Communications*, 35(2), pp. 103–121.

- Maia, L., Landim- Alvarenga, F. C., Taffarel, M. O., de Moraes, C. N., Machado, G. F., Melo, G. D. & Amorim, R. M. (2015) 'Feasibility and safety of intrathecal transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in horses'. *BMC Veterinary Research*, 11(1), pp. 1–9.

- Mambelli, L. I., Winter, G. H.Z., Kerkis, A., Malschitzky, E., Mattos, R. C. & Kerkis, I. (2013) 'A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometrosis'. *Theriogenology*. Elsevier Inc, 79(5), pp. 744–750.

- Mambelli, L. I., Mattos, R. C., Winter, G. H.Z., Madeiro, D. S., Morais, B. P., Malschitzky, E., Miglino, M. A., Kerkis, A. & Kerkis, I. (2014) 'Changes in expression pattern of selected endometrial proteins following mesenchymal stem cells infusion in mares with endometrosis'. *PLOS ONE*, 9(6), pp. 1–8.

- Marycz, K., Kornicka, K., Basinska, K. & Czyrek, A. (2016a) 'Equine Metabolic Syndrome Affects Viability, Senescence, and Stress Factors of Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Stem Cells: New Insight into EqASCs Isolated from EMS Horses in the Context of Their Aging'. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016

- Marycz, K., Kornicka, K., Grzesiak, J., Śmieszek, A. & Szlapka, J. (2016b) 'Macroautophagy and Selective Mitophagy Ameliorate Chondrogenic Differentiation Potential in Adipose Stem Cells of Equine Metabolic Syndrome: New Findings in the Field of Progenitor Cells Differentiation'. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi, 2016

- Marycz, K., Kornicka, K., Marędzia, M., Golonka, P. & Nicpoń, J. (2016c) 'Equine metabolic syndrome impairs adipose stem cells osteogenic differentiation by predominance of autophagy over selective mitophagy'. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(12), pp. 2384–2404.

- Marycz, K., Michalak, I. & Kornicka, K. (2018) 'Advanced nutritional and stem cells approaches to prevent equine metabolic syndrome'. *Research in Veterinary Science*. Elsevier, 118(January), pp. 115–125.

- Marycz, K., Szlapka-Kosarzewska, J., Geburek, F. & Kornicka-Garbowska, K. (2019) 'Systemic Administration of Rejuvenated Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Liver Metabolism in Equine Metabolic Syndrome (EMS)'. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(6), pp. 842–850.

- Marfe, G., Massaro-Giordano, M., Ranalli, M., Cozzoli, E., Di Stefano, C., Malafoglia, V., Poletti, M. & Gambacurta, A. (2012) 'Blood derived stem cells: An ameliorative therapy in veterinary ophthalmology'. *Journal of Cellular Physiology*, 227(3), pp. 1250–1256.

- Martinet, L., Fleury-Cappellesso, S., Gadelorge, M., Dietrich, G., Bourin, P., Fournie, J. J. & Poupot, R. (2009) 'A regulatory cross-talk between V γ 9V δ 2 T lymphocytes and mesenchymal stem cells'. *European Journal of Immunology*,

39(3), pp. 752–762.

- Matthews, A. & Gilger, B. (2010) 'Equine immune-mediated keratopathies'. *Equine Veterinary Journal*, 37, pp. 31–37.
- de Mattos Carvalho, A., Alves, A. L. G., Golim, M. A., Moroz, A., Hussni, C. A., de Oliveira, P. G. & Deffune, E. (2009) 'Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue'. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2–4), pp. 303–306.
- Morrison, S. (2010) 'Chronic laminitis: Foot management'. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. Elsevier Ltd, 26(2), pp. 425–446.
- Morrison, S. (2011) 'Successful use of allogenic umbilical cord-derived stem cells in nonresponsive chronic laminitic cases'. *Journal of Equine Veterinary Science*. Elsevier Inc., 31(10), p. 603.
- Mund, S. J. K., Kawamura, E., Awang-Junaidi, A. H. & Campbell, J. (2020) 'Homing and Engraftment of Intravenously Administered Equine Cord Blood-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells to Surgically Created Cutaneous Wound in Horses : A Pilot Project'. *Cells*, 9(May), pp. 0–23.
- Nagy, K. *et al.* (2011) 'Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts'. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(3), pp. 693–702.
- Navarrete, F., Saravia, F., Cisterna, G., Rojas, F., Silva Pedro, P., Rodríguez-Alvarez, L., Rojas, D., Cabezas, J., Mançanares Ana, C. & Castro Fidel, O. (2020) 'Assessment of the anti-inflammatory and engraftment potential of horse endometrial and adipose mesenchymal stem cells in an in vivo model of post breeding induced endometritis'. *Theriogenology*. Elsevier Ltd, 155(June), pp. 33–42.
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S.T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R.A. & Mezey, É. (2009) 'Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E 2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production'. *Nature Medicine*, 15(1), pp. 42–49.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2018). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es> [Consultado 25-08-2020]
- Pall, E., Toma, S., Crecan, C., Cenariu, M. & Groza, I. (2016) 'Isolation and Functional Characterization of Equine Adipos Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells'. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 10, pp. 412–416.
- Papa, P. de M., Guasti, P. N., De Vita, B., Nakazato, N. G., Maia, L., Freitas Dell'Aqua, C. P., Scheeren, V., Segabinazzi, L., de Andrade Junior, L. R. P., Silva, L. F., Araújo, E. A. B., Oliveira, S. N., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C. & Alvarenga, M. A. (2020) 'Clinical safety of intratesticular transplantation of allogeneic bone marrow multipotent stromal cells in stallions'. *Reproduction in Domestic Animals*, 55(4), pp. 429–437.
- 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 modifican 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.

- Pascucci, L., Curina, G., Mercati, F., Marini, C., Dall'Aglio, C., Paternesi, B. & Ceccarelli, P. (2011) 'Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: Towards the definition of minimal stemness criteria'. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Elsevier B.V., 144(3–4), pp. 499–506.
- Pirie, R. S. (2017) 'Mild to moderate equine asthma — an overview'. *Livestock*, 22(3), pp. 158–163.
- Prochazkova, M., Chavez, M. G., Prochazka, J., Felfy, H., Mushegyan, V. & Klein, O. D. (2015) 'Embryonic Versus Adult Stem Cells'. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Elsevier Inc.
- Pollitt, C. C. (2010) 'The Anatomy and Physiology of the Suspensory Apparatus of the Distal Phalanx'. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. Elsevier Ltd, 26(1), pp. 29–49.
- Raddcliffe, C. H., Flaminio, M. J. B. F. & Fortier, L. A. (2010) 'Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations'. *Stem Cells and Development*, 19(2), pp. 269–281.
- Rafei, M., Hsieh, J., Fortier, S., Li, M. Y., Yuan, S., Birman, E., Forner, K., Boivin, M. N., Doody, K., Tremblay, M., Annabi, B. & Galipeau, J. (2008) 'Mesenchymal stromal cell derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction'. *Blood*, 112(13), pp. 4991–4998.
- Raheja, L. F., Genetos, D. C. & Yellowley, C. E. (2008) 'Hypoxic osteocytes recruit human MSCs through an OPN/CD44-mediated pathway'. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(4), pp. 1061–1066.
- Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F. J., Remacha, A. R., Bernal, M. L., Zaragoza, P., Rodellar, C., & Martín-Burriel, I. (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*. Elsevier B.V., 144(1–2), pp. 147–154.
- Rasmusson, I., Uhlin, M., Le Blanc, K. & Levitsky, V. (2007) 'Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes'. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), pp. 887–893.
- Real Federación Hípica Española (2013) *Análisis del sector ecuestre, grandes cifras*, Real Federación Hípica Española.
- Regan, D. P., Aarnio, M. C., Davis, W. S., Carmichael, K. P., Vandenplas, M. L., Lauderdale, J. D. & Moore, P. A. (2012) 'Characterization of cytokines associated with Th17 cells in the eyes of horses with recurrent uveitis'. *Veterinary Ophthalmology*, 15(3), pp. 145–152.
- Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'Huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B. & Shi, Y. (2009) 'Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression'. *Stem Cells*, 27(8), pp. 1954–1962.
- Rink, B. E., Amilon, K. R., Esteves, C. L., French, H. M., Watson, E., Aurich, C. & Donadeu, F. X. (2017) 'Isolation and characterization of equine endometrial mesenchymal stromal cells', *Stem Cell Research and Therapy*. Stem Cell Research & Therapy, 8(1), pp. 1–12.
- Rink, B. E., Beyer, T., French, H. M., Watson, E., Aurich, C. & Donadeu, F. X. (2018) 'The Fate of Autologous Endometrial Mesenchymal Stromal Cells after Application in the Healthy Equine Uterus'. *Stem Cells and Development*, 27(15), pp. 1046–1052.
- Roddy, G. W., Oh, J. Y., Lee, R. H., Bartosh, T. J., Ylostalo, J., Coble, K., Rosa, R. H. & Prockop, D. J. (2011) 'Action at a

distance: Systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6'. *Stem Cells*, 29(10), pp. 1572–1579.

- Rüster, B., Göttig, S., Ludwig, R. J., Bistran, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J. & Henschler, R. (2006) 'Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells'. *Blood*, 108(12), pp. 3938–3944.

- Sadan, O., Melamed, E. & Offen, D. (2009) 'Bone-marrow-derived mesenchymal stem cell therapy for neurodegenerative diseases'. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 9(12), pp. 1487–1497.

- Saldinger, L. K., Nelson, S. G., Bellone, R. R., Lassaline, M., Mack, M., Walker, N. J. & Borjesson, D. L. (2020) 'Horses with equine recurrent uveitis have an activated CD4+ T-cell phenotype that can be modulated by mesenchymal stem cells in vitro'. *Veterinary Ophthalmology*, 23(1), pp. 160–170.

- Sandersen, C., Ceusters, J., Fourez, A., Tosi, I., Graide, H., Lejeune, J. P. & SerTEyn, D. (2018) 'Nerve stimulator-guided injection of autologous stem cells near the equine left recurrent laryngeal nerve'. *Journal of Visualized Experiments*, (139), pp. 1–7.

- Sauvage, A. C., Monclin, S. J., Elansary, M., Hansen, P. & Grauwels, M. F. (2019) 'Detection of intraocular *Leptospira* spp. by real-time polymerase chain reaction in horses with recurrent uveitis in Belgium'. *Equine Veterinary Journal*, 51(3), pp. 299–303.

- Schaakxs, D., Kalbermatten, D. F., Raffoul, W., Wiberg, M. & Kingham, P. J. (2013) 'Regenerative cell injection in denervated muscle reduces atrophy and enhances recovery following nerve repair'. *Muscle and Nerve*, 47(5), pp. 691–701.

- De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G. R. & Van Soom, A. (2011) 'Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity'. *Theriogenology*. Elsevier Inc., 75(8), pp. 1431–1443.

- De Schauwer, C., Meyer, E., Van de Walle, G. R. & Van Soom, A. (2013) 'Mesenchymal stem cell therapy in horses: Useful beyond orthopedic injuries?'. *Veterinary Quarterly*. Taylor & Francis, 33(4), pp. 234–241.

- Schumacher, J. & Wilmink, J. M. (2016) 'Free Skin Grafting', en Theoret, C. & Schumacher, J. *Equine Wound Management* (3rd ed.). John Wiley & Sons, Inc., pp. 422–448.

- Schwarz, C., Leicht, U., Rothe, C., Drosse, I., Luibl, V., Röcken, M. & Schieker, M. (2012) 'Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells'. *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 93(1), pp. 457–462.

- Seo, B. F. & Jung, S. N. (2016) 'The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in prevention or treatment of excessive scars'. *Stem Cells International*. Hindawi Publishing Corporation, 2016.

- Sherman, A. B., Gilger, B. C., Berglund, A. K. & Schnabel, L. V. (2017) 'Effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and stem cell supernatant on equine corneal wound healing in vitro'. *Stem Cell Research and Therapy*. Stem Cell Research & Therapy, 8(1), pp. 1–10.

- Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P., Rabson, A. B. & Guangwen, R. (2012) 'How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses'. *Trends Immunology*, 33(3), pp. 136–143.

- da Silva Meirelles, L., Fontes, A. M., Covas, D. T. & Caplan, A. I. (2009) 'Mechanisms involved in the therapeutic

properties of mesenchymal stem cells'. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5–6), pp. 419–427.

- da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I. & Nardi, N. B. (2008) 'In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells'. *Stem Cells*, 26(9), pp. 2287–2299.

- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. (2006) 'Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues'. *Journal of Cell Science*, 119(11), pp. 2204–2213.

- da Silva Meirelles, L. & Nardi, N. B. (2009) 'Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells'. *Frontiers in Bioscience*, 14(11), pp. 4281–4298.

- Smieszek, A., Kornicka, K., Szlapka-Kosarzewska, J., Androvic, P., Valihrach, L., Langerova, L., Rohlova, E., Kubista, M. & Marycz, K. (2019) 'Metformin Increases Proliferative Activity and Viability of Multipotent Stromal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue Derived from Horses with Equine Metabolic Syndrome'. *Cells*, 8(2), p. 80.

- Smith, R. K. W., Korda, M., Blunn, G. W. & Goodship, A. E. (2003) 'Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment'. *Equine Veterinary Journal*, 35(1), pp. 99–102.

- Snider, T. A., Sepoy, C. & Holyoak, G. R. (2011) 'Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data'. *Theriogenology*. Elsevier Inc., 75(9), pp. 1567–1581.

- Sole, A., Spriet, M., Galuppo, L. D., Padgett, K. A., Borjesson, D. L., Wisner, E. R., Brosnan, R. J. & Vidal, M. A. (2012) 'Scintigraphic evaluation of intra-arterial and intravenous regional limb perfusion of allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the normal equine distal limb using 99mTc-HMPAO'. *Equine Veterinary Journal*, 44(5), pp. 594–599.

- Sole, A., Bolwell, C., Riley, C. & Theoret, C. (2015) 'Descriptive survey of wounds in horses presented to Australian veterinarians'. *Austral Equine Vet*, 34, pp. 68–74.

- Sorrell, J. M., Baber, M. A. & Caplan, A. I. (2009) 'Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation'. *Tissue Engineering - Part A*, 15(7), pp. 1751–1761.

- Sotiropoulou, P. A., Perez, Sonia A., Gritzapis, Angelos D., Baxevanis, Constantin N. & Papamichail, M. (2006) 'Interactions Between Human Mesenchymal Stem Cells and Natural Killer Cells'. *Stem Cells*, 24(1), pp. 74–85.

- Spaas, J. H., Gambacurta, A., Poletini, M., Broeckx, S., Van Hoeck, F., De Schauwer, C., Van De Walle, G. R. & Van Soom, A. (2011) 'Purification and expansion of stem cells from equine peripheral blood, with clinical applications'. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 80(2), pp. 129–135.

- Spaas, J. H., Broeckx, S., Van De Walle, G. R. & Poletini, M. (2013) 'The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: A clinical evaluation in four horses'. *Clinical and Experimental Dermatology*, 38(3), pp. 280–284.

- Stewart, M. C. & Stewart, A. A. (2011) 'Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources, and Mechanisms of Action'. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice*. Elsevier Inc, 27(2), pp. 243–261.

- Subdirección general de producciones ganaderas y cinegéticas, Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios (2020) *El sector equino en cifras: principales indicadores económicos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

- Takehara, Y., Yabuuchi, A., Ezoe, K., Kuroda, T., Yamadera, R., Sano, C., Murata, N., Aida, T., Nakama, K., Aono, F., Aoyama, N., Kato, K. & Kato, O. (2013) 'The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function'. *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 93(2), pp. 181–193.
- Tárnok, A., Ulrich, H. & Bocsi, J. (2010) 'Phenotypes of Stem Cells from Diverse Origin', *Cytometry Part A*, (1), pp. 6–10.
- Tessier, L., Bienzle, D., Williams, L. B. & Koch, T. G. (2015) 'Phenotypic and immunomodulatory properties of equine cord blood-derived mesenchymal stromal cells'. *PLoS ONE*, 10(4), pp. 1–19.
- Textor, J. A., Clark, K. C., Walker, N. J., Aristizobal, F. A., Kol, A., LeJeune, S. S., Bledsoe, A., Davidyan, A., Gray, S. N., Bohannon-Worsley, L. K., Woolard, K. D. & Borjesson, D. L. (2018) 'Allogeneic Stem Cells Alter Gene Expression and Improve Healing of Distal Limb Wounds in Horses'. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(1), pp. 98–108.
- Theoret, C. (2009) 'Tissue engineering in wound repair: The three "r"s - Repair, replace, regenerate'. *Veterinary Surgery*, 38(8), pp. 905–913.
- Theoret, C. L., Olutoye, O. O., Parnell, L. K. S. & Hicks, J. (2013) 'Equine exuberant granulation tissue and human keloids: A comparative histopathologic study'. *Veterinary Surgery*, 42(7), pp. 783–789.
- Theoret, C. L., Bolwell, C. F. & Riley, C. B. (2016) 'A cross-sectional survey on wounds in horses in New Zealand'. *New Zealand Veterinary Journal*, 64(2), pp. 90–94.
- The United States Department of Agriculture (2015). 'Part I: Baseline Reference of Equine Health and Management in the United States'.
- Theoret, C. L. & Wilbanks, J. M. (2013) 'Aberrant wound healing in the horse: Naturally occurring conditions reminiscent of those observed in man'. *Wound Repair and Regeneration*, 21(3), pp. 365–371.
- Tögel, F., Weiss, K., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P. & Westenfelder, C. (2007) 'Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury'. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 292(5), pp. 1626–1635.
- Torricelli, P., Fini, M., Filardo, G., Tschon, M., Pischetta, M., Pacorini, A., Kon, E. & Giardino, R. (2011) 'Regenerative medicine for the treatment of musculoskeletal overuse injuries in competition horses'. *International Orthopaedics*, 35(10), pp. 1569–1576.
- Traggiai, E., Volpi, S., Schena, F., Gattorno, M., Ferlito, F., Moretta, L. & Martini, A. (2008) 'Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Both Polyclonal Expansion and Differentiation of B Cells Isolated from Healthy Donors and Systemic Lupus Erythematosus Patients'. *Stem Cells*, 26(2), pp. 562–569.
- Utter, M. E., Wotman, K. L., Armour, M. & Bagel, J. (2010) 'Clinical findings and outcomes of ulcerative keratomycosis in 30 horses in the mid-Atlantic United States (2006-2007)'. *Equine Veterinary Education*, 22(1), pp. 31–39.
- Villagrán, C. C., Amelse, L., Neilsen, N., Dunlap, J. & Dhar, M. (2014) 'Differentiation of equine mesenchymal stromal cells into cells of neural lineage: Potential for clinical applications'. *Stem Cells International*, 2014, pp. 13–18.
- Villagrán, C. C., Schumacher, J., Donnell, R. & Dhar, M. S. (2016) 'A novel model for acute peripheral nerve injury in the horse and evaluation of the effect of mesenchymal stromal cells applied in situ on nerve regeneration: A preliminary study'. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(SEP), pp. 1–8.
- Wang, S., Yu, L., Sun, M., Mu, S., Wang, C., Wang, D. & Yao, Y. (2013) 'The therapeutic potential of bone marrow

- mesenchymal stem cells in premature ovarian failure'. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1).
- Wang, S. & Zhao, R. (2013) A historical overview and concepts of mesenchymal stem cells. En: Zhao RC (ed.). *Essentials of Mesenchymal Stem Cell Biology and Its Clinical Translation*. Dordrecht: Springer.
 - Wang, X. & Lebrech, H. (2017) 'Immunophenotyping: Application to Safety Assessment'. *Toxicologic Pathology*, 45(7), pp. 1004–1011.
 - Wilmink, J. M., Hertzen, J., Weeren, P. R. & Barneveld A. (2010) 'Retrospective study of primary intention healing and sequestrum formation in horses compared to ponies under clinical circumstances'. *Equine Veterinary Journal*, 34(3), pp. 270–273.
 - Wilmink, J. M. (2017) 'Differences in Wound Healing between Horses and Ponies', en Theoret, C. & Schumacher, J. (eds.) *Equine Wound Management* (3^e ed.) John Wiley & Sons, Inc., pp. 14–29.
 - Witkowski, L., Cywinska, A., Paschalis-Trela, K., Crisman, M. & Kita, J. (2016) 'Multiple etiologies of equine recurrent uveitis - A natural model for human autoimmune uveitis: A brief review'. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 44, pp. 14–20.
 - Woodward, E. M., Christoffersen, M., Campos, J., Betancourt, A., Horohov, D., Scoggin, K. E., Squires, E. L. & Troedsson, M.H.T. (2013) 'Endometrial inflammatory markers of the early immune response in mares susceptible or resistant to persistent breeding-induced endometritis'. *Reproduction*, 145(3), pp. 289–296.
 - Wright, K. T., El Masri, W., Osman, A., Chowdhury, J. & Johnson, W.E.B. (2011) 'Concise review: Bone marrow for the treatment of spinal cord injury: Mechanisms and clinical applications'. *Stem Cells*, 29(2), pp. 169–178.
 - Wyllie, A. H. (2010) "Where, o death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology'. *Molecular Neurobiology*, 42(1), pp. 4–9.
 - Zhao, J., Zhang, Q., Wang, Y. & Li, Y. (2015) 'Uterine infusion with bone marrow mesenchymal stem cells improves endometrium thickness in a rat model of thin endometrium'. *Reproductive Sciences*, 22(2), pp. 181–188.
 - Zhou, R. & Caspi, R. R. (2010) 'Ocular immune privilege'. *F1000 Biology Reports*, 2(1), pp. 1–3.
 - Zucca, E., Corsini, E., Galbiati, V., Lange-Consiglio, A. & Ferrucci, F. (2016) 'Evaluation of amniotic mesenchymal cell derivatives on cytokine production in equine alveolar macrophages: An in vitro approach to lung inflammation'. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), pp. 1–10.