



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

IDENTIFICACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE UN
MARCADOR DE PLURIPOTENCIALIDAD (SOX-2) PROPIO DE
CÉLULAS TRONCALES/PROGENITORAS ENDOMETRIALES
EN EL ÚTERO DE LA PERRA (*CANIS FAMILIARIS*) DE
DIFERENTES EDADES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

NYDIA CAROLINA ANZALDÚA TORRES

Asesores:

DR. Santiago René Anzaldúa Arce

MVZ. Dipl. Héctor Villaseñor Gaona



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida. A mi madre, por brindarme siempre su amor, apoyo incondicional sobrepasando inteligentemente los obstáculos que se presenten, por ser un ejemplo a seguir, por su compañía y sabios consejos. A mi padre, por darme su amor, apoyo incondicional, su compañía, por ser maestro en mi vida y en mi formación profesional. A mis hermanos Alan y Arturo, por acompañarme en este camino brindándome su amor, apoyo y alegría, por compartir muchos momentos y aprendizajes. A mis profesores, gracias por su tiempo y enseñanzas. A todos los animales que ayudaron en mi formación profesional durante la carrera. A mis amigos, especialmente a Mikado y Jacob por ser personas únicas de confianza y apoyo sin importar la distancia y el tiempo. A mis amigos de la carrera, gracias a cada uno de ustedes por todos los momentos compartidos, por dejarme enseñanzas, excelentes recuerdos y por haber tocado mi corazón, sin ustedes no hubiera sido lo que fue, los valoro mucho.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi padre y asesor de tesis, Santiago, por su amor, por todo el apoyo, por ser indispensable en este trabajo, por hacer este logro posible.

A mi madre, Claudia, por su amor, su apoyo, sus consejos y enseñanzas, por corregir mis fallas y alegrarse de mis logros.

A mi asesor de tesis, Héctor Villaseñor Gaona, por todo el apoyo recibido a lo largo de este trabajo de investigación.

Al laboratorista Emilio Francisco López López, por su asesoría técnica, procesamiento y corte de las muestras.

A mis sinodales, Dra. Rosa María Páramo Ramírez, Dra. Susana Rojas Maya, Dr. Raúl Ocádiz Tapia y Dr. Alberto Fouilloux Morales que con sus opiniones y correcciones guiaron este trabajo. A los profesores e instituciones que colaboraron con el material presentado en esta tesis.

A los compañeros que me ayudaron con el procesamiento de las muestras, por compartir lo aprendido conmigo.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente en la realización de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Importancia funcional de Sox-2 como proteína fundamental para determinar y mantener la pluripotencia	4
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
1. Animales.....	14
2. Obtención de muestras.....	15
3. Procedimiento Inmunohistoquímico	15
4. Cuantificación celular.....	17
5. Análisis histomorfológicos	18
6. Análisis de los datos	19
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN	23
A) Gelatina de Wharton como control positivo para células que expresan Sox-2.	23
B) Cuantificación de células positivas a Sox-2 en el útero	25
C) Características morfológicas de las células inmunopositivas a Sox-2	26
D) Células inmunopositivas a Sox-2 como candidatas para MSC en el endometrio de la perra	28
E) Células positivas a Sox-2 y cáncer.....	32
F) Perspectivas del estudio de células Sox-2+ en el útero	34
CONCLUSIONES	40
REFERENCIAS	43
FIGURAS	49

RESUMEN

ANZALDÚA TORRES NYDIA CAROLINA. Identificación inmunohistoquímica de un marcador de pluripotencialidad (Sox-2) propio de células troncales/progenitoras endometriales en el útero de la perra (*Canis familiaris*) de diferentes edades (bajo la dirección de MVZ, DR. Santiago René Anzaldúa Arce y MVZ, Dipl. Héctor Villaseñor Gaona).

Con la finalidad de identificar y caracterizar morfológicamente las células inmunopositivas a Sox-2 (Sox-2+), en el endometrio de la perra, se formaron dos grupos (n=6): animales adultos de 2 a 7 años y un grupo de hembras gerontes de 7 años en adelante. Las muestras se obtuvieron por histerectomía y se procesaron los cuernos por el procedimiento de inclusión en parafina y por inmunohistoquímica. Se cuantificaron las células mediante una retícula ocular micrométrica en un microscopio fotónico y un aumento total de 400X, el número de células se correlacionó con la intensidad de la marca mediante el puntaje inmunohistoquímico (HSCORE). Además, se determinó la forma de las células (alargadas o redondas), su ubicación (lámina propia superficial, media y profunda) o en el miometrio y cercanía a los vasos sanguíneos (VS). Se utilizaron muestras de cordón umbilical de perro y humano como controles positivos. No se observaron diferencias significativas en el HSCORE de ambos grupos (adultas: 0.72 ± 0.055 y gerontes: 0.73 ± 0.0), el cordón de perro tuvo ocho veces más células

inmunopositivas (5.92 ± 0.695) que el endometrio. El 61% y el 58% se localizaron en la parte profunda de la lámina propia en animales adultos y gerontes respectivamente, mientras que el 11% y el 7% de las células se localizaron en el miometrio de animales adultos y gerontes respectivamente. La mayor parte de las células Sox-2+ (76 y 70%) se localizaron lejos de los vasos sanguíneos en perras adultas y gerontes respectivamente. El 59% (adultas) y el 68% (gerontes) fueron células alargadas. Podemos concluir que las células Sox-2+ en el útero de perras adultas y gerontes presentan características histomorfológicas que las hacen candidatas a considerarse como Células Troncales/Progenitoras Pluripotenciales.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales del adulto o somáticas son las células indiferenciadas observadas en varios tejidos después del nacimiento. Tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en uno o más linajes celulares distintos, poseen un potencial proliferativo ilimitado (a lo largo de toda la vida) (Eckfeldt et al., 2005), en el caso de las células troncales hematopoyéticas, tienen la propiedad de formar colonias celulares a partir de una célula, por lo que se llaman también Unidades formadoras de colonias (CFU). Las células troncales participan en la reconstitución o regeneración tisular durante el envejecimiento y en caso de lesiones tisulares (Cabezas et al., 2014; Hosseinkhani et al., 2014) manteniendo la homeostasis al proporcionar células de reemplazo para la reparación de los tejidos dañados.

Uno de los grandes descubrimientos en el estudio de las células troncales y la medicina regenerativa se llevó a cabo cuando Sinya Yamanaka y Takahashi (2006) lograron la reprogramación de células somáticas (fibroblastos de piel) en células troncales pluripotentes inducidas (iPS), mediante la expresión forzada de factores de transcripción propios de células troncales embrionarias (ESC): Oct4, Sox-2, c-MYC y Klf4. Desde entonces la expresión de estos genes se han considerado como marcadores de pluripotencia. Los marcadores de pluripotencia, como Sox2, Nanog y Oct-4 se expresan en células troncales adultas y embrionarias (ESC) (Chaparro y Beltrán, 2009).

El endometrio uterino es uno de los tejidos más dinámicos en hembras de mamíferos, consiste en un epitelio de revestimiento, epitelio glandular y lámina

propia que son completamente renovados en cada ciclo estral (o menstrual en el caso de las mujeres).

Importancia funcional de Sox-2 como proteína fundamental para determinar y mantener la pluripotencia

Sox2 es miembro de la familia Sox (SRY-related HMG-box), que actúan como factor de transcripción que se expresa en ESC, en células germinales y algunas SC adultas, específicamente células nerviosas. La ausencia de Sox2 en embriones causa la muerte debido al desarrollo inadecuado del epiblasto. Tal como Oct4, Sox2 es indispensable para mantener la pluripotencialidad de ESC. (Pelayo et al., 2011.).

Oct3 / 4, Sox2, y Nanog son importantes factores de transcripción expresados por ESC y regula procesos como la auto-renovación y evita la diferenciación (Go et al., 2008). Estos factores de transcripción interactúan entre sí para supervisar una vasta red reguladora que mantiene la pluripotencia constituyendo un circuito de pluripotencia.

Los factores Oct4, Sox2 y Nanog regulan grupos de genes por medio de la unión con secuencias reguladoras como promotores y amplificadores (*enhancers*) para dichos genes. En células diferenciadas, los genes de pluripotencia no se expresan, (Pelayo et al., 2011).

Como se ha mencionado, Shinya Yamanaka y su colaborador Takahashi de la Universidad de Kioto (Japón) fueron los primeros en lograr reactivar la expresión de los genes de pluripotencialidad y autorrenovación en células diferenciadas (fibroblastos). Para este experimento utilizaron fibroblastos de ratón extraídos de

fetos y de la cola de animales adultos a estas células reprogramadas se les denominó células pluripotenciales inducidas (iPS). (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Años después se aislaron células de los tejidos endometriales humanos y reprogramaron los fibroblastos endometriales (EMF) en EMF-iPSs. Los resultados cuantitativos de la PCR mostraron que EMF-iPSCs preservó las características genéticas de una etapa primitiva del embrión evidenciado por la expresión de genes como Oct-4, Sox2, Nanog y Klf4. Los EMF-iPSCs pueden diferenciarse eficientemente en células adipogénicas, osteogénicas y neuronales (Chen et al., 2012) que son algunas características propias de las Células Troncales Mesenquimales (MSC).

Una prueba de la pluripotencia de las células iPS es la formación de cuerpos embriodes, que se obtienen cuando las células se ponen en un medio de cultivo líquido en lugar de sólido; los cuerpos embrioides de las iPSCs derivadas de las células endometriales expresaron altos niveles de los marcadores para el endodermo (por ejemplo, AFP y GATA4), mesodermo (por ejemplo, RUNX1 y braquianuria) y ectodermo (por ejemplo, nestin y NCAM1). (Sajini et al., 2012).

Una de las mayores ventajas y atractivo terapéutico de las iPS es que pueden obtenerse de las células somáticas del paciente, evitando así el potencial de rechazo inmune, y que evitan las implicaciones éticas asociadas con las células troncales embrionarias (ESC) ya que cuando se utilizan como fuente de células pluripotentes debe destruirse el embrión (Yi-Jen et al., 2012).

Otra prueba de la pluripotencialidad de las iPS es la capacidad de producir teratomas cuando se injertan por debajo de la piel o en la superficie renal de ratones atímicos, esta característica puede representar un riesgo para su utilización clínica directa, en parte se debe a que estas células expresan ciertos oncogenes como es el caso de c-MYC, por esta razón la sustitución de c-Myc por L-Myc en combinación con Oct-4, Sox2 y Klf4 promueve la generación de iPSC sin formación de teratomas (Tsuji et al 2011). Tsuji et al (2011) demostraron que el trasplante de células troncales neurales indiferenciadas que forman *in vitro* neuroesferas derivadas de clones iPS una vez injertados en las médulas espinales lesionadas promovieron una recuperación funcional sin ninguna formación de teratomas. Esta evidencia molecular, histológica y de diferenciación demuestra que las iPSC sin c-Myc, pueden ser una fuente celular más factible para la terapia de reemplazo basada en iPSCs y su estudio *in vitro*. (Yi-Jen et al., 2012).

Existen múltiples correlaciones funcionales entre estos factores de transcripción, así Sox2 no es necesario para iniciar la transcripción tanto de Oct4 o Nanog durante la embriogénesis y como también Oct4 no es necesario para iniciar la expresión del cigoto de Sox2 o Nanog. Estos hallazgos fueron sorprendentes para los investigadores ya que Sox2 y Oct4 habían sido considerados como factores que trabajaban juntos para impulsar la transcripción de sus propios genes, así como la transcripción de Nanog en ESC. Mientras Sox2 puede ser necesario para impulsar la transcripción Oct4 en ESC (Rizzino y Wuebben, 2016).

Sox2 existe en grandes complejos de proteínas en ESC (Rizzino y Wuebben, 2016). Es importante destacar que Sox2 no sólo forma complejos con los otros nueve

factores de transcripción en ESC, sino que estos 10 factores de transcripción se asocian con muchas otras proteínas en común. Así SOX2 y OCT4 se asocian con proteínas (por ejemplo, RPA1, RPA2 y RPA3) involucradas en la replicación y reparación (Rizzino y Wuebben, 2016).

En 2005 Boyer *et al.* Determinaron que SOX2 y OCT4 se unen a aproximadamente 1271 y 623 genes respectivamente, mucho más revelador fue el hallazgo de que SOX2 y OCT4 co-ocupaban aproximadamente 400 de estos genes (más del 30% de los genes unidos por SOX2 y más del 60% de los genes unidos por OCT4). (Rizzino y Wuebben, 2016). Además, Nanog se une a 1687 genes. Es notable que los tres factores coincidan en la ocupación de 353 promotores. (Pelayo et al., 2011).

Se destacan dos facetas de la función de SOX2, que son la diferenciación y la proliferación de células troncales mesenquimales humanas (hMSCs). El mecanismo molecular por el cual la pérdida de SOX2 induce la diferenciación se ha explorado y se demostró que DKK1 (Dickkopf-1) es un objetivo transcripcional directo de SOX2 en hMSC, La expresión de SOX2 en hMSCs también es importante para la proliferación y multipotencia de hMSCs, en gran medida a través de la regulación de la expresión de DKK1 y c-MYC. Este mecanismo puede observarse en otras células troncales del adulto (ASC) que exhibieron niveles similares de expresión de SOX2. Estos resultados proporcionan una nueva función y mecanismo de regulación de SOX2 en la diferenciación de ASC (Park et al., 2012).

La expresión de SOX2 se ha detectado en ESC y en varios tejidos derivados de hMSCs, incluyendo el tejido adiposo, dermis, corazón y el tejido neural. (Park et al., 2012).

La expresión de Sox-2 varía dependiendo del órgano que se trate, así cuando se determina la expresión de esta proteína mediante qRT-PCR tiende a ser mayor en las células troncales mesenquimales (MSCs) de médula ósea que en MSCs de tejido adiposo mientras que la expresión de Nanog en este último tejido fue 2,5 veces más alto que en médula ósea. ($P < 0,01$) (Park et al., 2012).

Los estudios sobre la biología de células troncales adultas en el tejido uterino están muy por detrás de otras áreas de la investigación con células tumorales a pesar de que el útero experimenta los cambios proliferativos más extensos y la remodelación en mamíferos adultos.

Diversos investigadores consideran que en la mujer y el ratón el reemplazo de células endometriales después de la menstruación y durante el estro, respectivamente, así como el crecimiento uterino durante la gestación en ambas especies, depende de la activación, proliferación y diferenciación de las células troncales/progenitoras presentes en el tejido uterino (Gargett y Masuda, 2010; Ono et al., 2007; Teixeira et al., 2008).

Las células troncales Mesenquimales (MSCs) están presentes en varios órganos y tejidos, incluyendo el endometrio de mujeres, bovinos, ratones y cerdos (Chan et al., 2004; Gargett, 2007; Miernik and Karasinski, 2012) de donde pueden ser aislados y cultivados *in vitro* autorrenovándose de manera constante y manteniendo un fenotipo indiferenciado. Las células troncales mesenquimales pueden ser inducidas a diferenciarse en diversos linajes mesodérmicos *in vitro* e *in vivo*, cuando son sometidas a los estímulos apropiados (C. Hoffmann et al., 2009; Kocafe et al., 2010; Vater et al., 2011; Violini et al., 2009).

Aunque las MSCs pueden obtenerse de diferentes fuentes como células derivadas de médula ósea y cordón umbilical; las MSCs constituyen solamente un 0.0001-0.01% de todas las células de médula ósea (Pittenger et al., 1999) y tienen una esperanza de vida limitada; sin embargo el tejido adiposo contiene centenares de miles de MSCs en cada gramo de grasa (Sen et al., 2001) el cual puede obtenerse mediante procedimientos de lipoaspiración de manera sencilla, además tiene la ventaja de tener un potencial igual o similar de diferenciación de otras fuentes de MSCs; por estas razones, son usadas de manera extensa. En el caso del útero es una fuente de gran cantidad de células troncales ya que puede extirparse todo el órgano, pues no se trata de un órgano vital, en hembras que no sean destinadas a la reproducción o que su periodo reproductivo haya finalizado, algo que no es posible con otras fuentes de células troncales del adulto. Recientemente se ha demostrado que las MSCs obtenidas del endometrio humano o de la sangre menstrual tienen la capacidad para diferenciarse *in vitro* en células del linaje mesodérmico, del mismo modo han pasado diversas pruebas clínicas en seres humanos al evaluar la seguridad y eficacia en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva y en pacientes que han sufrido infarto del miocardio al observar una mayor recuperación y reducción de la fibrosis (Bockeria et al., 2013), por lo que desafía el papel del tejido adiposo como la mejor fuente de MSCs.

Las MSC poseen características tales como la clonogenicidad y la multipotencialidad, ya que pueden diferenciarse *in vitro* en linajes adipogénicos, condrogénicos y osteogénicos. Estas células pueden inducirse a diferenciar *in vitro* no sólo los linajes mesodérmicos sino también endodérmicos y ectodérmicos. Así

que muestran una gran capacidad regenerativa para varios órganos y tejidos incluyendo el endometrio.

La capacidad de inmunomodulación de las MSC puede facilitar su uso clínico alogénico en medicina regenerativa y puede tener importantes implicaciones en el crecimiento tumoral. El endometrio es una fuente alternativa y accesible para MSCs en seres humanos, ratones, vacas, cerdos y ovejas, sin embargo, dicha capacidad debe ser determinada en estas células

Existen algunas evidencias basadas en estudios de clonación celular en seres humanos en los que se han demostrado la existencia de MSCs en la lámina propia del endometrio en mujeres (Cervelló et al., 2007; Gargett, 2004; Schwab et al., 2005; Tanaka et al., 2003). Estas células se han propagado clonalmente *in vitro* y logrado la expresión de diversas proteínas que constituyen marcadores moleculares de células troncales mesoteliales como son: Oct4, CD14, CD34, CD45 y Stro-1 (Meng et al., 2007). *In vitro* se ha podido inducir su diferenciación en cardiomiocitos, células epiteliales respiratorias, células nerviosas, miocitos estriados esqueléticos, células endoteliales, linajes pancreáticos, hepáticos, adiposos y osteogénicos y se han propuesto como una alternativa ética autóloga para la regeneración endometrial en mujeres (Meng et al., 2007) a pesar de que el endometrio cuenta con sus propias células troncales que pueden llevar a cabo esta función sin requerir adición de MSCs provenientes de otra fuente. Se ha aprobado el uso de células MSCs en ensayos pre-clínicos en animales y en pruebas clínicas en humanos desde 2008 sin mostrar efectos negativos en pacientes (Bockeria et al., 2013). La mayoría de la

investigación sobre MSCs endometriales se ha realizado en seres humanos, sin embargo, en ratones también se han descrito poblaciones de células troncales endometriales en el tejido epitelial y el conjuntivo del endometrio (Gargett, 2007; Schwab et al., 2005) así como en el oviducto cerca del ampulla (Y. Wang et al., 2012). En los animales domésticos se han aislado células troncales/progenitoras en el endometrio uterino de la vaca (Donofrio et al., 2008). Estas células se podrían diferenciar al linaje osteogénico *in vitro* y exhibir propiedades relacionadas principalmente con células derivadas de la médula ósea. Más recientemente también se ha demostrado la presencia de MSCs endometriales en cerdas jóvenes y cerdas adultas, sin embargo no se menciona que el número de células sea similar en éstos grupos de animales; éstas células exhibieron diferentes marcadores de superficie comparadas con el ser humano, los ratones y las células troncales/progenitoras endometriales (CTPE) del bovino ya que fueron positivas a: CD29, CD44, CD105, CD140b y CD144, mientras que fueron negativas a CD34, CD45 y el factor de transcripción nuclear Oct4 (Miernik and Karasinski, 2012). No se ha estudiado la presencia de células MSCs endometriales en otras especies domésticas como la perra a pesar de tener gran interés clínico ya que padecen de ciertas afecciones como la hiperplasia endometrial quística y diversos tumores uterinos.

El estudio de las MSC endometriales en animales domésticos es un campo nuevo y prometedor, ya que a través de la comprensión de la fisiología y biología de estas células, la fisiopatología de las enfermedades reproductivas, como la hiperplasia del endometrio quístico en los perros y la endometriosis equina, podría ser mejor

comprendida para proponer nuevos tratamiento, dicho estudio también puede ayudar a entender y tratar los problemas de infertilidad debido a la hipoplasia o la atrofia endometrial.

En los bovinos se han realizado estudios inmunohistoquímicos en los que CTPE fueron positivas fundamentalmente a: Oct4, SOX-2 y CD44, considerados como los principales marcadores moleculares de estas células *in situ* (Cabezas et al., 2014). Oct4 y SOX-2 son factores de transcripción donde reside en parte la pluripotencialidad (Park et al., 2011; Schwab et al., 2008) y CD44 es un marcador de células troncales del adulto (Taylor, 2004).

Bajo la influencia de hormonas esteroides, tales como el incremento cíclico en la concentración plasmática del estradiol, las CTPE migran y producen un incremento de células progenitoras que a su vez se diferencian en células diferenciadas especializadas, como son epiteliales, estromales y vasculares dentro de un determinado microambiente. Se desconoce si estas células se encuentran en cantidades similares sin la influencia de estas hormonas esteroides en animales en anestro y si existen diferencias en el número de células que expresan a Sox-2 en perras adultas y gerontes

HIPÓTESIS

Se han identificado células inmunopositivas al marcador de pluripotencia Sox-2 en el útero de diversas especies de mamíferos, por lo que es posible que se observen en el útero de perras tanto adultas como gerontes en cantidades y localización histológica similares.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar por procedimientos inmunohistoquímicos la presencia y localización de células troncales/progenitoras inmunopositivas al marcador de pluripotencialidad Sox-2 en el endometrio y miometrio de perras adultas y gerontes en anestro, para conocer las posibles modificaciones en la cuantificación de estas células.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar por inmunohistoquímica y cuantificar las células Sox-2 positivas en el endometrio y miometrio de perras adultas y gerontes en anestro.
2. Caracterizar la morfología, localización histológica y cercanía a los vasos sanguíneos de células inmunopositivas a Sox-2 del endometrio y miometrio de perras adultas y gerontes en anestro.
3. Comparar el número, localización y morfología de las células inmunopositivas a Sox-2 de los dos grupos estudiados: perras adultas y gerontes en anestro.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizaron 12 perras en diferentes edades que se dividieron en los siguientes grupos (n=6):

Grupo I: Perras adultas en edad reproductiva (de 2 a 6 años).

Grupo II: Perras gerontes (7 años en adelante).

Grupo III: 3 cordones umbilicales de perro que se consideraron como testigo.

Además de los dos grupos anteriores se recolectaron 3 cordones umbilicales de perro para ser utilizado como grupo testigo. Se procesaron también muestras de cordón umbilical humano con la finalidad de corroborar la presencia de células inmunopositivas, ya que el anticuerpo primario está dirigido a proteínas de estas células. Éste material fue donado por la Facultad de Medicina de la UNAM.

Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- a) Hembras de diferentes razas y edades de acuerdo a los grupos mencionados (adultas y gerontes).
- b) Todas las hembras consideradas no presentaron alteraciones funcionales en el tracto reproductor.
- c) Para ambos grupos se escogieron aquellas que de acuerdo con las características morfológicas del útero y de los ovarios de los animales estuvieran en anestro. Durante el anestro, el endometrio es delgado y está revestido por epitelio cúbico simple. Las glándulas uterinas se esparcen, y tienen forma tubular ramificada o simple. Durante el anestro los ovarios están

en reposo. El cuerpo lúteo continúa su involución y el desarrollo folicular se detiene. (Banks et al., 1996).

2. Obtención de muestras

Todos los animales incluidos en el estudio se sometieron quirúrgicamente a ovario-salpingo histerectomía (OSH), con todos los procedimientos protocolarios y precauciones de una cirugía convencional.

Los úteros se lavaron intraluminalmente dos veces con SSF estéril y el tercio medio de cada cuerno se introdujo en una solución de Paraformaldehído al 4% en PBS pH 7.4 (solución de PAF), por un máximo de 24 horas.

Se determinó la edad de los animales de acuerdo a la historia clínica y por su morfología ovárica se clasificaron en la etapa de anestro.

3. Procedimiento Inmunohistoquímico

Posteriormente las muestras se procesaron rutinariamente mediante un procesador automático de tejidos (American Optical p 800®) para su inclusión en parafina y se cortaron mediante un micrótopo (Spenser 820®) a 4-5 μm de grosor, posteriormente se colocaron en laminillas previamente tratadas con Poly-L-lisina (Sigma®).

Las muestras se desparafinaron a 37°C durante toda la noche y rehidrataron a través de concentraciones decrecientes de alcohol a PBS. Para la recuperación antigénica se llevó a cabo mediante la colocación de las muestras en frascos de Koplín con una solución de Citrato de sodio 0.1 mM a un pH de 6 en autoclave a

90°C durante 10 min. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 10 min y después de este procedimiento, las laminillas se colocaron en solución PBS (pH 7.4) durante 5 min. y se incubaron sucesivamente en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 10 min. a temperatura ambiente con la finalidad de inactivar las peroxidases endógenas; para inactivar los sitios inespecíficos se les colocaron gotas de suero de caballo (2.5%) por 10 min.; después para su permeabilización se hicieron tres lavados con una solución PBS-Tritón X-100 al 0.05% en PB, finalmente se hicieron nuevamente 3 lavados con solución de PBS-Tritón X-100.

Posteriormente las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (diluído 1:200); se emplearon como anticuerpo primario contra la proteína SOX2 (anticuerpo monoclonal desarrollado en el conejo Santa Cruz, clona H-65), se colocó en una cámara húmeda a una temperatura de 2-4°C durante toda la noche.

Para evidenciar la reacción antígeno-anticuerpo, se utilizó un segundo anticuerpo del kit ImmPRESS™ HRP Universal Antibody (Vector Laboratories) que consiste en un polímero desarrollado en caballo que contiene además del segundo anticuerpo (Anti-Mouse IgG/Anti-Rabbit IgG) la enzima peroxidasa. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda durante 2 hrs. Con gotas de este kit.

Posteriormente las muestras se lavaron en PBS durante 5 min.

La actividad de la peroxidasa fue revelada usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y como substrato H₂O₂ al 0.015% en una solución proporcionada por el fabricante (Kit de revelado de Vector Laboratories) durante un lapso de 30s a 3 min. Monitoreando la reacción al microscopio fotónico. Una vez que la reacción fue evidenciada las muestras se colocaron en agua destilada.

Después las secciones se contrastaron con Hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y montaron con medio de montaje (Permount). Se utilizaron cortes como testigo en los cuales el primer anticuerpo se sustituyó por suero normal de caballo (ImmPRESS™ HRP Universal Antibody Kit, Vector Laboratories) (García del Moral, 1993; Goulding et al., 1995).

Las observaciones y las imágenes fueron hechas usando un microscopio óptico (Carl Zeiss) unidos a una cámara de video unido a una computadora y un software de digitalización de imágenes (Image proplus) para su análisis y almacenamiento.

La inmunotinción se visualizó en un microscopio Carl Zeiss adaptado con una cámara digital (Leica DMLS). El número de células inmunopositivas en el epitelio y en el estroma se determinó utilizando una retícula micrométrica (Carl Zeiss) con el objetivo de 40X, teniendo un aumento total de 400X. La intensidad de la inmunodetección se cuantificó y clasificó por grados de intensidad como se describe más adelante.

4. Cuantificación celular

La totalidad de las células inmunopositivas a Sox2 presentes en el epitelio, estroma y músculo liso del útero, para lo cual se realizó la cuantificación en un total de 50 campos microscópicos (de 40 000 μm^2 cada uno), lo que representa un área total de 2mm². Se analizaron todos los núcleos de cada sección. Se determinó la intensidad de la marca de los núcleos asignando los siguientes valores: 0, ausente; 1, ligera; 2, moderada y 3, intensa. Se calculó el puntaje histológico (HSCORE) de la siguiente manera: $\text{HSCORE} = \sum P_i (i + 1)$, donde $i = 1, 2$ o 3 , P_i corresponde al

porcentaje de cada intensidad, determinado en el rango de 0 a 100% (Lessey et al., 1988).

5. Análisis histomorfológicos

a) Localización histológica de células inmunopositivas en el útero:

Se determinó inicialmente el porcentaje de células inmunopositivas presentes en el endometrio y miometrio.

Posteriormente se determinó la localización de las células inmunopositivas dentro del endometrio en tres regiones de la lámina propia: superficial, intermedia y profunda; estas regiones se determinaron dividiendo en tercios proporcionales la longitud existente desde el límite inferior del epitelio de revestimiento superficial hasta el inicio del miometrio.

b) Presencia de células inmunopositivas a Sox-2 en relación con su proximidad a los vasos sanguíneos de la lámina propia del endometrio

Se determinó la presencia de células inmunopositivas a Sox-2 en relación con su proximidad a los vasos sanguíneos de la lámina propia del endometrio para lo cual se tomó el siguiente criterio: se consideró una ubicación cercana si la distancia entre el vaso sanguíneo y la célula inmunopositiva era igual o menor a 40 μm y lejana si esta distancia era mayor a 40 μm .

c) Morfología general de las células inmunopositivas

Se determinó el porcentaje de células inmunopositivas de acuerdo a la morfología general de los diferentes grupos, para lo cual se clasificaron en dos tipos: células

redondas y alargadas. Las células redondas fueron aquellas en las que existió una proporción entre ancho y largo (largo no mayor a 2 μm en relación con el ancho) y alargadas aquellas donde claramente predominaba el largo (más de 2 μm de longitud sobre el ancho). Se determinó también el porcentaje de la forma de células inmunopositivas en el cordón umbilical del perro utilizando el mismo criterio que para las células del endometrio.

6. Análisis de los datos

Se realizó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguida de una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas de los datos obtenidos por la cuantificación celular, además se utilizó el Programa Prism 5.02 (Graph Pad, CA, USA) para calcular los valores de probabilidad.

RESULTADOS

Para el procedimiento inmunohistoquímico se seleccionaron solamente aquellos animales que presentaron características ováricas y en el útero compatibles con hembras en anestro (Fig.1 y Fig.2) siguiendo los criterios señalados en la sección de Materiales y Métodos (Criterios de inclusión).

Una vez realizado el procedimiento inmunohistoquímico en el cordón de perro y humano se identificaron células inmunopositivas en el tejido conjuntivo laxo mucoso que se conoce como la Gelatina de Wharton. Las células inmunopositivas mostraron una marca intranuclear (Fig.3 A y B).

En el endometrio de las perras del grupo I y II se observaron células inmunopositivas a Sox-2 con una marca claramente intranuclear en la mayoría de las células y de manera excepcional en el citoplasma (Fig.4 A y B).

Se observaron también células inmunopositivas en el miometrio de las perras adultas como gerontes (Fig. 5 y Fig. 6 A y B).

El número de células inmunopositivas a Sox-2 por campo microscópico fue muy escaso en el endometrio uterino en las hembras adultas que tuvo un promedio de 0.7333 ± 0.05513 y gerontes con un promedio de 0.7500 ± 0.06596 en comparación con el promedio de células inmunopositivas por campo presentes en la Gelatina de Wharton del cordón umbilical del perro del grupo III (tejido testigo) con promedio de 5.920 ± 0.6954 , éste incremento es aproximadamente más de 8 veces la cantidad presente en los dos primeros grupos (Fig. 7).

Cuando se compararon los valores de las medias del HSCORE por la prueba de Tukey y ANOVA, no se observaron diferencias significativas entre los dos grupos experimentales (adultas y gerontes) mientras que en el grupo testigo (cordones umbilicales) se observó un incremento significativo en sus valores ($p < 0.0001$) (Fig. 8).

Las células inmunopositivas a Sox-2 se localizaron en su mayor parte en el endometrio de los animales adultos (89% del total) y gerontes (93% del total), y en el miometrio el porcentaje restante (11% y 7% respectivamente) (Fig. 9A).

En cuanto a la localización histológica de células inmunopositivas a Sox2 en el endometrio: en los animales adultos y gerontes el mayor porcentaje de células inmunopositivas se observó en la región profunda (62% y 57% respectivamente) cercana al miometrio, después siguió la porción intermedia (25% y 29% respectivamente) y el menor porcentaje se observó en la porción superficial (4% y 5% respectivamente) (Fig. 9B)

En relación con la presencia de células inmunopositivas a Sox-2 en relación con su proximidad a los vasos sanguíneos de la lámina propia del endometrio, se observó que el 76% de las células de las hembras adultas se tuvieron ubicación lejana mientras que el 24% ubicación cercana. En las hembras gerontes la ubicación de las células inmunopositivas fue similar (lejanas 70%, cercanas 30%) (Fig.10).

En cuanto a la morfología general de las células inmunopositivas, tanto en los animales adultos como gerontes predominaron las células alargadas (59% y 68% respectivamente) en relación con las células redondas (41% y 32%

respectivamente), estos datos muestran que el porcentaje de células alargadas se incrementó en más del doble en los animales gerontes en relación con los adultos. Cuando se determinó el porcentaje de la forma de células inmunopositivas en el cordón umbilical del perro se observó un 67% de células alargadas y el restante células redondas (Fig.11)

DISCUSIÓN

A) Gelatina de Wharton como control positivo para células que expresan Sox-2.

En las células troncales embrionarias se expresan en altos niveles tres factores de transcripción: Sox-2, Oct- $\frac{3}{4}$ y Nanog (Avilion et al., 2003; Boyer et al., 2005), estos mismos factores fueron identificados en el cordón umbilical de varias especies, entre ellas el cerdo (Carlin et al., 2006). En otros tejidos embrionarios o fetales como la placenta del perro (Saulnier et al., 2016) y el cordón umbilical humano (Beeravolu et al., 2016) se han descrito células que expresan baja ARNm de Sox-2, pero no así OCT4 y Nanog (Carlin et al., 2006), también se obtuvieron tejidos neonatales como el amnios y el conjuntivo del cordón umbilical (llamada gelatina de Wharton) a partir de los cuales se aislaron células troncales mesenquimales (MSC) en las que se evaluaron sus propiedades de diferenciación e inmunomoduladoras, las cuales resultaron ser similares al de las MSC de los animales adultos tomados de la médula ósea (Saulnier et al., 2016) las MSC tienen la capacidad de diferenciarse en los tres linajes mesodérmicos: adipogénico, condrogénico y osteogénico.

Por lo anterior, nosotros utilizamos como un control positivo tejidos con células inmunopositivas a Sox-2, como es el caso del cordón umbilical de humano y de perro, ya que se ha reportado que las células presentes en la gelatina de Wharton expresan marcadores de células troncales embrionarias como son Oct3/4 y Sox-2 (Banitalebi Dehkordi et al., 2016; Higuchi et al., 2015; Lee, 2012). Otros tejidos en los que se ha reportado la presencia de células positivas a Sox-2 en el perro es la placenta (Saulnier et al., 2016) y estructuras que se pueden observar en cultivos

celulares llamadas neuroesferas producidas a partir de células troncales mesenquimales de la médula espinal (Chung et al., 2013). En los estudios inmunohistoquímicos del cordón umbilical las células inmunopositivas a Sox-2 se han observado de manera intranuclear en la mayor parte de los casos (Götte et al., 2011a; Pityński et al., 2015).

De manera interesante, las MSC del cordón mostraron una apariencia fibroblástica en todos los tejidos neonatales (Saulnier et al., 2016), de manera similar a las células Sox-2 positivas que nosotros observamos en cortes de cordón umbilical de perro (Figura 3). En nuestro estudio la localización de las células inmunopositivas a Sox-2 se observó en la gelatina de Wharton del cordón umbilical, tal como se ha descrito previamente por otros autores (Higuchi et al., 2012; Lee, 2012). El tejido conjuntivo mucoso del cordón umbilical (gelatina de Wharton) se ha considerado como una fuente muy importante de células troncales mesenquimales, las cuales se ha demostrado que tienen una gran potencialidad en la medicina regenerativa, por su gran capacidad de diferenciación, su capacidad inmunomoduladora, además de poderse aislar grandes cantidades de ellas en estas células y su fácil obtención (Banitalebi Dehkordi et al., 2016).

Las células que observamos en el cordón mostraron apariencia fibroblastoide o alargada en un 81% del total (figura 3a y 11), lo cual concuerda con otros estudios (Beeravolu et al., 2016) de células troncales del cordón umbilical de humano aisladas que también mostraron morfología fibroblastoide y expresaron CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105, además de la evidencia de diferenciación en linajes múltiples *in vitro*, en estas células se expresaron niveles bajos de genes de

pluripotencia, como son OCT4, NANOG, KLF4, además de Sox2. (Beeravolu et al., 2016).

Como fuente de células troncales, se ha estimado la producción de MSC (Sox-2 positivas) en el cordón umbilical de humanos en 6 a 10 millones de células después de 8 a 10 días en el cultivo primario, después de su identificación y aislamiento, y de 1×10^8 en 28 a 30 días (Banitalebi Dehkordi et al., 2016). Esta gran capacidad de obtención de células inmunopositivas concuerda con la mayor densidad celular que observamos en los cortes de cordón umbilical de humanos y del perro (figuras 3a y 11). En la médula ósea las células troncales mesenquimales constituyen el 0.0001-0.01% del total de células, por lo que el cordón umbilical y particularmente la gelatina de Wharton resulta ser una fuente rica en células troncales, en comparación con otras como lo es la médula ósea, además de que su obtención después del parto es sencilla y no implica mayor invasividad como en el caso de la médula ósea. Sin embargo, tiene el inconveniente de que no puede obtenerse en cualquier momento de la vida del paciente.

B) Cuantificación de células positivas a Sox-2 en el útero

En el útero de las perras el promedio del número de células inmunopositivas en Sox-2 fue muy escaso tanto en las hembras adultas (0.7333 ± 0.055) como gerontes (0.7500 ± 0.065) en comparación con las células que cuantificamos en el cordón umbilical de la perra (5.920 ± 0.69), es decir aproximadamente 8 veces más que en el útero (Figuras 3a, 4a y 7). En otros tejidos como el colon de humano se han identificado células en escaso número (0.01%), mientras que en la epidermis, próstata y glándula mamaria llega hasta el 5% aproximadamente (Chan et al., 2004).

En general las células que poseen características indiferenciadas son reguladas de manera estricta, ya que un incremento desordenado de estas podría originar serios problemas en la homeostasis tisular, como es el caso de tumores, como se menciona más adelante.

Si comparamos las cuantificaciones de células de ambos grupos (adultas y gerontes) observamos que no existieron diferencias significativas entre ellas (Figura 7), lo cual implica que a pesar de la edad de las perras gerontes el número promedio de células positivas a Sox-2 permanece sin cambios; sin embargo se sabe que los procesos de regeneración tisular disminuyen con la edad del animal, y que el útero no conserva su misma capacidad funcional y de regeneración en individuos seniles en comparación con los animales más jóvenes. Existen algunas evidencias que indican que a pesar de contar con un número de células indiferenciadas la capacidad de diferenciación celular va disminuyendo conforme se incrementa la edad del animal, ya que el nicho parece modificarse (envejecer) de acuerdo a la edad y hace que el proceso de regeneración sea menos efectivo (Carlson and Conboy, 2007)

C) Características morfológicas de las células inmunopositivas a Sox-2

Sox-2 es un factor de transcripción específico que regula la determinación, diferenciación y proliferación de células troncales tanto del embrión como del adulto. Sox-2 se acumula en el citoplasma de los ovocitos en crecimiento y persiste en todas las células al menos hasta la fase de blastocisto, cuando se exporta desde los núcleos al citoplasma de las células del trofoblasto (Avilion et al., 2003). Se ha descrito la presencia de células que expresan Sox-2 en células de la retina del pollo

durante los primeros días del desarrollo embrionario (Le Rouédec et al., 2002) además de otros tejidos embrionarios. En organismos adultos también se han identificado en poblaciones de células troncales/precursoras dentro del SNC, el papel que juegan estas diferencias aún no se conoce (Avilion et al., 2003).

Se ha observado que la proteína Sox-2 se puede transportar entre el citoplasma y el núcleo de células del ratón durante la embriogénesis temprana. (Sarkar and Hochedlinger, 2013), mientras que la marca en las células del trofoblasto es exclusivamente citoplasmática. En el endometrio de la mujer, estudios con microscopía de inmunofluorescencia reveló la presencia de marca inmunopositiva tanto en el núcleo (coloración perinuclear), como también en el citoplasma de células de la lámina propia que colocalizaba con la marca para la telomerasa. (Götte et al., 2011a). En nuestro estudio observamos la presencia de la marca inmunopositiva a Sox-2 de manera intranuclear prácticamente en todas las células analizadas y sólo de manera excepcional en el citoplasma, esto concuerda con el hecho de que Sox-2 es un factor de transcripción de una gran cantidad de genes (1279 genes) que la célula requiere para mantener su pluripotencia. Los factores de transcripción son proteínas intranucleares que interactúan directamente con el DNA para poder realizar su función. La marca citoplasmática observada de manera ocasional puede deberse al hecho de que todas las proteínas de uso intracelular son sintetizadas en el citoplasma (en particular en los polisomas), incluso las que cumplen funciones en el núcleo (como son los factores de transcripción) y posteriormente serán importadas por este (Alberts et al., 2013).

Además de la localización intracelular funcional de Sox-2 (núcleo o citoplasma) recientemente se ha encontrado una señal de exportación nuclear dentro del HMG box de varias proteínas de la familia SOX, por ejemplo, SOX10 que requiere activamente el desplazamiento núcleo-citoplásmico para la transactivación de genes diana *in vitro*, mientras que la inversión del sexo puede inducirse en gónadas XX cultivadas utilizando un inhibidor que da como resultado el secuestro nuclear de SOX9. En el caso particular de Sox-2 contiene una señal de exportación putativa similar, aunque se requiere de más experimentos para dilucidar su función. (Sarkar and Hochedlinger, 2013).

La inmunotinción con Oct3/4 y Sox2 en MSCs. tanto en células troncales de médula ósea (BM) como en tejido adiposo (AT-MS), Oct3/4 se detectó en la fracción nuclear, mientras que Sox2 se detectó en la fracción citoplasmática en caninos. Se sabe que varios factores de transcripción están localizados en la fracción citoplásmica, como las familias Tead y FOXO. Estos estudios mostraron actividad inhibitoria de los factores de transcripción. Por lo tanto, es posible que inactiven Sox2. Además, Sox2 se localizó en el núcleo en ESC caninos. Existen muchas diferencias funcionales entre los ESC y los MSC. Por ejemplo, los ESC forman teratomas en los testículos, pero los MSC no. Por lo tanto, se ha sugerido que la localización restringida de la proteína Sox2 puede conducir a la falta de proliferación de MSC *in vivo*, así como el mantenimiento de la pluripotencia de MSC *in vitro*. (Takemitsu et al., 2012).

D) Células inmunopositivas a Sox-2 como candidatas para MSC en el endometrio de la perra

Las EnSCs son MSCs capaces de propiedades de diferenciación de linajes mesodérmicos, endodérmicos y ectodérmicos tales como hepatocitos, células neurales, osteoblastos, músculo liso, cartílago, músculos cardíacos, adipocitos, megacariocitos y tejidos pancreáticos que proporcionan el potencial para su aplicación clínica. (Ghobadi et al., 2015).

La detección de SOX2 está de acuerdo con la expresión endometrial de factores de transcripción asociados a la pluripotencia, tales como OCT4 y NANOG, sugiriendo posiblemente la existencia de diferentes células troncales endometriales caracterizadas por marcadores de células troncales de adultos (CD146, MSI1, NOTCH1) o mediante una forma embrionaria similar a células troncales (SOX2, OCT4, NANOG), respectivamente. (Schüring et al., 2011).

Se investigaron los efectos del cultivo de baja densidad comparado con el cultivo de alta densidad en MSCs de médula ósea (BM) y marcadores de pluripotencia de multipotencialidad. La supresión de Sox2 inhibió de manera significativa la multipotencialidad celular, así como su proliferación (Yoon et al., 2011).

Además, las células de animales knock-out a Sox2 no podían formar colonias, y su crecimiento poblacional fue detenido con un fenotipo senescente. En otro estudio, la mayoría de las MSC sobreexpresaron Sox2 eran pequeñas y presentaban altas capacidades proliferativas y osteogénicas de MSC humanas derivadas de la médula ósea (BM). Dichos resultados sugieren que Sox2 es un esencial para la proliferación y diferenciación osteogénica de MSC y sin que pierdan su función de células troncales. (Yoon et al., 2011).

Las células troncales derivadas de biopsias endometriales presentaban propiedades tales como clonogenicidad, capacidad de cultivo a largo plazo, potencial de diferenciación multilinaje, expresión de CD146, CD90, CD73, CD105, MS11, NOTCH1 y SOX2; Y la falta de expresión de CD34 y CD14. Las EnSCs son MSCs capaces de diferenciarse linajes endodérmicos, mesodérmicos y ectodérmicos tales como hepatocitos, células neurales, osteoblastos, músculo liso, cartílago, músculos cardíacos, adipocitos, megacariocitos y tejidos pancreáticos que proporcionan el potencial para su aplicación clínica (Ghobadi et al., 2015).

En el caso de la mujer es probable que las células progenitoras endometriales se encuentren en el estrato basal. Sin embargo, es perfectamente posible que también estén presentes en el funcional. Las células ABCG2+ humanas se pueden encontrar en el endotelio tanto de las capas funcionales como basales del endometrio. Además, se ha demostrado que la regeneración epitelial de la superficie endometrial se logra a través de la diferenciación celular de las células del estroma y no la proliferación de las glándulas epiteliales basales, por lo que es posible que las células hijas de las células troncales endometriales sufran transición mesenquimal a epitelial y por lo tanto contribuyen a la regeneración endometrial durante el ciclo menstrual humano. (Maruyama, 2014).

Células Sox-2 positivas son más numerosas de manera significativa en muestras de endometrios de mujeres en fase proliferativa en comparación con una fase secretora y menos frecuentes en un endometrio en fase secretora en comparación a un tejido endometrial. (Götte et al., 2011), lo cual aparentemente indicaría que en la mujer pueda existir un posible control a partir de hormonas esteroides de origen

ovárico, sin embargo, en nuestro estudio dichas influencias trataron de minimizarse al utilizar animales en anestro. Se desconoce si puedan existir variaciones cíclicas de estas células a lo largo del ciclo estral de la perra.

Se ha informado (Cabezas et al., 2014) la existencia de células troncales/progenitoras mesenquimales en el endometrio de la vaca en diversas etapas del ciclo estral que expresan marcadores genéticos embrionarios como son Oct3/4 y Sox-2, además de otros marcadores mesenquimales (STAT, CD44 y c-kit), además se determinó la presencia de las proteínas codificadas Oct3/4, CD44 y Sox-2. De manera similar, en nuestro estudio nosotros demostramos por primera vez (hasta donde tenemos conocimiento, con base a la literatura consultada) la presencia de células que expresan la proteína Sox-2 en perras adultas y gerontes. Otros autores han identificado transcritos de Oct3/4 pero no Sox-2 en el endometrio de humanos (Matthai et al., 2006; Miernik and Karasinski, 2012; Ono et al., 2007) y en endometrio y tubas uterinas (oviductos) del ratón (Y. Wang et al., 2012). En el estudio de Cabezas se identificó por inmunohistoquímica las células positivas a Sox-2 en el epitelio glandular y en el conjuntivo de la lámina propia; mientras que en nuestro estudio nosotros únicamente localizamos las células en el conjuntivo y en el miometrio, no en las células epiteliales ni de revestimiento, ni glandular, la razón de esta discrepancia no se conoce, sin embargo además de las diferencias propias de especie y las edades de los animales del estudio de Cabezas y col. (2014) y el nuestro, las perras que analizamos eran animales en anestro, mientras que las vacas estudiadas por Cabezas et al. (2014) eran animales en dos etapas del ciclo

estral bien definidas: fase lútea temprana (día1 al 5 post-ovulación) y fase lútea tardía (entre el día 13 y 18 del ciclo) (Cabezas et al., 2014).

En estudios previos, las células SOX-2 positivas se encontraron con frecuencia en una localización descrita como perivascular, aunque en cantidades menores comparadas con los marcadores de células troncales adultas CD145, STRO1 y CD90 que muestran un patrón de tinción perivascular más extendido. Estos hallazgos coinciden con la identificación de células troncales derivadas de médula ósea y el concepto de metástasis linfovascular como vía patogénica para la endometriosis (Götte et al., 2011). En nuestro estudio observamos que la ubicación de la mayoría de las células Sox-2 positivas no fue perivascular, pues se localizaron a una distancia mayor de 40 μm de diámetro en los dos grupos estudiados (figura 10). El significado funcional de esta localización preferencial no perivascular en la perra en comparación con otras especies, está aún por ser aclarado.

E) Células positivas a Sox-2 y cáncer

Las células troncales se han involucrado en el desarrollo del cáncer debido a que presentan varios atributos comunes a las células cancerosas como son el estado indiferenciado y la expresión de la telomerasa. A pesar de que las células troncales hematopoyéticas (además de otros tipos de células troncales) producen telomerasa, se ha demostrado que los telómeros de las células troncales se acortan progresivamente durante el envejecimiento y a continuación en estrés de las células hematopoyéticas, especialmente después del trasplante de éstas células (Zant and Liang, 2003). Esta paradoja entre la expresión de la telomerasa en las células troncales y el acortamiento de los telómeros durante el estrés hematopoyético, es

muy probable que se deba a la expresión en cantidades insuficiente de la telomerasa para prevenir el acortamiento del telómero, pero quizás lo suficiente para retrasarla. La importancia de los telómeros, la telomerasa y la estabilidad cromosómica en la tumorigénesis sugiere que tal enlace se encontrará. La conversión neoplásica de células a un fenotipo cancerígeno (oncogénesis o carcinogénesis) implica a menudo el descarrilamiento y la subordinación de un mecanismo de control normal (Zant and Liang, 2003).

Se ha demostrado que SOX2 funciona como un oncogén en las células de cáncer de ovario epitelial con diversas características incluyendo la formación de esferoides, la proliferación celular, la migración celular, la resistencia a los medicamentos, y el potencial tumorigénico. El bloqueo de la función SOX2 en el cáncer de ovario puede considerarse una base para desarrollar nuevas y eficaces estrategias terapéuticas dirigidas a CSCs (células troncales de cáncer) (Wen et al., 2017).

Se ha observado la coexpresión de Sox-2 y Oct 4 en tumores sólidos y en algunos casos se ha demostrado la correlación en la sobreexpresión de ambos en el cáncer escamoso de esófago (Wang et al., 2009); en el caso del carcinoma escamoso cervical la sobreexpresión de Sox-2 pero no Oct3/4 se ha correlacionado positivamente con el grado de avance del tumor (Ji et al., 2014). Por lo que la expresión de Sox-2 puede ser considerado un marcador del comportamiento de ciertos tumores.

Durante mucho tiempo, el perro ha servido como un modelo valioso para las enfermedades humanas; Por lo tanto, aproximadamente 58% de las enfermedades

genéticas de los perros se asemejan a trastornos humanos específicos causados por mutaciones en el mismo gen (Luo et al., 2011) y - más prácticamente - la longevidad de los perros es considerablemente más larga que la de los roedores, Por esta razón los modelos de perros proporcionan ventajas en estudios a largo plazo en los procesos de la enfermedad y en la terapéutica utilizada en comparación con los modelos de roedores (Gonçalves et al., 2012; Whitworth et al., 2012). Tal es el caso de las afecciones tumorales o cancerígenas del útero.

F) Perspectivas del estudio de células Sox-2+ en el útero

a) Muchas alteraciones reproductivas están asociadas con una proliferación endometrial anormal, por lo que se ha propuesto que las células troncales endometriales podrían desempeñar un papel importante en la fisiopatología de enfermedades como la endometriosis en humanos, la adenomiosis, problemas de infertilidad por hipoplasia o atrofia endometrial (Deane et al., 2013), y probablemente en algunas enfermedades de importancia en la Medicina Veterinaria, como la hiperplasia endometrial quística en perras, la endometriosis equina y el cáncer endometrial.

b) En el caso de que las células troncales endometriales sean las responsables de la regeneración endometrial durante cada ciclo estral, entonces su disminución en número o en su función podría resultar en un endometrio delgado e incapaz de soportar la implantación embrionaria (Gargett y Healy, 2011) como ocurre en las mujeres que se encuentran en la menopausia. Sin embargo, se ha reportado que si estas mujeres son sometidas a una terapia hormonal, las células del epitelio, estroma y los vasos capilares del endometrio proliferan y se diferencian (Ettinger et

al., 1997). Incluso se ha demostrado que es posible que la regeneración resulte en la formación de una gruesa capa de endometrio capaz de soportar la gestación aún en mujeres mayores de sesenta años que lograron tener hijos por medio de la técnica de fecundación *in vitro* (Paulson et al., 2002).

c) El endometrio en edad reproductiva es un tejido muy dinámico y con enorme capacidad de renovarse, como sucede en cada ciclo menstrual de la mujer, esta capacidad es atribuible a la presencia de células progenitoras y/o troncales, estas células han podido aislarse y cultivarse *in vitro*, una vez aisladas se han podido diferenciar en diversos linajes celulares provenientes de las tres hojas blastodérmicas como son: endodermo, células β de los islotes pancreáticos (Santamaria et al., 2011), mesodermo, células musculares lisas, adipocitos, condrocitos, osteoblastos (Gargett et al., 2009) y megacariocitos (J. Wang et al., 2012) y finalmente del ectodermo, neuronas (Wolff et al., 2011). Esta plasticidad o versatilidad mostrada *in vitro* por las células progenitoras/troncales endometriales tiene gran relevancia en la medicina regenerativa, pues plantea la posibilidad de obtener todos estos tipos celulares de manera personalizada, del mismo paciente, sin los riesgos inherentes al rechazo inmunológico, y en grandes cantidades, como es el caso de ciertas afecciones sanguíneas en las que se requieren muchos donadores de plaquetas, si estas células pueden diferenciarse en megacariocitos, sus células precursoras, no habrá necesidad de acudir a estas donaciones (J. Wang et al., 2012). De manera similar podrían tratarse (teóricamente) la diabetes (Santamaria et al., 2011) y la enfermedad de Parkinson (Wolff et al., 2011).

d) En humanos, se ha explorado la posibilidad de utilizar a las células troncales endometriales como tratamiento en el síndrome de Asherman, el cual es caracterizado por una atrofia uterina debida a un traumatismo y la generación de adherencias en el mismo, lo que provoca infertilidad (Deane et al., 2013). En equinos la endometriosis es una enfermedad crónica degenerativa que causa infertilidad en yeguas debido a fibrosis endometrial y alteraciones en las glándulas del útero (Christine Hoffmann et al., 2009). Actualmente no existen tratamientos efectivos para esta enfermedad, aunque se ha probado que la administración de células troncales de tejido adiposo ha logrado evitar la progresión de la enfermedad (Mambelli et al., 2013). Por lo que el tratamiento de este trastorno con células troncales endometriales propias del animal o alogénicas podría generar mejores resultados.

e) En la mujer la endometriosis es un padecimiento crónico que se caracteriza por la presencia de glándulas y de estroma endometriales fuera de la cavidad uterina (Seli et al., 2014). Se ha hipotetizado que las células troncales endometriales podrían desempeñar un papel clave en la fisiopatología de este padecimiento (Deane et al., 2013).

La expresión ectópica aberrante de células troncales pueden contribuir a diferentes patologías a través de metástasis linfovascular, porque su alto potencial proliferativo promueve su rápida expansión clonal; el origen monoclonal de algunas lesiones en el endometrio, se ha corroborado porque tienen propiedades de cultivo a largo plazo de clones de células establecidos en las lesiones del endometrio, y el aislamiento de células progenitoras con alto potencial proliferativo de la sangre menstrual

apoyan la hipótesis de que las células troncales tienen una participación muy relevante en la en la endometriosis (Götte et al., 2011), por ejemplo.

f) El complejo hiperplasia endometrial quística/piometra es un trastorno polisistémico que puede ser de curso agudo o crónico que se presenta en perras adultas y se caracteriza por una hiperplasia del endometrio asociada a una alta producción de progesterona y estrógenos y que generalmente se complica con una infección ascendente (Arora et al., 2006). La patogenia de este complejo podría estar relacionada con la interacción estrógenos-células troncales endometriales. Esta interacción se ha observado en ratonas, donde se ha sugerido la presencia de células troncales endometriales (Gargett y Chan, 2006) y donde se han realizado estudios, retirando quirúrgicamente los ovarios, produciendo una atrofia endometrial en un plazo de 10 a 14 días (Chan et al., 2012) y luego induciendo una importante regeneración del mismo por medio de la administración de estrógenos exógenos (Finn and Martin, 1976; Gargett and Chan, 2006; Gargett et al., 2016). Aunque no existen reportes de la existencia de células troncales endometriales en perras, es una hipótesis interesante que debería estudiarse.

g) En el caso de las afecciones cardiacas las células troncales endometriales muestran una mayor capacidad de migración celular, la formación de nuevos vasos sanguíneos, se demostró que tienen el potencial de ser reactivos clínicos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, los mecanismos inmunosupresores por el cual EnSCs reducen la neuroinflamación, la capacidad de EnSCs para diferenciarse en neuronas productoras de dopamina, la diferenciación de estas células en neuronas colinérgicas eficientes, se demostró que las EnSCs proporcionan un

beneficio terapéutico en el modelo de primates de la enfermedad de Parkinson. (Ghobadi et al., 2015).

Una ventaja de las CTPE es la facilidad para obtenerlas mediante la OSH en perras y la cantidad de muestra que podemos colectar (todo el órgano). Otra ventaja es su efecto inmunomodulador que facilita su uso clínico de manera alogénica en la medicina regenerativa.

Se ha reportado que las CTPE pueden diferenciarse *in vitro*, además de en los linajes mesodérmicos comunes, en músculo cardíaco y esquelético, en células provenientes de otras hojas blastodérmicas, tal es el caso de linajes endodérmicos como células pancreáticas productoras de insulina, epitelio urinario y en linajes ectodérmicos como neurilemocitos y neuronas dopaminérgicas, por lo que podrían ser utilizadas para tratar enfermedades como afecciones cardíacas, degeneración muscular, diabetes tipo 1 y enfermedades neurodegenerativas.

Además del alcance reproductivo, las MSC endometriales podrían usarse en otros campos de la medicina veterinaria para el tratamiento de un gran número de enfermedades, tales como (a) enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y diabetes tipo 1), (b) afecciones cardíacas (por ejemplo, insuficiencia cardíaca), (c) lesiones del aparato musculoesquelético (por ejemplo, degeneración muscular), alteraciones del cartílago articular, que son particularmente importantes en la osteoartritis equina, y displasia de cadera en perros, (d) enfermedades del tracto urinario (por ejemplo, insuficiencia renal), (e) procesos neurodegenerativos y lesiones de la médula espinal, (f) tratamiento tumoral mediante inhibición del crecimiento y la reducción del tamaño del tumor, (g)

el desarrollo de fármacos para el estudio de la toxicidad de los medicamentos o la eficacia *in vitro* de los mismos, y finalmente (h) la generación de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas y enfermedades de origen veterinario de interés. Además, las MSC endometriales pueden convertirse en una herramienta importante para la ingeniería de tejidos y medicina veterinaria regenerativa (Serrato López et al., 2017).

A pesar de que el endometrio parece ser una fuente buena y prometedora para las células troncales/progenitoras, antes de empezar a pensar en sus posibles aplicaciones clínicas -para las que todavía hay que realizar mucha investigación básica previa-, se deben realizar varios ensayos para comparar los aspectos biológicos y fisiológicos de estas células con otras fuentes de MSC, específicamente con médula ósea.

CONCLUSIONES

En este trabajo se describe por primera vez (hasta donde tenemos noticia con base en la literatura consultada) la presencia de células inmunopositivas a Sox-2 en la lámina propia y el miometrio del útero de perras en anestro adultas y gerontes.

La cantidad de células que expresan Sox-2 en ambas regiones histológicas (lámina propia y miometrio) permanece constante, aunque muy escaso (0.14% en adultas y 0.15% en gerontes), en ambos rangos de edad estudiados, lo que indica que la edad aparentemente no es un factor que influya en la disminución de estas células.

No se observaron células inmunopositivas a Sox-2 en el epitelio de revestimiento ni en el glandular, que es una característica prevaleciente en las células troncales/progenitoras mesenquimales descritas en otras especies.

La mayor parte de las células se observaron en la lámina propia en relación con el miometrio de ambos grupos.

La localización de las células dentro de la lámina propia de ambos grupos, fue en su mayor parte profunda, lo que sugiere que el nicho de estas células se localiza en esta región histológica del endometrio que corresponde al sitio donde se han descrito células troncales/progenitoras mesenquimales endometriales en otras especies.

La mayoría de las células positivas a Sox-2 se ubicaron lejanas (más de 40 μm) a los vasos sanguíneos lo cual no concuerda con la ubicación establecida para el nicho de las células troncales/progenitoras mesenquimales endometriales presentes en otras especies, incluyendo el humano cuya localización es

perivasculares, esta podría tener implicaciones funcionales o posibles características específicas del nicho de la perra en relación con otras especies.

La morfología predominante de las células Sox-2 positivas es alargada o fibroblastoide y en menor proporción con morfología redondeada, lo que coincide con la morfología observada en las CTPE del útero de otras especies. Sin embargo, cabe señalar que el número de células alargadas/fibroblastoides de los animales gerontes se incrementó casi al doble, se desconoce si estas modificaciones morfológicas pudieran conllevar también modificaciones fisiológicas.

La mayor parte de las células inmunopositivas a Sox-2 mostraron una marca intranuclear, lo cual coincide con el hecho de que la función principal de Sox-2 es actuar como un factor de transcripción que contribuye a mantener la pluripotencia de las células que lo expresan, sin embargo, una pequeña proporción de células mostraron marca citoplasmática, que indicaría quizás el momento de la síntesis de la proteína.

De acuerdo con nuestros resultados globales, las células inmunopositivas a Sox-2 del útero de la perra en función de las características histomorfológicas estudiadas, pueden considerarse como posibles candidatos a células troncales/progenitoras mesenquimales del útero de la perra.

El útero puede ser una fuente factible de obtención de células Sox-2 positivas con posibles características pluripotentes y de células troncales/progenitoras mesenquimales, ya que la OSH es una cirugía común en perras (y muchas ocasiones el órgano es desechado); la obtención de estas células podría tener en

un futuro múltiples aplicaciones clínicas en la Ingeniería Tisular y en Medicina Veterinaria Regenerativa de pequeñas especies.

REFERENCIAS

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., D Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2013. *Essential cell biology*, 4th ed.
- Arora, N., Sandford, J., Browning, G.F., Sandy, J.R., Wright, P.J., 2006. A model for cystic endometrial hyperplasia/pyometra complex in the bitch. *Theriogenology* 66, 1530–1536. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.019>
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R., 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Banitalebi Dehkordi, M., Madjd, Z., Chaleshtori, M.H., Meshkani, R., Nikfarjam, L., Kajbafzadeh, A.-M., 2016. A Simple, Rapid, and Efficient Method for Isolating Mesenchymal Stem Cells From the Entire Umbilical Cord. *Cell Transplant.* 25, 1287–1297. <https://doi.org/10.3727/096368915X688911>
- Banks, W., Martínez Haro, A., Salido Rangel, F., Lemus Gamboa, A., 1996. *Histología veterinaria aplicada*, 2a Edición. ed. Manual Moderno, Madrid.
- Beeravolu, N., Khan, I., McKee, C., Dinda, S., Thibodeau, B., Wilson, G., Perez-Cruet, M., Bahado-Singh, R., Chaudhry, G.R., 2016. Isolation and comparative analysis of potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Res.* 16, 696–711. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.04.010>
- Bockeria, L., Bogin, V., Bockeria, O., Le, T., Alekyan, B., Woods, E.J., Brown, A.A., Ichim, T.E., Patel, A.N., 2013. Endometrial regenerative cells for treatment of heart failure: a new stem cell enters the clinic. *J. Transl. Med.* 11, 56. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-56>
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Cabezas, J., Lara, E., Pacha, P., Rojas, D., Veraguas, D., Saravia, F., Rodríguez-Alvarez, L., Castro, F., 2014. The Endometrium of Cycling Cows Contains Populations of Putative Mesenchymal Progenitor Cells. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 550–559. <https://doi.org/10.1111/rda.12309>
- Carlin, R., Davis, D., Weiss, M., Schultz, B., Troyer, D., 2006. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 4, 8. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-8>
- Carlson, M.E., Conboy, I.M., 2007. Loss of stem cell regenerative capacity within aged niches. *Aging Cell* 6, 371–382. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00286.x>
- Cervelló, I., Martínez-Conejero, J.A., Horcajadas, J.A., Pellicer, A., Simón, C., 2007. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 22, 45–51. <https://doi.org/10.1093/humrep/del332>
- Chan, R.W.S., Kaitu'u-Lino, T. 'uhevaha, Gargett, C.E., 2012. Role of label-retaining cells in estrogen-induced endometrial regeneration. *Reprod. Sci. Thousand Oaks Calif* 19, 102–114. <https://doi.org/10.1177/1933719111414207>
- Chan, R.W.S., Schwab, K.E., Gargett, C.E., 2004. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells. *Biol. Reprod.* 70, 1738–1750. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024109>
- Chaparro, O., Beltrán, O., 2009. NUCLEAR REPROGRAMMING AND INDUCED PLURIPOTENT CELLS. *Rev. Med* 17, 252–263.

- Chen, Y.-J., Liou, Y.-J., Chang, C.-M., Li, H.-Y., Chen, C.-Y., Twu, N.-F., Yen, M.-S., Chang, Y.-L., Peng, C.-H., Chiou, S.-H., Chen, C.-P., Chao, K.-C., 2012. Reprogramming human endometrial fibroblast into induced pluripotent stem cells. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 51, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.01.008>
- Chung, C., Pruitt, B.L., Heilshorn, S.C., 2013. Spontaneous cardiomyocyte differentiation of mouse embryoid bodies regulated by hydrogel crosslink density. *Biomater. Sci.* 1, 1082–1090. <https://doi.org/10.1039/C3BM60139K>
- Deane, J.A., Gualano, R.C., Gargett, C.E., 2013. Regenerating endometrium from stem/progenitor cells: Is it abnormal in endometriosis, Asherman's syndrome and infertility? (PDF Download Available) [WWW Document]. ResearchGate. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/GCO.0b013e32836024e7>
- Donofrio, G., Franceschi, V., Capocéfalo, A., Cavirani, S., Sheldon, I.M., 2008. Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 6, 65. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-6-65>
- Eckfeldt, C.E., Mendenhall, E.M., Verfaillie, C.M., 2005. The molecular repertoire of the “almighty” stem cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 726–737. <https://doi.org/10.1038/nrm1713>
- Ettinger, B., Bainton, L., Upmalis, D.H., Citron, J.T., VanGessel, A., 1997. Comparison of endometrial growth produced by unopposed conjugated estrogens or by micronized estradiol in postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 176, 112–117. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(97\)80022-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(97)80022-1)
- Finn, C.A., Martin, L., 1976. Hormonal Control of the Secretion of the Endometrial Glands in the Mouse. *J. Endocrinol.* 71, 273–274. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0710273>
- García del Moral, R., 1993. *Manual de laboratorio de anatomía patológica*. McGraw-Hill/Interamericana, España.
- Gargett, B.E., Chan, R.W.S., 2006. Endometrial stem/progenitor cells and proliferative disorders of the endometrium. *Minerva Ginecol.* 58, 511–526.
- Gargett, C.E., 2007. Uterine stem cells: What is the evidence? *Hum. Reprod. Update* 13, 87–101. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml045>
- Gargett, C.E., 2004. Stem cells in gynaecology. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* 44, 380–386. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2004.00290.x>
- Gargett, C.E., Healy, D.L., 2011. Generating receptive endometrium in Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci.*
- Gargett, C.E., Masuda, H., 2010. Adult stem cells in the endometrium. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* 16, 818–834. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq061>
- Gargett, C.E., Schwab, K.E., Deane, J.A., 2016. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years. *Hum. Reprod. Update* 22, 137–163. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv051>
- Gargett, C.E., Schwab, K.E., Zillwood, R.M., Nguyen, H.P.T., Wu, D., 2009. Isolation and Culture of Epithelial Progenitors and Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium. *Biol. Reprod.* 80, 1136–1145. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075226>
- Ghobadi, F., Mehrabani, D., Mehrabani, G., 2015. Regenerative Potential of Endometrial Stem Cells: A Mini Review. *World J. Plast. Surg.* 4, 3–8.
- Go, M.J., Takenaka, C., Ohgushi, H., 2008. Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp. Cell Res.* 314, 1147–1154. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.11.021>
- Gonçalves, N.J.N., Bressan, F.F., Souza, A., Martins, D.S., Miglino, M.A., Meirelles, F.V., Perecin, F., Ambrósio, C.E., 2012. Canine fibroblasts expressing human transcription factors: what is in the route for the production of canine induced

- pluripotent stem cells. *Reprod. Domest. Anim. Zuchthyg.* 47 Suppl 6, 84–87. <https://doi.org/10.1111/rda.12002>
- Götte, M., Wolf, M., Staebler, A., Buchweitz, O., Kiesel, L., Schüring, A.N., 2011a. Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis. *Fertil. Steril.* 95, 338–341. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.006>
- Götte, M., Wolf, M., Staebler, A., Buchweitz, O., Kiesel, L., Schüring, A.N., 2011b. Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis. *Fertil. Steril.* 95, 338–341. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.006>
- Goulding, H., Pinder, S., Cannon, P., Pearson, D., Nicholson, R., Snead, D., Bell, J., Elston, C.W., Robertson, J.F., Blamey, R.W., 1995. A new immunohistochemical antibody for the assessment of estrogen receptor status on routine formalin-fixed tissue samples. *Hum. Pathol.* 26, 291–294.
- Higuchi, A., Wang, C.-T., Ling, Q.-D., Lee, H.H., Kumar, S.S., Chang, Y., Alarfaj, A.A., Munusamy, M.A., Hsu, S.-T., Wu, G.-J., Umezawa, A., 2015. A hybrid-membrane migration method to isolate high-purity adipose-derived stem cells from fat tissues. *Sci. Rep.* 5. <https://doi.org/10.1038/srep10217>
- Higuchi, O., Okabe, M., Yoshida, T., Fathy, M., Saito, S., Miyawaki, T., Nikaido, T., 2012. Stemness of Human Wharton's Jelly Mesenchymal Cells Is Maintained by Floating Cultivation. *Cell. Reprogramming* 14, 448–455. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0020>
- Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., Schoon, H.-A., 2009. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. *Theriogenology* 71, 264–274. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.008>
- Hoffmann, Christine, Ellenberger, C., Mattos, R.C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., Schoon, H.-A., 2009. The equine endometrosis: New insights into the pathogenesis. *Anim. Reprod. Sci.* 111, 261–278. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.03.019>
- Hosseinkhani, M., Mehrabani, D., Karimfar, M.H., Bakhtiyari, S., Manafi, A., Shirazi, R., 2014. Tissue Engineered Scaffolds in Regenerative Medicine. *World J. Plast. Surg.* 3, 3–7.
- Ji, J., Wei, X., Wang, Y., 2014. Embryonic stem cell markers Sox-2 and OCT4 expression and their correlation with WNT signal pathway in cervical squamous cell carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 2470–2476.
- Kocaefe, Ç., Balcı, D., Hayta, B.B., Can, A., 2010. Reprogramming of Human Umbilical Cord Stromal Mesenchymal Stem Cells for Myogenic Differentiation and Muscle Repair. *Stem Cell Rev. Rep.* 6, 512–522. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9177-7>
- Le Rouëdec, D., Rayner, K., Rex, M., Wigmore, P.M., Scotting, P.J., 2002. The transcription factor cSox2 and Neuropeptide Y define a novel subgroup of amacrine cells in the retina. *J. Anat.* 200, 51–56. <https://doi.org/10.1046/j.0021-8782.2001.00007.x>
- Lee, T., 2012. Stem cell therapy independent of stemness. *World J. Stem Cells* 4, 120–124. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v4.i12.120>
- Lessey, B.A., Killam, A.P., Metzger, D.A., Haney, A.F., Greene, G.L., McCarty, K.S., 1988. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 334–340. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-2-334>
- Luo, J., Suhr, S.T., Chang, E.A., Wang, K., Ross, P.J., Nelson, L.L., Venta, P.J., Knott, J.G., Cibelli, J.B., 2011. Generation of Leukemia Inhibitory Factor and Basic Fibroblast Growth Factor-Dependent Induced Pluripotent Stem Cells from Canine Adult Somatic Cells. *Stem Cells Dev.* 20, 1669–1678. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0127>

- 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* 79, 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.11.030>
- Maruyama, T., 2014. Endometrial stem/progenitor cells. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40, 2015–2022. <https://doi.org/10.1111/jog.12501>
- Matthai, C., Horvat, R., Noe, M., Nagele, F., Radjabi, A., van Trotsenburg, M., Huber, J., Kolbus, A., 2006. Oct-4 expression in human endometrium. *Mol. Hum. Reprod.* 12, 7–10. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah254>
- Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K.W., Thébaud, B., Riordan, N.H., 2007. Endometrial regenerative cells: A novel stem cell population. *J. Transl. Med.* 5, 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>
- Miernik, K., Karasinski, J., 2012. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reprod. Camb. Engl.* 143, 203–209. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0202>
- Ono, M., Maruyama, T., Masuda, H., Kajitani, T., Nagashima, T., Arase, T., Ito, M., Ohta, K., Uchida, H., Asada, H., Yoshimura, Y., Okano, H., Matsuzaki, Y., 2007. Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 18700–18705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704472104>
- Park, J.H., Daheron, L., Kantarci, S., Lee, B.S., Teixeira, J.M., 2011. Human Endometrial Cells Express Elevated Levels of Pluripotent Factors and Are More Amenable to Reprogramming into Induced Pluripotent Stem Cells. *Endocrinology* 152, 1080–1089. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1072>
- Park, S.B., Seo, K.W., So, A.Y., Seo, M.S., Yu, K.R., Kang, S.K., Kang, K.S., 2012. SOX2 has a crucial role in the lineage determination and proliferation of mesenchymal stem cells through Dickkopf-1 and c-MYC. *Cell Death Differ.* 19, 534–545. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.137>
- Paulson, R.J., Boostanfar, R., Saadat, P., Mor, E., Tourgeman, D.E., Slater, C.C., Francis, M.M., Jain, J.K., 2002. Pregnancy in the sixth decade of life: obstetric outcomes in women of advanced reproductive age. *JAMA* 288, 2320–2323.
- Pelayo, R., Santa-Olalla, J., Velasco, I., 2011. *Células troncales y medicina regenerativa, 1a Edición.* ed. Programa Universitario de investigación en Salud.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 284, 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Pityński, K., Banas, T., Pietrus, M., Milian-Ciesielska, K., Ludwin, A., Okon, K., 2015. SOX-2, but not Oct4, is highly expressed in early-stage endometrial adenocarcinoma and is related to tumour grading. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 8189–8198.
- Rizzino, A., Wuebben, E.L., 2016. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1859, 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.03.006>
- Sajini, A.A., Greder, L.V., Dutton, J.R., Slack, J.M.W., 2012. Loss of Oct4 expression during the development of murine embryoid bodies. *Dev. Biol.* 371, 170. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.08.008>
- Santamaria, X., Massasa, E.E., Feng, Y., Wolff, E., Taylor, H.S., 2011. Derivation of Insulin Producing Cells From Human Endometrial Stromal Stem Cells and Use in the Treatment of Murine Diabetes. *Mol. Ther.* 19, 2065–2071. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.173>

- Sarkar, A., Hochedlinger, K., 2013. The Sox Family of Transcription Factors: Versatile Regulators of Stem and Progenitor Cell Fate. *Cell Stem Cell* 12, 15–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.007>
- Saulnier, N., Loriau, J., Febre, M., Robert, C., Rakic, R., Bonte, T., Buff, S., Maddens, S., 2016. Canine placenta: A promising potential source of highly proliferative and immunomodulatory mesenchymal stromal cells? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 171, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.005>
- Schüring, A.N., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L., Götte, M., 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil. Steril.* 95, 423–426. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.035>
- Schwab, K.E., Chan, R.W.S., Gargett, C.E., 2005. Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 84, 1124–1130. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.056>
- Schwab, K.E., Hutchinson, P., Gargett, C.E., 2008. Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum. Reprod.* 23, 934–943. <https://doi.org/10.1093/humrep/den051>
- Seli, E., Babayev, E., Collins, S.C., Nemeth, G., Horvath, T.L., 2014. Minireview: Metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 790–804. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1413>
- Sen, A., Lea-Currie, Y.R., Sujkowska, D., Franklin, D.M., Wilkison, W.O., Halvorsen, Y.D., Gimble, J.M., 2001. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J. Cell. Biochem.* 81, 312–319.
- Serrato López, A.G., Montesinos M., J.J., Anzaldúa Arce, S.R., 2017. The endometrium as a source of mesenchymal stem cells in domestic animals and possible applications in veterinary medicine. *Vet. Mex. OA.* 4, 1–18. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.4.3.441>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M., Arai, T., 2012. Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Vet. Res.* 8, 150. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-150>
- Tanaka, M., Kyo, S., Kanaya, T., Yatabe, N., Nakamura, M., Maida, Y., Okabe, M., Inoue, M., 2003. Evidence of the Monoclonal Composition of Human Endometrial Epithelial Glands and Mosaic Pattern of Clonal Distribution in Luminal Epithelium. *Am. J. Pathol.* 163, 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63653-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63653-X)
- Taylor, H.S., 2004. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA* 292, 81–85. <https://doi.org/10.1001/jama.292.1.81>
- Teixeira, J., Rueda, B.R., Pru, J.K., 2008. Uterine stem cells, in: *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge (MA).
- Vater, C., Kasten, P., Stiehler, M., 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 7, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>
- Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C., Mariani, P., 2009. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol.* 10, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-29>
- Wang, J., Chen, S., Zhang, C., Stegeman, S., Pfaff-Amesse, T., Zhang, Y., Zhang, W., Amesse, L., Chen, Y., 2012. Human Endometrial Stromal Stem Cells Differentiate

- into Megakaryocytes with the Ability to Produce Functional Platelets. *PLOS ONE* 7, e44300. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044300>
- Wang, Q., He, W., Lu, C., Wang, Z., Wang, J., Giercksky, K.E., Nesland, J.M., Suo, Z., 2009. Oct3/4 and Sox2 are significantly associated with an unfavorable clinical outcome in human esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 29, 1233–1241.
- Wang, Y., Sacchetti, A., van Dijk, M.R., van der Zee, M., van der Horst, P.H., Joosten, R., Burger, C.W., Grootegoed, J.A., Blok, L.J., Fodde, R., 2012. Identification of Quiescent, Stem-Like Cells in the Distal Female Reproductive Tract. *PLoS ONE* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040691>
- Wen, Y., Hou, Y., Huang, Z., Cai, J., Wang, Z., 2017. SOX2 is required to maintain cancer stem cells in ovarian cancer. *Cancer Sci.* 108, 719–731. <https://doi.org/10.1111/cas.13186>
- Whitworth, D.J., Ovchinnikov, D.A., Wolvetang, E.J., 2012. Generation and characterization of LIF-dependent canine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 21, 2288–2297. <https://doi.org/10.1089/scd.2011.0608>
- Wolff, E.F., Gao, X.-B., Yao, K.V., Andrews, Z.B., Du, H., Elsworth, J.D., Taylor, H.S., 2011. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 747–755. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01068.x>
- Yi-Jen, C., Ying-Jay, L., Chia-Ming, C., Hsin-Yang, L., Chih-Yao, C., Nae-Fang, T., Ming-Shyen, Y., Yuh-Lih, C., Chi-Hsien, P., Shih-Hwa, C., Chih, P., 2012. Reprogramming human endometrial fibroblast into induced pluripotent stem cells - *ScienceDirect* 51, 35–42. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tjog.2012.01.008>
- Yoon, D.S., Kim, Y.H., Jung, H.S., Paik, S., Lee, J.W., 2011. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif.* 44, 428–440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2011.00770.x>
- Zant, G.V., Liang, Y., 2003. The role of stem cells in aging. *Exp. Hematol.* 31, 659–672. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00088-2](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00088-2)

FIGURAS

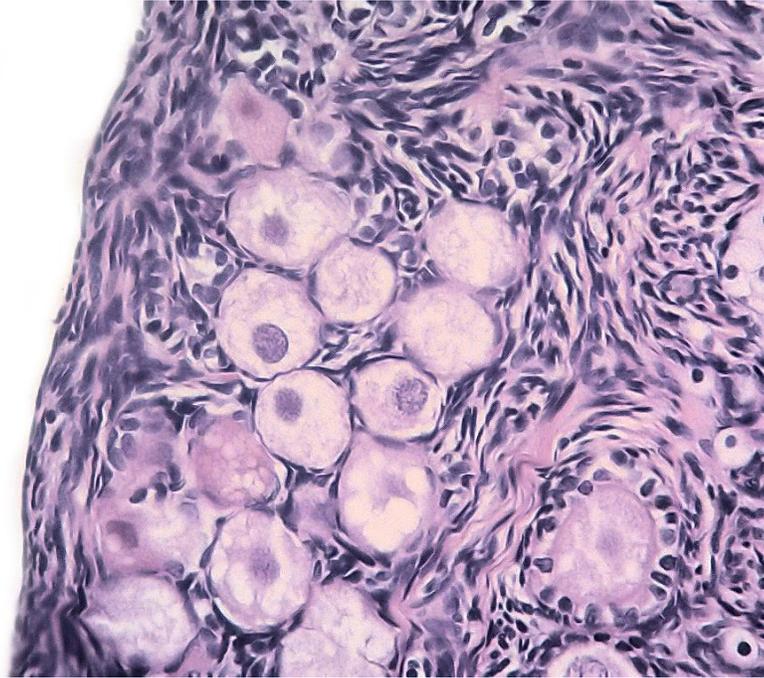


Figura 1. Corte histológico de ovario de perra en anestro, aumento total 400X.

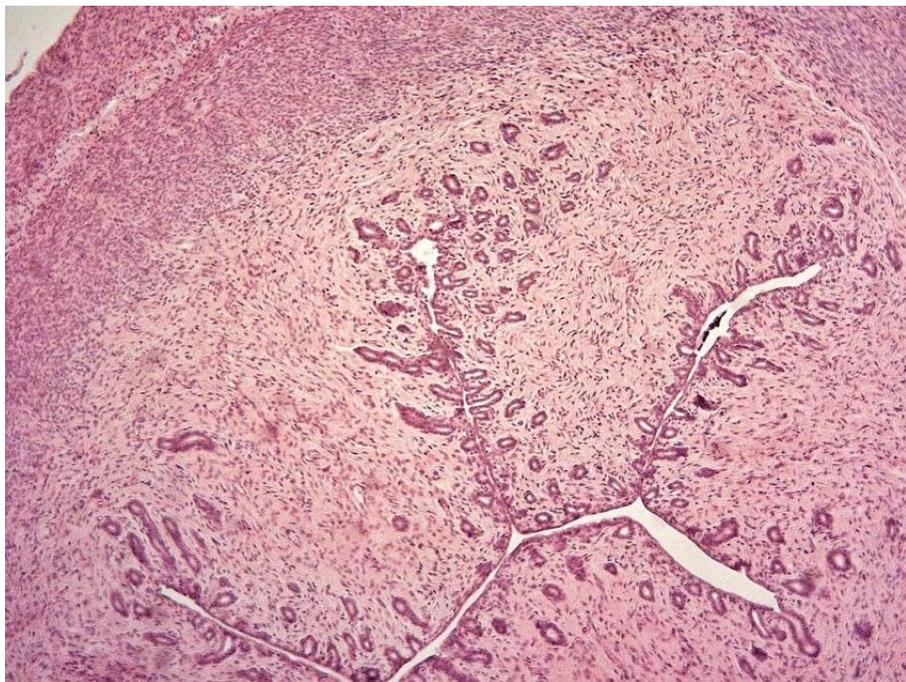


Figura 2. Corte histológico de útero de perra en anestro, aumento total 40X.

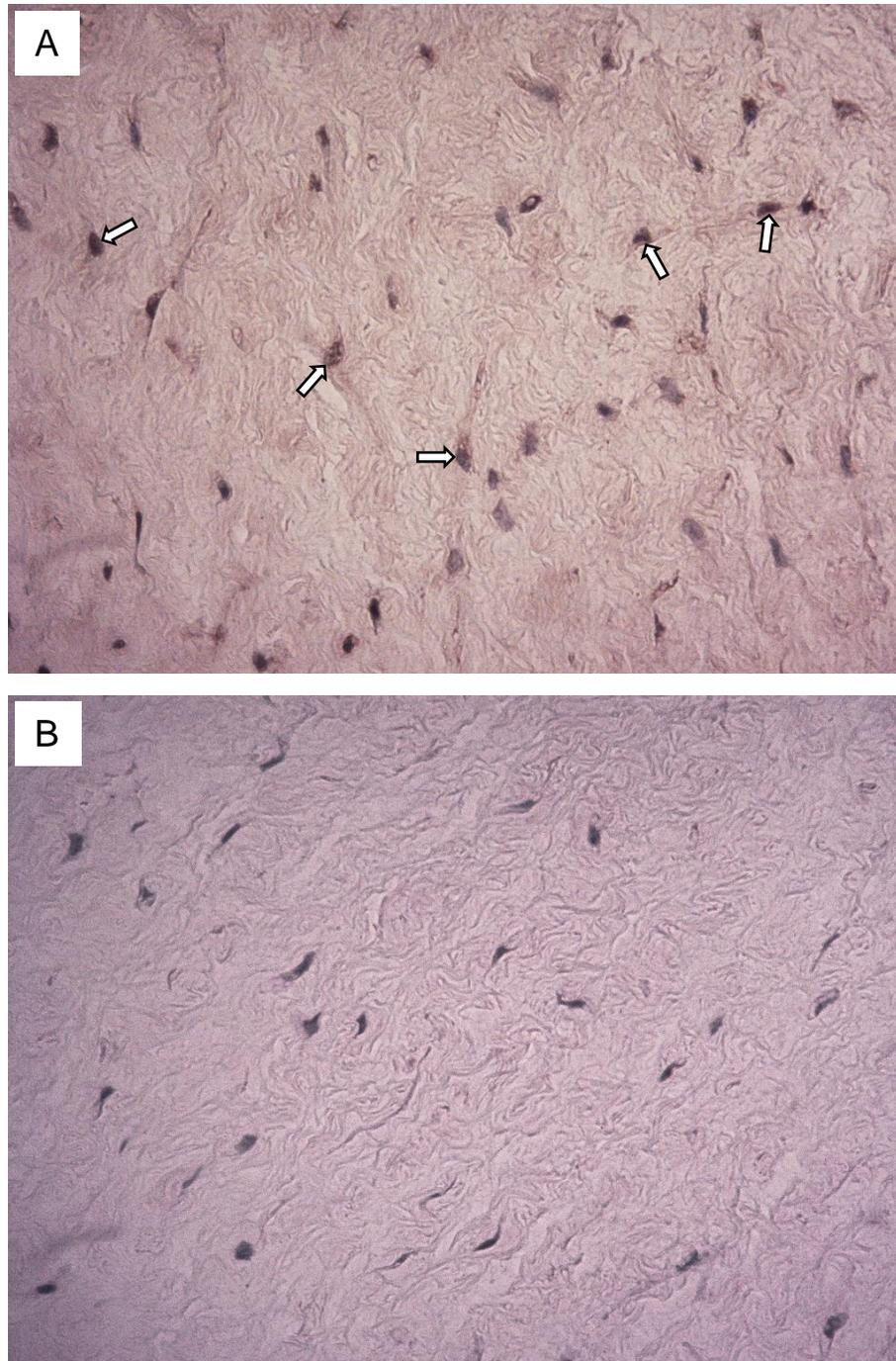


Figura 3. A) Corte histológico de cordón umbilical de perro con células inmunopositivas (flechas) B) Corte histológico de cordón umbilical de perro como control negativo, aumento total 400X.

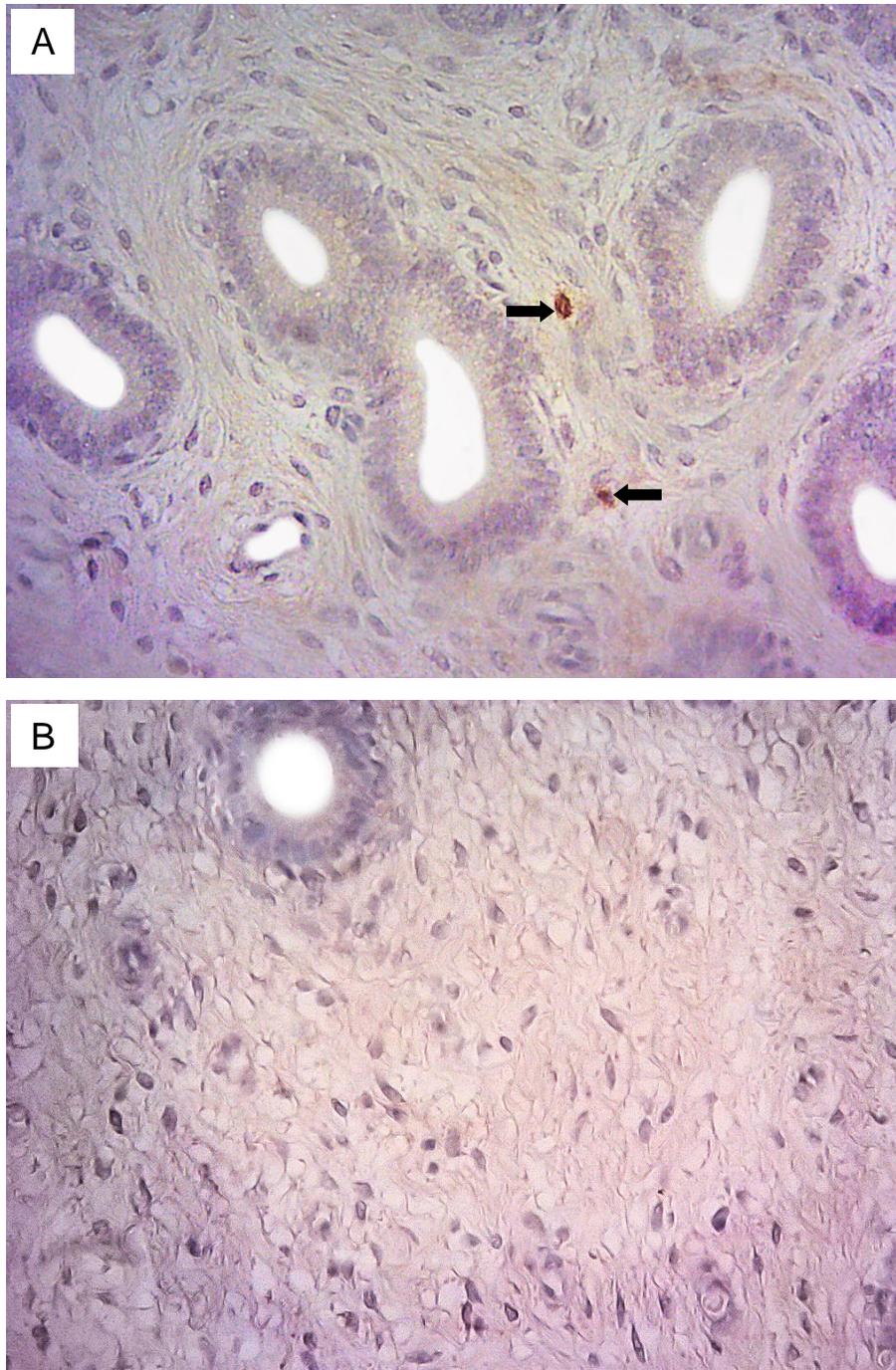


Figura 4. A) Corte histológico de útero (endometrio) de perra con células inmunopositivas (flechas), B) Control negativo de corte histológico de útero (endometrio), aumento total 400X.

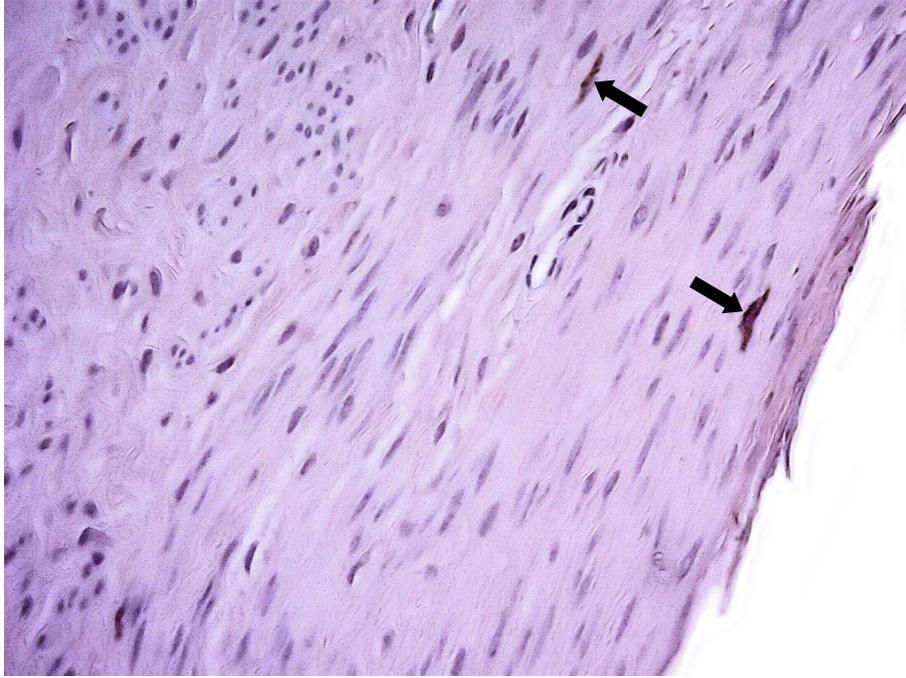


Figura 5. Corte histológico de miometrio de perra con células inmunopositivas a Sox-2 (flechas), aumento total 400X.

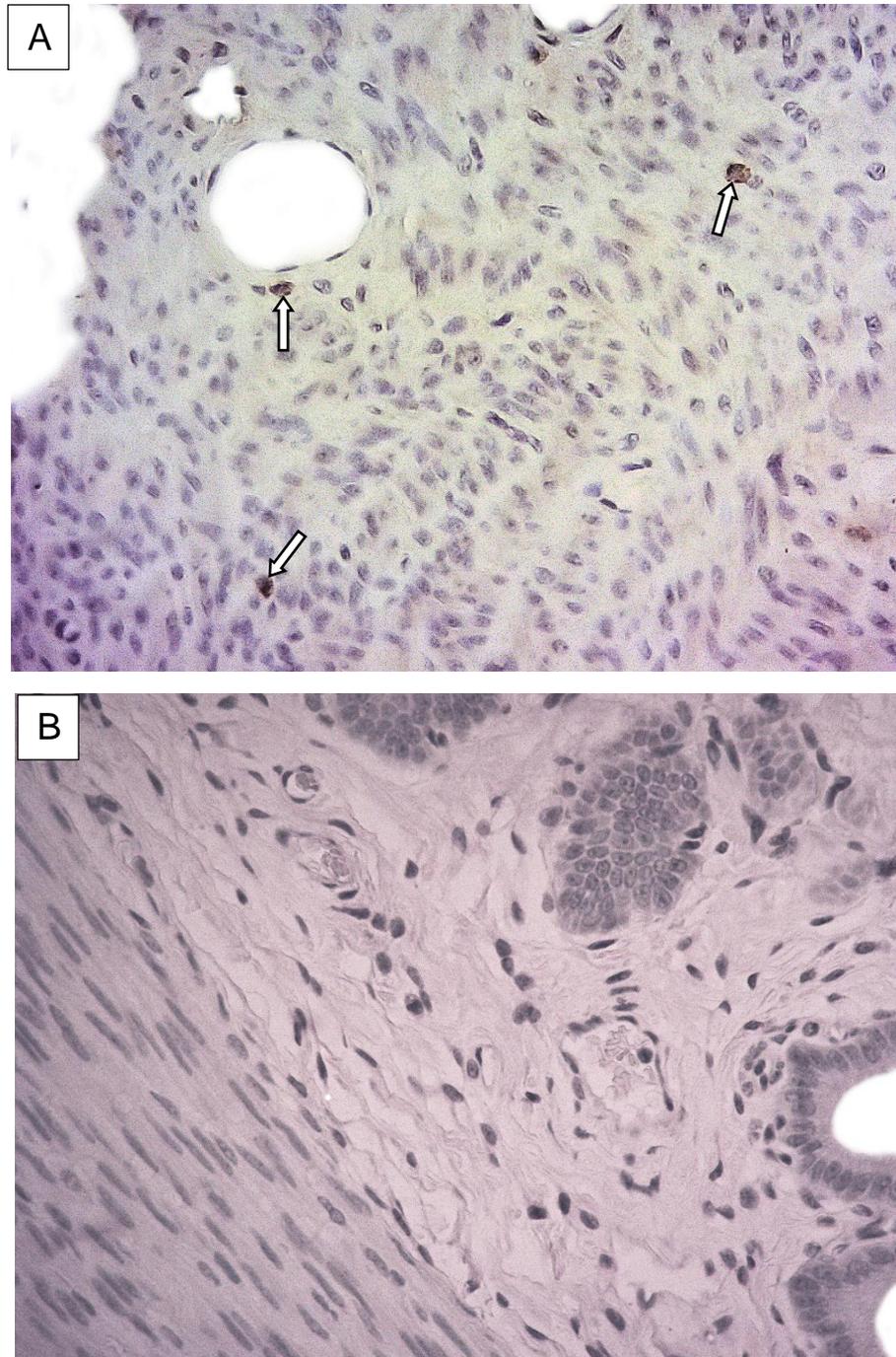


Figura 6. A) Corte histológico de miometrio de perra estrato subseroso con células inmunopositivas a Sox-2 (flechas). B) Corte histológico de la parte profunda del endometrio y miometrio de perra, control negativo, aumento total 400X.

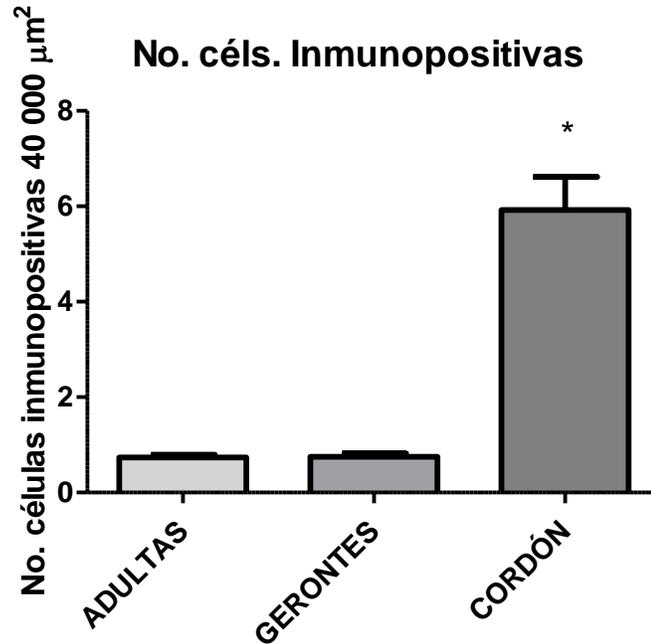


Figura 7. Promedio de células inmunopositivas por área (40 000 μm^2) presentes en el endometrio de perras adultas y gerontes, así como en la gelatina de Wharton de cordón umbilical de perro * $p < 0.0001$

	Adultas	Gerontes	Cordón umbilical
Número de campos	300	300	100
Promedio (H SCORE)	100,3	100,2	102,8*
Desviación estándar	0,3847	0,4094	3,649
Error estándar	0,02221	0,02363	0,3649
Suma	30082	30074	10280

Figura 8. Promedio, desviación estándar y error estándar del H SCORE de células inmunopositivas a Sox-2 en el endometrio de hembras adultas y gerontes, además del H SCORE determinado en células inmunopositivas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical de perro. * $p < 0.0001$

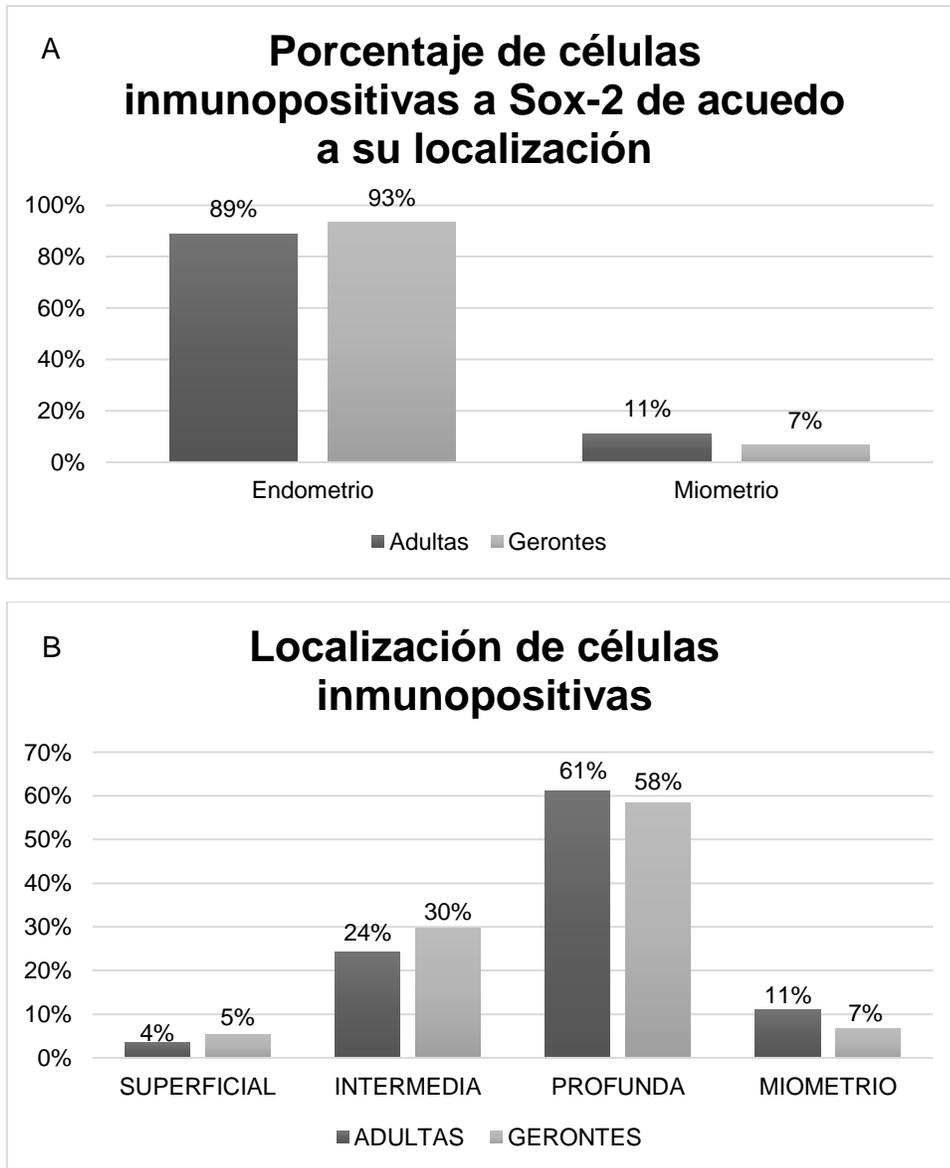


Figura 9. A) Porcentaje de células inmunopositivas presentes en el endometrio en comparación con el miometrio de perras adultas y gerontes. B) Porcentaje de células inmunopositivas a Sox-2 en tres regiones de la lámina propia del endometrio uterino de animales adultos y gerontes: superficial, intermedia y profunda, así como del miometrio.

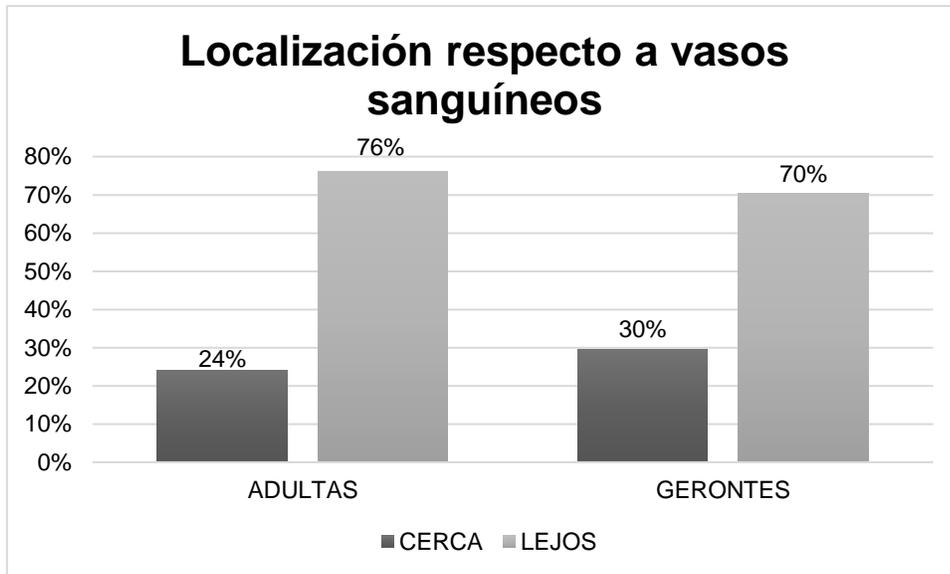


Figura 10. Porcentaje de la ubicación de células inmunopositivas a Sox-2 en relación con los vasos sanguíneos de la lámina propia del endometrio: ubicación cercana (menor o igual a 40 μm de distancia) y lejana (mayor a 40 μm de distancia).

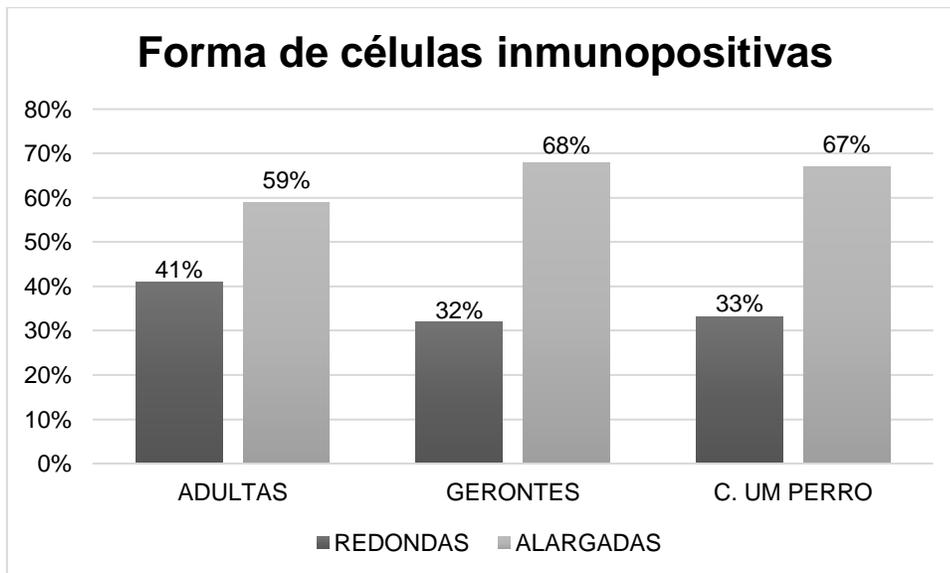


Figura 11. Porcentaje de la forma (redondas y alargadas) de las células inmunopositivas a Sox-2 presentes en el útero de hembras adultas y gerontes así como de células presentes en la gelatina de Wharton del cordón umbilical del perro.