



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS CD44+ EN EL
ENDOMETRIO DE LAS CONEJAS PREPÚBERES Y ADULTAS**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Kevin Fernando Barragán Mayet

ASESOR:

Dr. Santiago René Anzaldúa Arce

FMVZ, UNAM

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.

El presente trabajo es la culminación de años de esfuerzo, en los cuales viví mi primer acercamiento a la investigación científica formal y me permitió aprender de sus bondades y sus dificultades, por lo que mediante este prólogo pretendo dedicar este éxito a las personas que me ayudaron durante el camino:

Sería un error no mencionar antes que nadie a mis padres, Lourdes Mayet y Fernando Barragán, a quienes debo todo y espero honrar con mi desempeño como profesional; gracias por ayudarme a alcanzar mi sueño de ser médico veterinario.

A mis hermanos, Heber y Yordanska, por recordarme durante todo el camino como sonreír a pesar de las adversidades y por brindarme siempre su cariño y compañía.

A mi abuelita, Manuela Cruz, por ser siempre ese ser luminoso que me recibía con un abrazo, su bendición y comida caliente después de un arduo día de escuela, sin su amoroso apoyo nunca hubiera podido lograrlo.

A Sara, por ser mi compañera en esta aventura. Por tu paciencia y tu amor durante este tiempo a tu lado, nuestros sueños son la fuerza que levantó este trabajo y me permitió salir avante, sé que mientras tomes mi mano podré lograr cualquier cosa.

A mi maestra, Katia Jimenez, por todas sus enseñanzas y por la oportunidad que me ha brindado para trabajar con ella, gracias sobre todo por apoyarme cuando el panorama se oscurecía, tus palabras fueron mi fuerza para no rendirme.

A mi mejor amiga, Fernanda Chávez, no tengo manera de agradecerte tu apoyo en esos momentos que creíste en mi cuando ni siquiera yo mismo lo hacía, siempre con tus palabras llenas de cariño y tu sonrisa única, fuiste un ángel en mi camino.

Finalmente, a mis amigos, que esta carrera supo convertir en hermanos: Caro, Lulú, Diana Karen, Frida, Ninel, Valeria, Brandon, Charly, Arturo, Armando, Gonzalo, Alejandro, Alfonso, Marcos y Gustavo; gracias por darme un lugar en su corazón.

AGRADECIMIENTOS

Quiero extender mi gratitud a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por acogerme como mi segundo hogar durante estos años, espero retribuir de la mejor forma posible lo que he aprendido gracias a mi estadía aquí y a todos mis maestros que cada uno contribuyó con una parte de lo que hoy soy.

A mi asesor, el Dr. Santiago René Anzaldúa Arce, por creer en mí como candidato para culminar este proyecto, por su paciencia y enseñanzas durante estos años y por permitirme dar clases a su lado, nunca olvidaré lo que hemos logrado.

Al Departamento de Morfología de la FMVZ, por recibirme cuando era un simple voluntario, hoy gracias a que se me permitió usar sus instalaciones y equipos es que puedo presentar este trabajo terminado.

Al CEIEPAv de la FMVZ, por permitirme acudir a sus instalaciones y recolectar las muestras de útero de coneja para mi trabajo.

A Emilio Francisco López López por su asistencia técnica en el procesamiento histológico de las muestras.

A Nydia Carolina Anzaldúa Torres, por su amable ayuda para explicarme como realizar el HSCORE, gracias por tu amistad y todo el apoyo que me has brindado.

Al Proyecto PAPIIT IN216412 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por el financiamiento para la adquisición de los anticuerpos y otros reactivos.

A los miembros del jurado, por sus observaciones y su amable atención.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Células troncales mesenquimales.	5
2.2. Células troncales mesenquimales en el endometrio.	6
2.3. El endometrio de las conejas como fuente de CTM.	8
2.4. Marcadores moleculares de las CTM.	9
<i>2.4.1. Estudios moleculares de CTM en distintas especies.</i>	9
<i>2.4.2. El CD44 como marcador molecular de CTM.</i>	10
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	12
6. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6.1. Material biológico.	13
6.2. Procedimiento inmunohistoquímico.	14
6.3. Análisis estadístico.	17
7. RESULTADOS	18

8. DISCUSIÓN	22
8.1. Presencia de células CD44+ en el endometrio de la coneja.	22
8.2. Variaciones en la expresión de CD44 en el epitelio uterino entre animales prepúberes y adultos.	26
9. CONCLUSIONES	30
10. ÍNDICE DE ABREVIATURAS	31
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMEN

Barragán Mayet Kevin Fernando. **DETERMINACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE CÉLULAS CD44+ EN EL ENDOMETRIO DE LAS CONEJAS PREPÚBERES Y ADULTAS.** Bajo la dirección de: Dr. Santiago René Anzaldúa Arce.

Estudios recientes han demostrado la presencia de poblaciones celulares similares a células troncales mesenquimales en el endometrio de mujeres y de diferentes especies de animales domésticos; estas células pueden ser responsables de la capacidad regenerativa del endometrio de forma cíclica bajo la influencia de las hormonas esteroides sexuales. A la fecha, no se ha reportado la presencia de estas células en la coneja mediante marcadores característicos como el CD44. El objetivo de este estudio fue identificar, cuantificar y comparar el número de células endometriales inmunopositivas a CD44 en conejas prepúberes y conejas adultas. Se incluyeron 12 conejas prepúberes (CP) y 12 conejas adultas (CA) de la raza Nueva Zelanda en las cuales se identificaron mediante la técnica de inmunohistoquímica en el endometrio, células inmunopositivas a CD44, específicamente en el epitelio de revestimiento (ER) y en el epitelio glandular (EG). Se compararon las variaciones en el número de células CD44+ entre los grupos de edad y las regiones del epitelio, evidenciando que la expresión de CD44 en el ER y EG de las CP es el mismo, mientras que en las CA es mayor en el EG que en el ER. La expresión total de CD44 en el endometrio de las CP es menor que en CA. Los resultados sugieren una influencia de las hormonas sexuales esteroides

ováricas en la regulación de estas células. Este es el primer estudio que evalúa la expresión del CD44 en el endometrio de la coneja asociado a una población de células con presunta actividad multipotencial. Las funciones de estas células en la fisiología reproductiva de la coneja permanecen desconocidas.

I. INTRODUCCIÓN

El mecanismo que emplea el organismo para compensar la pérdida constante de células en todos los tejidos, puede explicarse mediante la presencia de una población celular muy reducida y con características especiales, denominada células troncales multipotenciales. Esta población celular se caracteriza por tener dos capacidades biológicas importantes: la de autorrenovación, que le permite mantener una población constante de células, y la de multilinaje, para diferenciarse hacia diversos tipos celulares propios de un tejido (Weissman, 2000).

Las primeras células troncales en ser identificadas fueron las células hematopoyéticas (CTH), las cuales dan lugar a la formación de todos los tipos celulares presentes en la sangre (Till & McCulloch, 1961). A la fecha se ha demostrado la presencia de células troncales en la piel, sistema nervioso, páncreas, corazón, hígado y médula ósea, entre otros sitios (Wulf *et al.*, 2001).

En la médula ósea existen dos tipos de células troncales: las CTH previamente mencionadas, y las células troncales mesenquimales (CTM). Estas últimas fueron descritas por primera vez como un subgrupo específico de células que conformaban un bajo porcentaje del total de la población celular de la médula ósea (Friedenstein *et al.*, 1976). Los mismos investigadores observaron que esta población celular se adhería al plástico de las cajas de cultivo y formaba agrupaciones celulares o colonias a partir de una sola célula, es decir era clonogénica. También quedó demostrado que no eran células fagocíticas y que ellas

daban origen a células del estroma medular (adipocitos, osteoblastos y fibroblastos). Estudios posteriores demostraron que las CTM pueden ser aisladas de varios tejidos adultos y neonatales (Montesinos *et al.*, 2009).

En los últimos años, las CTM han sido profundamente estudiadas para su aplicación clínica, debido a su potencial biológico relacionado con la capacidad para originar células de diferentes tejidos, y para dar soporte hematopoyético, así como por sus propiedades inmunorreguladoras (Méndez-Ferrer *et al.*, 2010; English, 2013). Su rareza y la falta de características morfológicas distintivas y marcadores específicos dificultan la identificación de su ubicación en los tejidos (Shostak, 2006). Quedando de manifiesto los retos de encontrar fuentes asequibles que permitan aislar estas células para su estudio, que no generen conflictos éticos; así como el de establecer marcadores específicos de las CTM que nos permitan obtener y cultivar poblaciones más homogéneas, para evitar la gran variabilidad en los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Células troncales mesenquimales

Las células troncales tienen la capacidad de autorrenovarse y dar lugar a células de varios linajes. Hoy en día representan una fuerte promesa para ser utilizadas como terapia celular de varias enfermedades. Generalizando, podemos dividir a las células troncales en dos grupos: las embrionarias y las somáticas. Las células troncales embrionarias se derivan de la masa celular interna del blastocisto y pueden diferenciarse hacia células de las tres capas germinales (Salem & Thiermermann, 2010). Aunque estas células representan un excelente modelo de estudio, entre los inconvenientes que se han planteado para su uso a nivel clínico están los aspectos éticos y la posibilidad de formar teratomas (Bianco *et al.*, 2013). Por otro lado, encontramos las células troncales somáticas, consideradas células especializadas con un potencial de diferenciación limitado. En los últimos años, algunos tipos de células troncales somáticas han sido ampliamente estudiados como potenciales estrategias de terapia celular para diferentes enfermedades (Pereira *et al.*, 1995; Anjos-Afonso *et al.*, 2004).

Las células troncales mesenquimales (CTM) son un tipo de célula troncal somática, descritas por primera vez en el estroma de la médula ósea (Friedenstein *et al.*, 1976), que tienen la capacidad de auto-renovación y son multipotentes (Dennis *et al.*, 2002). Estas CTM tienen la capacidad de diferenciarse en líneas celulares derivadas del mesodermo, incluyendo adipocitos, condrocitos u osteocitos *in vitro* (Salem & Thiermermann, 2010). Estudios recientes también han demostrado

que se pueden diferenciar por un proceso llamado plasticidad en líneas celulares no mesenquimales; como neuronas, células hepáticas y pancreáticas (Wulf *et al.*, 2001). Además de esta amplia capacidad de diferenciación, las propiedades moduladoras inmunológicas de las CTM son un aspecto importante para propósitos terapéuticos (Masuda *et al.*, 2012).

2.2. Células troncales mesenquimales en el endometrio

El endometrio, revestimiento de la mucosa altamente regenerativo del útero, presenta un crecimiento de 4-7 mm dentro de 4-10 días cada ciclo menstrual en humanos (McLennan, 1965). Esta capacidad regenerativa dinámica es regulada fisiológicamente por cambios cíclicos de los niveles de hormonas esteroides sexuales en plasma (Masuda *et al.*, 2012). El endometrio, en el caso de las especies animales, se regenera y retrocede con cada ciclo estral bajo control hormonal durante toda la vida reproductiva. Este potencial de regeneración y remodelación en forma cíclica alude a la existencia de CTM en el endometrio. Durante el período reproductivo, el endometrio experimenta modificaciones morfológicas y fisiológicas: crecimiento y diferenciación con funciones secretoras; y en ausencia de fecundación ocurren la menstruación, la involución glandular y la regeneración. Estas modificaciones cíclicas crean un ambiente adecuado para la implantación y para un nuevo ciclo.

Se ha reportado la presencia de CTM en el endometrio de los seres humanos (Chan *et al.*, 2004; Gargett 2007), ratones y cerdos (Cervello *et al.*, 2007; Miernik & Karasinski, 2012), además de que estudios recientes han permitido encontrarlas en

bovinos en las distintas fases del ciclo estral, en esta especie se observa que dichas células son positivas a anticuerpos contra tres marcadores moleculares propios de estas células: Oct-4, Sox-2 y CD44 (Cabezas *et al.*, 2014). Aunque la identidad precisa de las CTM endometriales sigue siendo difícil de identificar, se cree que estas células juegan un papel fundamental en la remodelación fisiológica, en la regeneración del endometrio y en la patogénesis de las enfermedades asociadas al endometrio, tales como la endometriosis humana (Maruyama, 2014).

En el caso de las cerdas utilizando tinción de colorante fluorescente Hoechst 33342 y citometría de flujo, se ha identificado una población celular de clase emergente que puede ser responsable del proceso de regeneración del endometrio porcino. A partir de las células individuales pudieron obtenerse colonias celulares que pueden diferenciarse en tres líneas de células mesenquimales independientes. Se demostró además la expresión de marcadores específicos de células de auto-renovación en estas células emergentes y la presencia de una población de células en el estroma que poseen marcadores de CTM. Estos resultados indican que el endometrio porcino contiene una población de células con la capacidad de auto-renovación y una alta tasa de proliferación, que dependen de la fase del ciclo estral, y podrían estar involucradas en la reconstrucción cíclica del endometrio porcino (Bodek *et al.*, 2014). Las CTM provenientes del endometrio humano son capaces de diferenciarse en otros tipos de células de origen mesenquimal como los condrocitos, lo que demuestra su capacidad como células multipotentes (Wolff *et al.*, 2007). Por lo que podemos establecer al endometrio como una fuente potencial e innovadora de células multipotentes.

2.3. El endometrio de las conejas como fuente de CTM

El endometrio de esta especie cuenta con una alta capacidad proliferativa, la cual se piensa que se origina en las porciones más profundas del endometrio (Wyss *et al.*, 1996). Esta capacidad puede depender de distintas poblaciones celulares, entre las cuales estarían involucradas posiblemente las CTM, diferenciándose y formando componentes epiteliales, estromales y vasculares del endometrio; aunque hasta el momento no se ha reportado la presencia de las CTM en el endometrio de las conejas. Sin embargo, se establece que este sistema regenerativo puede escapar a la inhibición de la proliferación por parte de la progesterona en monos Rhesus (Kaiserman-Abramof & Padykula, 1989), pero si responde a la estimulación hormonal por aumento de estrógenos (Padykula *et al.*, 1984). Es importante mencionar que en la hembra del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*), no existe la presencia de un ciclo estral estricto, aunque existe cierta periodicidad sexual. La ausencia de ciclo estral se debe a que la ovulación habitualmente sólo se produce como consecuencia de la estimulación coital (ovulación refleja). De no darse la fecundación se presenta un estado de pseudogestación con una duración de 17-18 días (García, 1991).

2.4. Marcadores moleculares de las CTM

2.4.1. Estudios moleculares de CTM en distintas especies

Estudios recientes sobre la menstruación en mujeres, el ciclo estral en ratonas, cerdas y vacas o la gestación en general, indican que el desarrollo y reposición de las células que conforman el endometrio, está basado en la activación, proliferación y diferenciación de CTM presentes en nichos del tejido uterino (Teixeira *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2010; Miernik & Karasinski, 2012; Cabezas *et al.*, 2014). Por lo que se han realizado estudios de inmunohistoquímica, RT-PCR y cultivos celulares, que corroboran la presencia de una población de células con capacidad de diferenciación hacia tejidos derivados del mesodermo y que cuentan con la expresión de marcadores como Oct4, SOX2 y CD44, los cuales sugieren la presencia de CTM (Park & Patel, 2010; Cabezas *et al.*, 2014).

Estudios previos acerca de la presencia de CTM en el endometrio de animales como la cerda (Miernik & Karasinski, 2012), la vaca (Cabezas *et al.*, 2014), la perra (De Cesaris *et al.*, 2017) y la yegua (Cabezas *et al.*, 2018) no demuestran que exista una diferencia en la expresión del marcador CD44 en relación al estado reproductivo del animal del que se tomó la muestra (Miernik & Karasinski, 2012; Cabezas *et al.*, 2014), así mismo, en el estudio realizado por Cabezas y sus colaboradores (2014), no se encontró una diferencia significativa entre la expresión del CD44 y otros marcadores de CTM de animales en fase lútea temprana y fase lútea tardía en bovinos.

2.4.2. El CD44 como marcador molecular de CTM

El CD44 es una familia de glicoproteínas transmembranales localizada de forma ubicua en el organismo en células mesenquimales (leucocitos y células hematopoyéticas) (Dougherty, 1991) y epitelios de división activa (piel, mejillas, lengua, esófago, vagina, intestinos, oviducto y vejiga) (Alho & Underhill, 1989). Esta glicoproteína se encuentra relacionada estrechamente con una familia de proteínas que reciben diversos nombres como son: Pgp-1, Ly-24, ECMIII, go90Hermes, H-CAM y el receptor del ácido hialurónico (HA). Esta variedad de nombres que recibe se debe a que se ha estudiado en distintos laboratorios y bajo distintos enfoques funcionales, como son el ‘homing” de linfocitos, la adhesión celular, la activación de leucocitos y la migración celular (Underhill, 1992).

Teniendo en cuenta la función adhesiva de CD44 en las interacciones célula-célula y célula-matriz (Lesley *et al.*, 1993), sería esperado encontrar una expresión de este marcador en órganos como el útero de diversas especies, como es el caso de la coneja; además, su presencia se comprobó en el estudio realizado por Saegusa y sus colaboradores en 1999, para evaluar su expresión en el desarrollo de tumores cérvico-uterinos en humanos. Sin embargo, este estudio no refiere la expresión de este marcador en otras regiones del útero y no existen estudios comprobados que evalúen el comportamiento en la expresión del marcador en relación a la influencia de hormonas sexuales que influyen de forma directa en el desarrollo del útero.

Un estudio previo utilizando inmunohistoquímica para detectar la proteína CD44 en el endometrio de las conejas, logró identificar una isoforma del CD44 con una débil marca en individuos pseudogestantes, y una fuerte expresión de esta isoforma del marcador en individuos gestantes a partir del sexto día de gestación, con una máxima expresión del CD44 entre el día 8 y 9 de gestación (Hohn *et al.*, 1995). Aunque, los investigadores no asociaron la expresión de esta proteína en el epitelio uterino a la presencia de una población de CTM, ya que el marcador se mostró ausente en las regiones donde se esperaría encontrar la población de células germinales que dan origen a este epitelio. Así mismo se encontró que esta isoforma estaba completamente ausente en individuos no gestantes, por lo que se asoció su presencia a cambios en el epitelio originados por las hormonas esteroideas maternas y señales embrionarias como la presencia del blastocisto (Hohn *et al.*, 1995).

3. JUSTIFICACIÓN

En la búsqueda de fuentes alternas para obtener CTM de fácil acceso y sin intervenir con cuestiones éticas, buscamos en el conejo doméstico, el cual es una especie de fácil mantenimiento en el laboratorio, un modelo de estudio nuevo para el aislamiento de CTM. Sumado a esto, proponemos una fuente de obtención de CTM que no compromete la vida de los animales, ya que el útero puede ser retirado del organismo eliminando la necesidad de provocar un trauma profundo o de sacrificar a los animales estudiados. Así mismo el material biológico que se puede

obtener de esta especie es en cuanto a tamaño mucho más significativo de lo que se podría recuperar de otras especies comunes del laboratorio, y en consecuencia los cultivos primarios de CTM obtenidos podrían ser mayores.

De forma complementaria, estudiar la diferencia en la expresión de marcadores moleculares asociados a poblaciones de posibles CTM entre individuos antes y después de la pubertad nos permitiría entender mejor el papel de estas células con su presunta actividad multipotencial en la regeneración del endometrio y la influencia que tienen las hormonas esteroides sexuales en su población.

4. HIPÓTESIS

Una prueba inmunohistoquímica para el marcador molecular CD44 permitirá demostrar la presencia de una población de células con características similares a las CTM endometriales, en el útero de conejas prepúberes y en edad reproductiva.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar, cuantificar y comparar el número de probables células troncales mesenquimales endometriales inmunopositivas a CD44 en conejas prepúberes y conejas adultas.

5.2. Objetivos específicos

- a) Demostrar la presencia de una población de presuntas células troncales mesenquimales en el endometrio del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) mediante la identificación de células positivas a CD44.
- b) Cuantificar y comparar el número de células inmunopositivas a CD44 en el endometrio de las conejas prepúberes y el de las conejas adultas, determinando si existe una diferencia significativa entre ambos.
- c) Cuantificar y comparar el número de células inmunopositivas a CD44 en el endometrio, identificando si existe una diferencia significativa en la expresión de este marcador entre el epitelio de revestimiento y el epitelio glandular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se colectaron 12 úteros de conejas de raza Nueva Zelanda que no superaron los dos meses de edad y 12 úteros de conejas en edad reproductiva (n=24).

Los criterios de inclusión para el estudio correspondieron a úteros de hembras clínicamente sanas y sin alteraciones funcionales aparentes del tracto reproductor femenino.

Los aparatos reproductores se colectaron en el rastro de conejos de las instalaciones del CEIEPAv (Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM), al momento

de la matanza y limpieza de las canales, ya que normalmente estas estructuras se desechan con el resto de las vísceras. Los animales fueron sacrificados mediante desnucamiento y desangrados por corte yugular, de acuerdo a los lineamientos de este centro de producción. Dicho animales, están destinados al consumo humano, por lo que esta investigación no demandó el sacrificio de ningún animal y sólo se aprovechó el material biológico que se desecha en el rastro.

La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia dio su aprobación de acuerdo con la Guía y determinó que el protocolo para nuestro experimento no ameritaba la evaluación por parte del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (CICUAE).

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

6.2. Procedimiento Inmunohistoquímico

Las muestras se procesaron en un histoquinette automático (American Optical p 800) para su inclusión en parafina, posteriormente las muestras se cortaron mediante un microtomo (Spenser 820) a 4-5 μm de grosor.

Las muestras seccionadas se colocaron en laminillas previamente tratadas con Poly-L-lisina (Sigma), después se desparafinizaron y rehidrataron a través de concentraciones decrecientes de alcohol a agua destilada, se transfirieron a una

solución amortiguada de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) y se calentaron en un esterilizador con temperatura graduada (96 °C) durante 5 min., después se dejaron enfriar por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente las laminillas se lavaron con agua destilada por 5 min y luego con PBS (pH 7.4), al término se incubaron sucesivamente en dos baños en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS por 15 min a temperatura ambiente para inactivar las peroxidasas endógenas. Finalmente, para inactivar los sitios inespecíficos de unión del anticuerpo primario se les colocaron gotas de suero de bloqueo del kit Vectastain Elite ABC Kit® (Vector Laboratories, de Inc. Burlingame, CA, E.U.) en PBS por 10 min.

Posteriormente, las secciones de tejido se incubaron con el anticuerpo primario (dilución 1: 200); empleando un anticuerpo primario policlonal desarrollado en cabra contra las proteínas CD44 (Santa Cruz, sc-31043); para lo cual se colocaron las laminillas en una cámara húmeda a una temperatura de 2-4°C durante toda la noche.

La reacción antígeno-anticuerpo se evidenció mediante la unión del complejo ABC (Vectastain Elite ABC kit® de Vector Laboratories, de Inc. Burlingame, CA, E.U.). La actividad de la peroxidasa fue revelada usando 3,3'-diaminobenzidina (DAB) como substrato (Vector Laboratories). Después de un lavado en PBS las secciones se contratiñeron con Hematoxilina de Mayer, se deshidrataron y se aplicó un medio de montaje (Entellan®, Merck - ICT, SL). Se utilizaron de la misma región del útero como tejido testigo negativo, en los cuales el primer anticuerpo se sustituyó por PBS (García del Moral, 1993). Con la finalidad de demostrar la especificidad del anticuerpo primario contra los determinantes antigénicos, se utilizaron como tejido

testigo positivo cortes de cordón umbilical humano (donados por la Facultad de Medicina de la UNAM).

Las observaciones de la inmunotinción y las imágenes fueron realizadas usando un microscopio óptico (Carl Zeiss) unido a una cámara de video digital (Leica DMLS), enlazado a una computadora y con un software de digitalización de imágenes (Image Proplus) para el análisis y almacenamiento de las fotomicrografías. El número de células inmunopositivas en el epitelio se determinó utilizando una retícula micrométrica (Carl Zeiss) con el objetivo de 40X, teniendo un aumento total de 400X.

La intensidad de la inmunorreacción fue cuantificada y clasificada por niveles de intensidad; el número total de células inmunopositivas que aparecieron en el epitelio se cuantificó en un total de 24 campos microscópicos, lo que representa un área total de 1 mm². Los campos microscópicos se seleccionaron subjetivamente dispersos, en áreas del corte que incluyeran en el campo la luz uterina y todos los elementos principales que forman el endometrio (mucosa uterina, lámina propia y submucosa con glándulas endometriales), manteniendo una proporción constante de estos elementos entre los campos a lo largo de la cuantificación. Como las secciones de los cuernos uterinos son transversales (comúnmente con una forma elíptica), se siguió la dirección de las agujas del reloj al colocar cada campo microscópico y de esa manera se aseguró de que los campos no se superpusieran y que se cubriera la mayor parte de la superficie del endometrio. Todas las células epiteliales, incluidas las de revestimiento y las glandulares, se analizaron en cada sección.

Se determinó la intensidad de la marca inmunopositiva sobre los límites celulares y se asignaron los siguientes valores: 0 = negativa, 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).

6.3. Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza de una sola vía (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey para determinar diferencias significativas de los datos ($p < 0.001$). Se utilizó el Programa Prism 5.02 (Graph Pad, CA, USA) para calcular los valores de probabilidad.

7. RESULTADOS

No se observaron alteraciones patológicas en los cortes histológicos del útero tanto del grupo de animales prepúberes como de los adultos.

Se observaron células inmunopositivas a CD44 en cortes de cordón umbilical humano (figura 1 B). Las células CD44+ presentes en la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano presentaron la marca inmunopositiva en los límites celulares.

La marca inmunopositiva se observó en el límite celular del epitelio tanto de revestimiento como glandular de ambos grupos de conejas (Figura 1D y 1F). No se observaron células inmunopositivas en la lámina propia, en el miometrio o en el perimetrio.

En la Figura 2 se muestra la expresión de la proteína CD44 a través del cálculo del HSCORE en el epitelio de revestimiento y en el glandular de las conejas prepúberes y adultas.

Se observó una menor expresión total de CD44 a través de la determinación de HSCORE en las conejas prepúberes en relación con las adultas tanto en el epitelio de revestimiento como en el glandular.

No se observaron diferencias en el HSCORE del epitelio de revestimiento (162.44 ± 3.61) y del glandular (151.0 ± 3.43) en el grupo de conejas prepúberes (Figura 2).

Se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) en el HSCORE del epitelio de revestimiento de las conejas adultas (186.2 ± 3.58) en relación con el epitelio de revestimiento de las conejas prepúberes (162.44 ± 3.61) (Figura 2).

También se observó un incremento significativo ($p < 0.001$) en el HSCORE del epitelio glandular de las conejas adultas (213.5 ± 3.69) en relación con el epitelio glandular de las conejas prepúberes (151.0 ± 3.43) (Figura 2).

Existió un incremento significativo ($p < 0.001$) del HSCORE en el epitelio glandular de las hembras adultas (213.5 ± 3.69) en relación con el epitelio de revestimiento de las conejas adultas (186.2 ± 3.58) (Figura 2).

Figura 1: Fotomicrografías de la inmunohistoquímica del cordón umbilical de humano (A y B), útero de conejas prepúberes (C y D) y adultas (E y F), se muestran los controles negativos de cada uno de los cortes seriados respectivos (A,C y E). Barra de 20 μ m

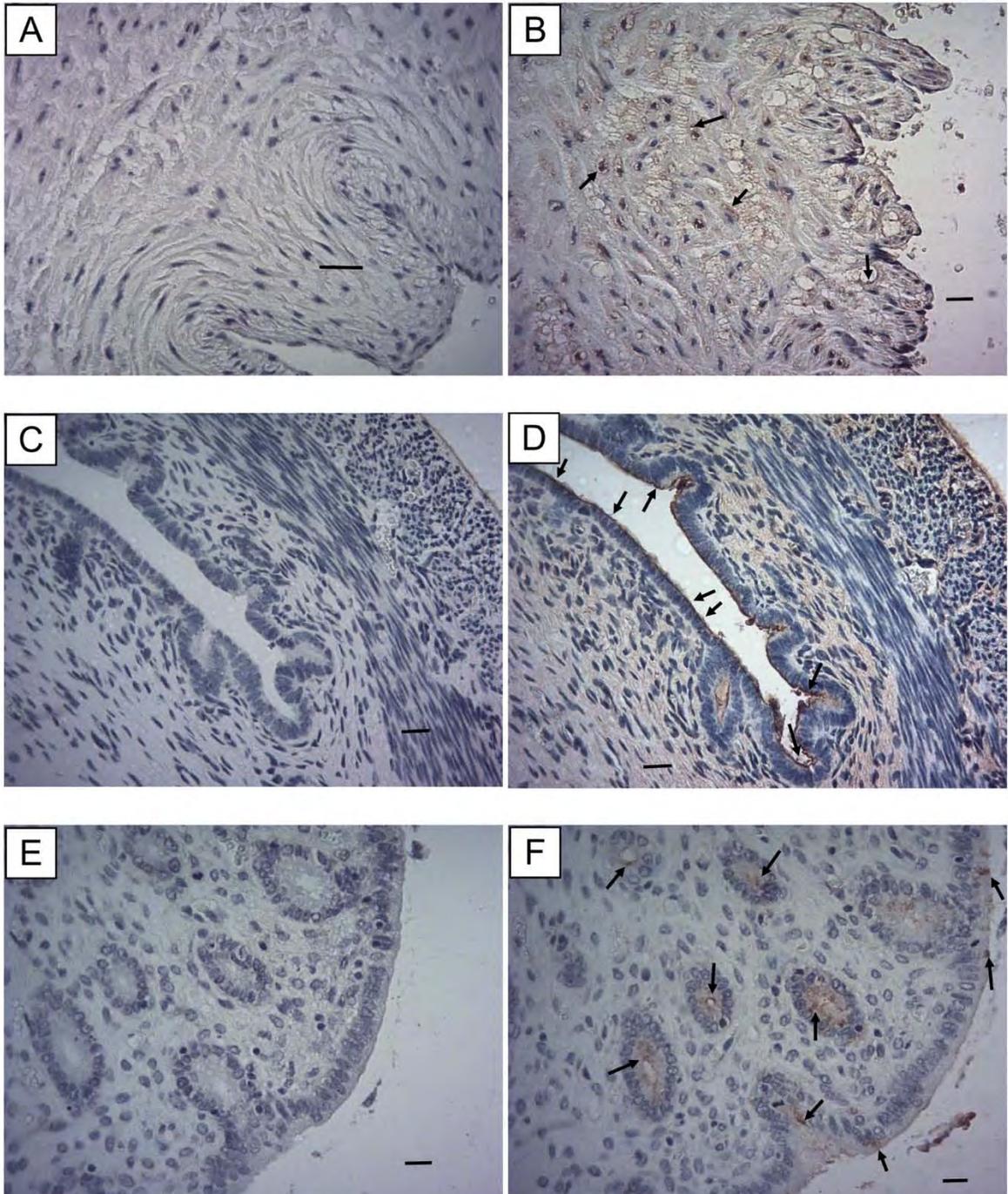
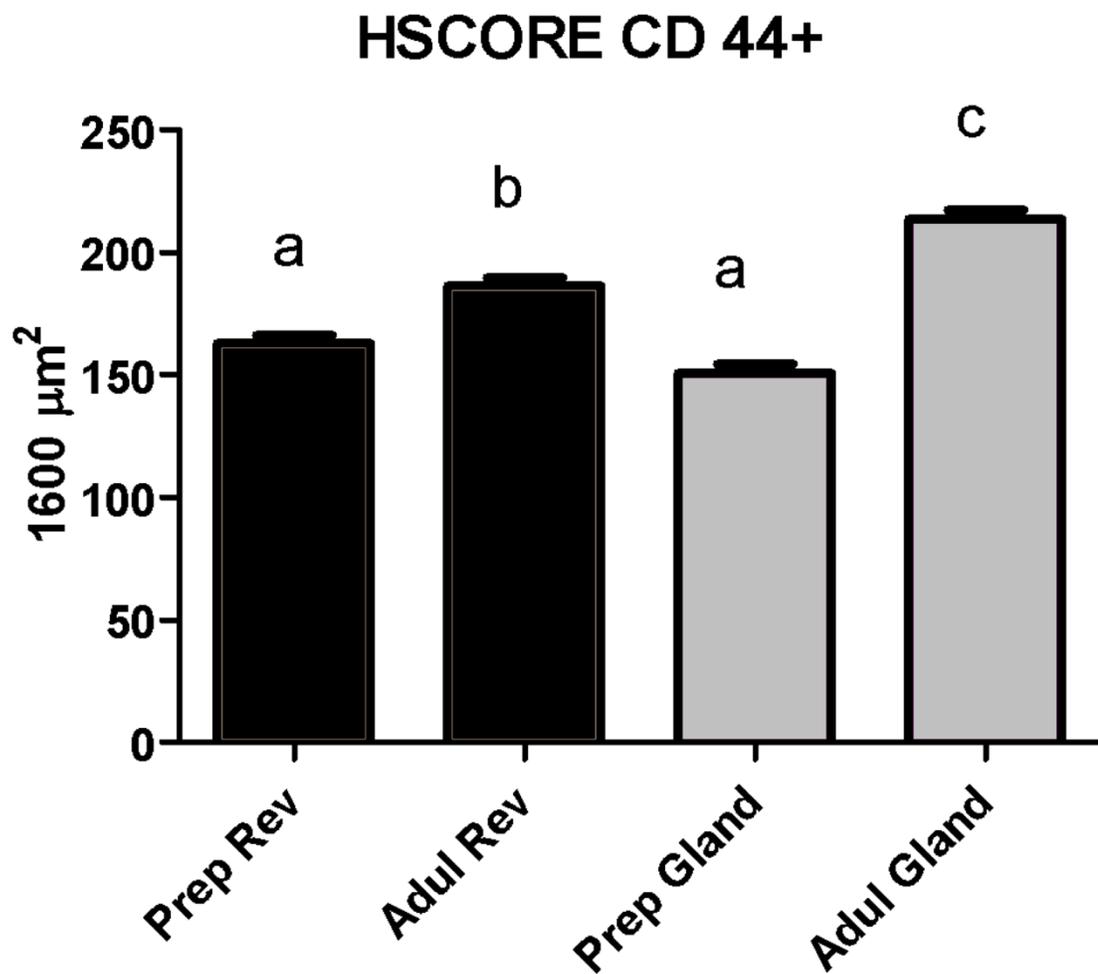


Figura 2: Expresión de CD44 en el epitelio de revestimiento y glandular de las conejas prepúberes y adultas. Se muestra el promedio y el error estándar del HSCORE calculado a partir de las células CD44+ en el epitelio de revestimiento (Rev) y glandular (Gland) de las conejas prepúberes (Prep) y adultas (Adult). Las literales distintas indican diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los diferentes grupos estudiados.



8. DISCUSIÓN

8.1. Presencia de células CD44+ en el endometrio de la coneja

Previamente se ha demostrado la presencia de células positivas a CD44 en el cordón umbilical humano (Zhang *et al.*, 2015; Beeravolu *et al.*, 2016), la presencia de esta glicoproteína es considerada como un marcador de células troncales multipotenciales (Beeravolu *et al.*, 2016).

La marca inmunopositiva de CD44+ se observó exclusivamente en el epitelio, no hubo células inmunopositivas en la lámina propia, en el miometrio o en el perimetrio; de manera contraria, en un estudio inmunohistoquímico sobre la presencia de células CD44+ en el endometrio de conejas pseudogestantes y gestantes, Hohn y sus colaboradores (1995) describen una débil marca en células del estroma uterino en conejas gestantes y algunas células en particular mostraron una marca intensa; cuyo número se incrementó después de la implantación. Estas discrepancias pueden sugerir que la expresión diferencial de CD44 en el estroma puede estar influida por la condición fisiológica del órgano, ya sea la gestación, pseudogestación o ausencia de gestación.

La marca CD44+ fue asociada a los límites celulares, no se observó marca citoplasmática o intranuclear, esto se debe a que el CD44 forma parte de una familia de glicoproteínas transmembranales y cumple funciones como la adhesión y la migración celular (Underhill, 1992), por lo que participa activamente en la interacción célula-célula y célula-matriz extracelular (Lesley *et al.*, 1993). Estudios realizados

que evalúan su presencia en el endometrio de la coneja (Hohn *et al.*, 1995) sugieren que el CD44 puede participar en procesos similares en el endometrio.

Las células CD44+ mostraron marca en la región apical, no en las regiones laterales o basales lo que indica que sus funciones de adhesividad se establecen con el dominio extracelular y no con la membrana basal o con la matriz extracelular, particularmente con el ácido hialurónico, con esto se infiere que la actividad que realiza el CD44 detectado en este estudio, es la de interactuar con el microambiente externo y recibir estímulos de este medio, controlando así funciones biológicas de la célula, como se ha registrado en estudios en ratones knockout para el gen que codifica para CD44, donde se ven alteradas las respuestas a los cambios medioambientales y en la progresión de las enfermedades (Ponta *et al.*, 2003). Otra evidencia en la que se indica la tendencia de las células epiteliales CD44+ a interactuar con la luz uterina se ha reportado en conejas gestantes, detectando la presencia de células inmunopositivas a CD44+ en las porciones apicales de los pliegues o arborizaciones del endometrio y de manera significativamente menor en las porciones medias o basales de dichos pliegues (Hohn *et al.*, 1995). Para que un receptor de adhesión regule estos efectos, no solo se debe unir a su(s) ligando(s) extracelular(es) sino que también debe activar el citoesqueleto y coordinar los eventos de señalización para permitir que la célula responda a los cambios en el entorno (Thorne *et al.*, 2004).

En el estudio realizado por Hohn y sus colaboradores (1995) se describe la marca inmunopositiva exclusivamente en las porciones laterales de las células CD44+ y no así en la región apical o basal. Estas diferencias de expresión regional

de la glicoproteína pueden deberse al estado fisiológico del endometrio, ya que para el caso de este estudio las conejas no estaban gestantes, lo que podría sugerir una expresión diferencial de CD44 en diferentes regiones de la membrana plasmática de acuerdo a la condición fisiológica del útero, en el caso de los animales pseudogestantes y gestantes, particularmente en la gestación temprana, el periodo de periimplantación (día 6-9 de la gestación) y la implantación (día 7), teniendo como función reforzar los procesos de adhesión intercelular de las células epiteliales para culminar la implantación, por otro lado se menciona que el incremento en la expresión de CD44 pudiera ser desencadenado por la presencia del blastocisto (Hohn *et al.*, 1995).

En el presente estudio se observó la presencia de CD44 exclusivamente en el tejido epitelial de revestimiento y el glandular del endometrio tanto de las conejas prepúberes como en las adultas; pero no se observaron células CD44+ en ninguna otra capa histológica, ni tampoco en los vasos sanguíneos del endometrio o del estrato vascular del miometrio. Esto coincide con estudios previos en los que se analizó la distribución de las diferentes variantes del CD44 durante el desarrollo de distintos órganos en ratones, las variantes de CD44 se expresaban en epitelios que proliferan activamente e invaginan en sitios de interacción epitelio-mesenquimal, por ejemplo, en el diente, la nariz y el folículo piloso en desarrollo (Yu & Toole, 1997). Existen estudios en conejas gestantes y pseudogestantes en los que las células CD44+ se establecieron exclusivamente en el epitelio de conejas pseudogestantes y durante la gestación temprana (Hohn *et al.*, 1995) y no se observó el epítipo de CD44 en hembras no gestantes. Esta diferencia radical y las variaciones

mencionadas en los párrafos anteriores entre el experimento de Hohn y el actual estudio, pudieron deberse a que en este último no se conoce específicamente el epítipo o determinante antigénico detectado en particular ya que los anticuerpos policlonales (como el que se utilizó) no se fabrican de forma que detecten epítipos específicos, mientras que en el trabajo original de Hohn (1995) se utilizó un anticuerpo monoclonal específico para la isoforma estándar del CD44 de 85 a 95 kDa. Podemos establecer que la isoforma que se detectó en este estudio tiene un comportamiento distinto en su localización en la membrana plasmática, en su expresión en las distintas regiones del endometrio y en como se ve influenciada por las hormonas reproductivas, a la isoforma evaluada por Hohn.

La expresión de distintas isoformas del CD44 parece tener un rol importante en el progreso del desarrollo de tumores en ratas y humanos. El CD44 estándar y una o múltiples variantes del mismo tienden a expresarse en células cancerosas (Günthert, 1995). El receptor CD44 tiene el potencial de integrar actividades adhesivas y de señalización para modular los procesos de migración/invasión durante la progresión del cáncer. Estudios realizados en modelos de cáncer de mama determinan que la expresión elevada de CD44 en las células tumorales dentro de la circulación sistémica aumenta la eficacia de los eventos posteriores a la intravasación y la metástasis a distancia *in vivo*, asociándose con una mayor tasa de recidiva y una menor supervivencia libre de enfermedad en los pacientes (McFarlane *et al.*, 2015). Esto puede sintetizarse en que una de las funciones del CD44 es brindar una mayor capacidad metastásica a las células cancerígenas.

Esta asociación a la fisiopatología del cáncer no termina ahí, existen observaciones recientes que indican que, en varios tipos de cáncer en humanos, solo un subconjunto fenotípico de células cancerosas dentro de cada tumor es capaz de iniciar el crecimiento tumoral. Este subconjunto funcional de células cancerosas se define operativamente como "células troncales cancerígenas". Estudios realizados en cáncer de colon han permitido asociar a una variedad del CD44 como un marcador característico de estas células troncales cancerígenas (Dalerba, 2006; Todaro *et al.*, 2014).

8.2. Variaciones en la expresión de CD44 en el epitelio uterino entre animales prepúberes y adultos

En estudios realizados en humanos (Matthai *et al.*, 2006) no se pudo establecer una relación entre la expresión del marcador Oct-4, otro marcador comúnmente evaluado en los estudios de identificación de células troncales (Park & Patel, 2010) y la edad de las pacientes; del mismo modo no se establecieron diferencias entre la expresión de Oct-4 y la fase del ciclo menstrual o bien durante el desarrollo de distintas patologías de las mujeres, lo que indicaría que las células que expresan Oct-4 como marcador de pluripotencia lo hacen de manera constitutiva y en un número muy limitado de células. De manera contraria, se demostró en este experimento que en las conejas otro marcador asociado a la identificación de probables células troncales, el CD44, presentó una expresión distinta entre los animales prepúberes y adultos, de tal manera que la presencia de

hormonas esteroides de origen ovárico podrían tener una influencia en la regulación de CD44.

En las conejas prepúberes no existió una diferencia en la expresión de CD44 del epitelio de revestimiento y el glandular, sugiriendo que en ausencia de la influencia por parte de las hormonas esteroides (estrógenos y progesterona) la expresión de este marcador de multipotencia es constitutivo, mientras que en las conejas adultas (en edad reproductiva) existió un incremento significativo en la expresión de CD44 en el epitelio glandular en relación con el de revestimiento. La causa de esta expresión diferencial de CD44 no se conoce, sin embargo, se infiere que al tener las células epiteliales glandulares mayor actividad proliferativa que las células que revisten el lumen uterino (Conti, 1984), la población de células germinales que den origen a este epitelio debe ser más abundante. Estas glándulas cursan con un desarrollo prominente en las etapas proliferativas del ciclo reproductivo, volviéndose más grandes y tortuosas (Plant *et al.*, 2015). Esta inferencia concuerda con estudios realizados en monos Rhesus donde se encontró que el sistema regenerativo del endometrio se ve estimulado por el aumento de estrógeno (Padykula *et al.*, 1984), esta misma hormona en conjunto con otras, estimula al útero a desarrollarse durante la pubertad, de ahí surge la probabilidad de que exista una población de células germinales más abundante en las conejas adultas.

Cuando se comparó entre los grupos de edad la expresión del CD44 en el epitelio de revestimiento y el glandular, las conejas adultas presentaron una mayor expresión de CD44 en su epitelio de revestimiento y en el glandular en relación con

las conejas prepúberes, lo que sugiere la posibilidad de que la presencia de hormonas esteroides ováricas influye en una mayor expresión del CD44. Está documentado que la influencia del estrógeno no solo aumenta la tasa de actividad mitótica de las células del epitelio glandular, sino permite el reclutamiento de nuevas células que se hallaban en estado quiescente para que entren al ciclo celular y contribuyan al desarrollo glandular (Conti, 1984). La progesterona, por otro lado, induce una aceleración en la tasa de proliferación al acortar la longitud del ciclo celular en las células del epitelio glandular y del lumen. No se ha podido probar de manera concluyente que esta hormona no funcione también mediante el reclutamiento de células quiescentes (Conti, 1984).

A la fecha, no se tiene registro de un estudio que compare una población de animales que se encuentren en una etapa previa a la reproducción y animales sexualmente maduros para el estudio de la expresión de este tipo de marcadores, por lo que se atribuye este aumento en la expresión del CD44 en el endometrio de los individuos adultos a una población de células mesenquimales con posible actividad multipotencial que aumenta después de la pubertad, como una respuesta a la necesidad de repoblar el endometrio cíclicamente una vez que ha iniciado la actividad estral en la vida del animal. Otro factor en los resultados que apoya esta idea es la evidencia de que en los animales adultos existe una mayor abundancia en la expresión del CD44 en las células que recubren el epitelio de las glándulas endometriales, estas glándulas cursan con un desarrollo prominente en las etapas proliferativas del ciclo reproductivo, volviéndose más grandes y tortuosas (Plant *et al.*, 2015). Este hallazgo sugiere la probabilidad de la existencia de una población

de células mesenquimales con actividad multipotencial que actúen como la fuente germinativa del epitelio glandular endometrial, permitiendo su desarrollo cíclico al llegar las conejas a edad reproductiva.

Las conejas dependiendo de la raza y el tamaño de la misma tienen diferentes edades a las cuales entran en edad reproductiva, está establecido que la raza Nueva Zelanda blanca comienza a ser receptiva a partir de los 3 meses de edad y puede sostener una gestación plenamente a partir de los 4 meses (McNitt, 2013) al ser esta una raza de producción cuyo peso y talla se eleva de forma prominente en relativamente poco tiempo, podría atribuirse que la diferencia en la expresión del CD44 documentada durante la cuantificación se debe llanamente a que el útero de la coneja adulta es más grande y más desarrollado a nivel endometrial. Sin embargo, queda evidenciado que la marca positiva al CD44 presenta mucho mayor intensidad en los cortes de los individuos adultos, factor que no depende en lo absoluto del tamaño inherente de las estructuras sino de la expresión del marcador en el endometrio.

9. CONCLUSIONES

Este es el primer estudio realizado en la hembra del conejo (*Oryctolagus cuniculus*) en el que se evalúa la expresión del CD44 en el endometrio como posible indicador de una población de células con presunta actividad multipotencial. Investigaciones posteriores serán requeridas para evaluar otros marcadores más específicos de esta población celular y de ser posible aplicar técnicas más avanzadas que permitan realizar aislamiento y cultivos primarios de estas células del endometrio para evaluar que estén presentes otras características propias de las células troncales, como su capacidad para diferenciarse en líneas celulares derivadas de mesodermo. Sin embargo, la evidencia obtenida apoya la idea de que la expresión del CD44 en ciertos nichos del tejido está estrechamente relacionada con el desarrollo del endometrio y la estructuración de su arquitectura, influenciada por los cambios en las hormonas esteroideas circulantes.

Gracias a sus características de prolificidad y de facilidad de mantenimiento como animal de laboratorio, las conejas pueden emplearse en el futuro como una fuente relevante de estas presuntas células troncales endometriales, gracias al hecho de que el útero completo es fácil de recuperar incluso sin comprometer la vida de los animales. Del mismo modo, la cantidad de material biológico viable que se puede recuperar de las conejas es mucho más significativa que la que se puede obtener de otras especies de laboratorio comunes, como ratas, ratones y cuyes.

Las funciones de las células CD44+ en la fisiología reproductiva de la coneja permanecen desconocidas.

10. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<i>CA</i>	Conejas adultas
<i>CP</i>	Conejas prepúberes
<i>CTH</i>	Células Troncales Hematopoyéticas
<i>CTM</i>	Células Troncales Mesenquimales
<i>EG</i>	Epitelio glandular
<i>ER</i>	Epitelio de revestimiento
<i>kDa</i>	kiloDalton
<i>min</i>	minutos
<i>mm</i>	milímetros
<i>PAF</i>	Fenol-Alcohol-Formaldehído
<i>PBS</i>	buffer fosfato salino (Phospate Buffer Saline)
<i>SSF</i>	solución salina fisiológica

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units of evolution. *Cell*. 2000;100:157-168.
2. Till JE, McCulloch EA. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-222.
3. Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA. Somatic stem cell plasticity: Current evidence and emerging concepts. *Experiment Hematol*. 2001;10.
4. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experiment Hematol*. 1976;4(5):267-274.
5. Montesinos JJ, Flores-Figueroa E, Castillo-Medina S, Flores-Guzmán P, Hernández-Estévez E, Fajardo-Orduña G. Human mesenchymal stromal cells from adult and neonatal sources: comparative analysis of their morphology, immunophenotype, differentiation patterns and neural protein expression. *Cytotherapy*. 2009;11(2):163-76.
6. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nat*. 2010;466(7308):829-34.
7. English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunolog and Cell Biol*. 2013;91(1):19-26.
8. Shostak S. (Re)defining stem cells. *BioEssays*. 2006;28(3):301–8.
9. Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal Stromal Cells — Current Understanding and Clinical Status. *Stem Cells*. 2009;28:585-596.

10. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013;19(1):35-42.
11. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc of the Natl Acad of Sci.* 1995;92(11):4857-61.
12. Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D. In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J of Cell Sci.* 2004;117(23):5655-64.
13. Dennis JE, Charbord P. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem cells.* 2002;20(3):205-214.
14. Masuda H, Anwar SS, Bühring H-J, Rao JR, Gargett CE. A Novel Marker of Human Endometrial Mesenchymal Stem-Like Cells. *Cell Transplant.* 2012;21(10):2201-14.
15. McLennan CE, Rydell AH. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstet & Gynecol.* 1965;26(5):605-621.
16. Chan RWS, Schwab KE, Gargett CE. Clonogenicity of Human Endometrial Epithelial and Stromal Cells. *Biol of Reproduction.* 2004;70(6):1738–50.
17. Gargett, CE, Chan RW, Schwab KE. Endometrial stem cells. *Current Opinion in Obstet & Gynecol.* 2007;19(4):377-383.
18. Cervelló I, Martínez-Conejero JA, Horcajadas JA, Pellicer A, Simón C. Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell

- population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Human Reproduction*. 2007;22(1):45–51.
19. Miernik K, Karasinski J. Porcine uterus contains a population of mesenchymal stem cells. *Reproduction*. 2012;143(2):203-9.
 20. Cabezas J, Lara E, Pacha P, Rojas D, Veraguas D, Saravia F, et al. The Endometrium of Cycling Cows Contains Populations of Putative Mesenchymal Progenitor Cells. *Reproduction in Domestic Anim*. 2014;49(4):550-9.
 21. Maruyama T. Endometrial stem/progenitor cells: Endometrial stem/progenitor cells. *J of Obstetri and Gynaecol Res*. 2014;40(9):2015-22.
 22. Bodek G, Bukowska J, Wisniewska J, Ziecik AJ. Evidence for the presence of stem/progenitor cells in porcine endometrium: Stem/Progenitor Cells in Porcine Endometrium. *Mol Reproduction and Dev*. 2015;82(3):182-90.
 23. Wolff EF, Wolff AB, Du H, Taylor HS. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reproductive Sci*. 2007;14(6):524-533.
 24. Wyss P, Steiner R, Liaw LH, Wyss MT, Ghazarians A, Berns MW, Tromberg BJ, Tadir Y. Uterus and endometrium: Regeneration processes in rabbit endometrium: a photodynamic therapy model. *Hum Reproduction*. 1996;11(9):1992-1997.
 25. Kaiserman-Abramof IR, Padykula HA. Ultrastructural epithelial zonation of the primate endometrium (rhesus monkey). *Am J of Anat*. 1989;184(1):13-30.
 26. Padykula HA, Coles LG, McCracken JA, King Jr NW, Longcope C, Kaiserman-Abramof IR. A zonal pattern of cell proliferation and differentiation in the rhesus

- endometrium during the estrogen surge. *Biol of Reproduction*. 1984;31(5):1103-1118.
27. García XF. *Biología de la reproducción en la hembra de conejo doméstico*. 1ra edición. España: Universidad Politécnica de Valencia; 1991.
28. Teixeira J, Rueda BR, Pru JK. Uterine stem cells. En: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 [Consultado 24 Jul 2018]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27042/pdf/Bookshelf_NBK27042.pdf
29. Ono M, Kajitani T, Uchida H, Arase T, Oda H, Nishikawa-Uchida S, et al. OCT4 expression in human uterine myometrial stem/progenitor cells. *Hum Reproduction*. 2010;25(8):2059-67.
30. Park E, Patel AN. Changes in the expression pattern of mesenchymal and pluripotent markers in human adipose-derived stem cells. *Cell Biol Internation*. 2010;34(10):979-84.
31. De Cesaris V, Grolli S, Bresciani C, Conti V, Basini G, Parmigiani E, Bigliardi E. Isolation, proliferation and characterization of endometrial canine stem cells. *Reproduction in Domest Anim*. 2017;52(2):235-42.
32. Cabezas J, Rojas D, Navarrete F, Ortiz R, Rivera G, Saravia F, Rodriguez-Alvarez L, Castro FO. Equine mesenchymal stem cells derived from endometrial or adipose tissue share significant biological properties, but have distinctive pattern of surface markers and migration. *Theriogenology*. 2018;106:93-102.

33. Dougherty GJ. Molecular cloning of CD44R1 and CD44R2, two novel isoforms of the human CD44 lymphocyte "homing" receptor expressed by hemopoietic cells. *J of Exp Medicine*. 1991;174(1):1-5.
34. Alho AM, Underhill C. The hyaluronate receptor is preferentially expressed on proliferating epithelial cells. *The J of Cell Biol*. 1989;108(4):1557-65.
35. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J of Cell Sci*. 1992;103(2):293-298.
36. Lesley J, Hyman R, Kincade PW. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv in Immunol*. 1993;54:271-335.
37. Saegusa M, Hashimura M, Machida D, Okayasu I. Down-regulation of CD44 standard and variant isoforms during the development and progression of uterine cervical tumours. *The J of Pathol*. 1999;187(2):173-183.
38. García del Moral, R. *Laboratorio de Anatomía Patológica*. 1ra edición. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana de España; 1993.
39. Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haney AF, Greene GL, McCarty Jr KS. Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J of Clin Endocrinol & Metab*. 1988; 67:334-340.
40. Zhang YJ, Yang YX, Hu MY, Ni QK, Li HG, Miao ZC. Importance of CD44 on umbilical cord mesenchymal stem cells for expansion of hematopoietic cells. *Cell and Mol Biol*. 2015;61(2):18-25.
41. Beeravolu N, Khan I, McKee C, Dinda S, Thibodeau B, Wilson G, Perez-Cruet M, Bahado-Singh R, Chaudhry GR. Isolation and comparative analysis of

- potential stem/progenitor cells from different regions of human umbilical cord. *Stem Cell Res.* 2016;16(3):696-711.
42. Hohn H-P, Huch G, Tlolka U, Denker H-W. Differential expression of CD44 in rabbit uterine epithelium during early pregnancy. *Cells Tissues Organs.* 1995;152(3):185-194.
43. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(1):33-45.
44. Thorne RF. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J of Cell Sci.* 2003;117(3):373-80.
45. Yu Q, Toole BP. Common pattern of CD44 isoforms is expressed in morphogenetically active epithelia. *Dev Dyn.* 1997;208(1):1-10.
46. Matthai C, Horvat R, Noe M, Nagele F, Radjabi A, van Trotsenburg M, Huber J, Kolbus A. Oct-4 expression in human endometrium. *MHR: Basic Sci of Reproductive Medicine.* 2006;12(1):7-10.
47. Conti CJ, Gimenez-Cont I, Conner EA, Lehman JM, Gerschenson LE. Estrogen and progesterone regulation of proliferation, migration, and loss in different target cells of rabbit uterine epithelium. *Endocrinol.* 1984;114(2):345-351.
48. Plant TM, Zeleznik A, Knobil E. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction.* 4ta edición. Academic Press; 2015.
49. Günthert U, Stauder R, Mayer B, Terpe HJ, Finke L, Friedrichs K. Are CD44 variant isoforms involved in human tumour progression? *Cancer Surv.* 1995;24:19-42.

50. McFarlane S, Coulter JA, Tibbits P, O'Grady A, McFarlane C, Montgomery N, Hill A, McCarthy HO, Young LS, Kay EW. CD44 increases the efficiency of distant metastasis of breast cancer. *Oncotarget*. 2015;6(13):11465.
51. Dalerba P, Dylla SJ, Park I-K, Liu R, Wang X, Cho RW, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc of the Natl Acad of Sci*. 2007;104(24):10158-10163.
52. Todaro M, Gaggianesi M, Catalano V, Benfante A, Iovino F, Biffoni M, et al. CD44v6 Is a Marker of Constitutive and Reprogrammed Cancer Stem Cells Driving Colon Cancer Metastasis. *Cell Stem Cell*. 2014;14(3):342-56.
53. McNitt JI. Rabbit production. 9na edición. Wallingford, Oxfordshire ; Cambridge, MA: CABI; 2013.