



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE CÉLULAS  
TRONCALES MESENQUIMALES ALOGÉNICAS EN EL CONTROL  
DEL DOLOR, INFLAMACIÓN Y ESTRUCTURA LAMELAR EN  
LAMINITIS CRÓNICA EN EQUINOS.**

## **T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

**ALMA ANGÉLICA GARCÍA LASCURÁIN**

TUTOR: MARÍA MASRI DABA (FMVZ-UNAM)

COMITÉ TUTORAL: ANTONIO VERDUGO RODRÍGUEZ (FMVZ-UNAM)

GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA (IIB-UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO DE 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIAS

GRACIAS!!!!!! , POR TODO LO QUE HAS ENTREGADO A MI VIDA Y LO QUE VENDRÁ:

A DIOS, REY DE REYES

ISAÍAS 45:2, 3. YO IRÉ DELANTE DE TI, Y ENDEREZARÉ LOS LUGARES TORCIDOS; QUEBRANTARÉ PUERTAS DE BRONCE, Y CERROJOS DE HIERRO HARÉ PEDAZOS; Y TE DARÉ LOS TESOROS ESCONDIDOS, Y LOS SECRETOS MUY GUARDADOS , PARA QUE SEPAS QUE YO SOY JEHOVÁ, EL DIOS DE ISRAEL, QUE TE PONGO NOMBRE.

Salmo 111:10. El principio de la sabiduría es el temor de Dios.

Romanos 11:33. ¡Oh profundidad de las riquezas de la sabiduría y de la ciencia de Dios! ¡Cuán insondables son sus juicios, e inescrutables sus caminos!.

Proverbios 2:5,6. Entonces entenderás el temor de Dios, y hallarás el conocimiento del Señor. Porque Dios da la sabiduría, y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en la que me preparé en una de las profesiones más bonitas, Medicina Veterinaria y Zootecnia. Donde viví grandes años de mi vida y conocí personas maravillosas. Donde aprendí a ser Profesora, una de mis más grandes satisfacciones, transmitir conocimientos y experiencias. Gracias querida Alma Mater, Gracias a mi querida Universidad.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el financiamiento para esta investigación, Proyecto PAPIIT IN225316.

A CONACYT, por la beca otorgada para la MVZ MC Alma Angélica García Lascuráin, período 2015-2018.

A mi hija Ariadna Núñez García, a quien amo profundamente, y siempre la tengo en mi mente y mi corazón. Quien me ha enseñado mucho en mi vida.

A mi tutora María Masri Daba, a quien le estaré siempre agradecida, un pilar en la Medicina en Equinos. Con quien he vivido muchas experiencias, incluyendo los regaños y la presión. Gracias María.

A mi tutor Gabriel Gutiérrez Ospina, quien creyó en mi trabajo, gracias por tu apoyo para trabajar en el lab. que dirige (Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM), Gracias por los conocimientos y experiencias, dándome más bases de lo que es la Investigación, que me hicieron amarla más y darme una perspectiva diferente del mundo de la investigación científica.

Al Dr. Antonio Verdugo R, por permitirme participar en los Seminarios de Microbiología Molecular, los cuales, no lo niego, me costaron bastante trabajo, porque eran temas nuevos para mí, y no era mi área de conocimiento, pero fueron fundamentales en el doctorado y en la proyección de mi investigación. Gracias por

crear en sus alumnos la mente de investigadores, que siempre buscan más allá de lo observable.

A la Dra. Margarita Chavarín, Investigadora del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM (Lab. de Biología Celular y Fisiología), por su paciencia, y enseñanzas en las técnicas de laboratorio utilizadas en esta investigación. Mil gracias Margarita, siempre recordaré tan agradables momentos trabajando en el Laboratorio.

Agradezco al MVZ MC Dr. en C Ricardo Gómez, por su apoyo y enseñanzas, con los cultivos de células troncales y citometrías de flujo, en el Instituto Nacional de Rehabilitación, Luis Guillermo Ibarra, en el Lab. de Medic. Regenerativa y Regeneración tisular.

Agradezco a la MVZ MC Adriana Méndez Bernal (Depto. de Microscopía Electrónica de la FMVZ-UNAM). Por sus enseñanzas en microscopía electrónica, el manejo de las muestras y obtención de las electronfotografías que fueron claves en este trabajo. Realizadas en el Instituto Nacional de Cancerología de la SSA de la Ciudad de México.

Mi más sincero agradecimiento al MVZ MC Heriberto Caballero Ortega, Subdirector de Medicina Experimental, área de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría de la SS de México.

Agradezco al MVZ MSc CERT José Ramírez Lezama, Biol. Maribel Nieto Miranda y MVZ MC Araceli Lima Melo por su ayuda conceptual y técnica profesional, para analizar las muestras histológicas y sanguíneas, siempre infinitamente agradecida con ellos, Académicos del Depto. de Patología Clínica de la FMVZ-UNAM.

A la MVZ MC Gabriela Aranda, quien realizó su M en C a partir de este trabajo. Por

las emociones que pasamos en esta investigación que tanto disfrutamos. Cuando veíamos los avances en cada uno de los caballos y los resultados que obtuvimos, era un mundo de alegrías.

Agradezco al MVZ CERT Roberto Oropeza, por su ayuda al inicio de esta investigación. Gracias Betus por tu apoyo y hacerme más consciente de lo que implica un mal eje podo falángico.

Al MVZ MSc Abraham Pineda Aranda, MVZ Roberto Juárez Cervantes y MVZ Jennifer A. Michel Mancilla por el apoyo médico y zootécnico con los caballos donadores de médula ósea. Médicos del Hospital “Diagnóstico Integral en Medicina para Equinos” (DITEQ), dirigido por MVZ MC DR en C. María Masri Daba.

Agradezco también al MVZ Jorge Rodríguez Lezama por su apoyo técnico en los estudios de venografías de toda la investigación. Gracias Jorge.

Agradezco al MVZ León Beltrán Nava por su ayuda incondicional en el área médica y zootécnica ofrecida en los caballos de investigación. Gracias León por siempre estar presente. Por tu apoyo siempre y tu amistad.

A todos los Médicos Veterinarios y propietarios que me dejaron trabajar con sus pacientes y caballos para esta investigación: MVZ Cert. León Ramírez López, MVZ Cert. Eduardo Morones, MVZ Cert. Felipe Cortés, MVZ Cert. Mayra Moguel, MVZ Cert. Candi Santander, MVZ Rafael Pérez, MVZ Alcázar, y con mucho cariño al MVZ Alejandro Sigler Rangel, QEPD.

Gracias infinitas a Francisco Mejía Serrano, por tu enorme apoyo, paciencia y comprensión, por enseñarme sobre fortaleza y perseverancia, por estar siempre presente. Por tu enorme ayuda en todo momento y en diferentes aspectos, por tu energía para vivir, Gracias por tu tranquilidad y alegrías. Gracias por siempre.

A todos ellos, grandes profesionistas, siempre estaré eternamente agradecida, porque no solamente fueron enseñanzas y el logro de este trabajo, si no fueron experiencias diarias, alegrías, tristezas, conocimientos nuevos adquiridos, crecimiento personal, infinidad de anécdotas y una experiencia que llevaré siempre en mi corazón. DE CORAZÓN, GRACIAS INFINITAS A TODOS.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>11</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>12</b>
<b>3. ABREVIATURAS .....</b>	<b>13</b>
<b>4. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN. ....</b>	<b>19</b>
<b>6. HIPÓTESIS .....</b>	<b>19</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>20</b>
<b>8. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>20</b>
<b>9. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
Obtención de médula ósea, aislamiento de células troncales, caracterización fenotípica e infusión .....	21
Obtención de médula ósea equina y aislamiento .....	21
Procesamiento de muestras de médula ósea por gradiente de densidad.....	22
Caracterización por inmunofenotipificación de las CTM por citometría de flujo. ....	23
Características de los caballos seleccionados para el tratamiento con AMO-CTM.....	24
Evaluación de claudicación y dolor.....	24
Termografía de los cascos.....	25
Venografías.....	26
Obtención de Biopsia de tejido lamelar.....	28
Análisis histológico.....	29
Microscopía electrónica de transmisión .....	29
Administración de células troncales mesenquimales de médula ósea. ....	30
<b>10. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
Inmunofenotipificación .....	31
DOLOR Y CLAUDICACIÓN .....	32
ESCALA DE GRIMACE .....	34
TERMOGRAFÍAS .....	36
VENOGRAFÍAS.....	37
BIOPSIAS LAMELARES.....	37



Análisis histológico de cascos de caballos sanos. ....	37
Análisis Histológico de los cascos de caballos con laminitis crónica. ....	38
Análisis Histológico de los cascos de caballos con laminitis crónica tratados con CTM-AMO. .	38
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	39
<b>11.    DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
LAMINITIS CRÓNICA.....	43
DOLOR.....	44
CULTIVO CELULAR.....	48
LAMINITIS CRÓNICA A NIVEL CELULAR Y MOLECULAR .....	48
RECLUTAMIENTO CELULAR.....	49
MOVIMIENTO CTM .....	50
CÉLULAS TRONCALES.....	52
FUNCIONES DE LAS CTM.....	52
FORMAS DE ACCIÓN DE LAS CTM.....	56
CTM EN EL CORION LAMINAR DEL CASCO DE LOS CABALLOS .....	57
¿LAS CT SON INMUNO-PRIVILEGIADAS?.....	58
PRESENCIA DE CTM EN LOS TEJIDOS DEL CASCO DE LOS CABALLOS.....	62
REGENERACIÓN TISULAR.....	64
TERMOGRAFÍAS .....	66
ANGIOGÉNESIS.....	68
ESTUDIOS FUTUROS .....	70
PREGUNTAS QUE RESOLVER .....	71
<b>12.    CONCLUSIÓN .....</b>	<b>71</b>
<b>13.    REFERENCIAS.....</b>	<b>74</b>
<b>14.    ANEXOS.....</b>	<b>85</b>
<b>15.    PUBLICACIÓN .....</b>	<b>93</b>

## **LISTA DE TABLAS**

<i>Tabla 1. Caballos donadores de médula ósea de esternón para la obtención de células troncales mesenquimales.....</i>	<b>22</b>
<i>Tabla 2. Caballos con laminitis crónica, con rotación dorso-palmar de falange distal, utilizados en el estudio para administrar células troncales mesenquimales alogénicas de médula ósea.....</i>	<b>27</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

<i>Fig. 1. Porcentajes de expresión del inmunofenotipo de las poblaciones celulares de médula ósea de equino, resultados obtenidos después del cuarto pase del cultivo celular. (Tomado de la Tesis de Maestría “Evaluación de células troncales mesenquimales alogénicas en laminitis crónica con identificación de los receptores purinérgicos P2X en biopsias de tejido lamelar”, Gabriela Aranda Contreras. 2019;UNAM).....</i>	<b>32</b>
<i>Figura 2. Gráfica que muestra la evolución clínica en la escala de Obel-Glasgow que evalúa el grado de claudicación y dolor de caballos con laminitis crónica tratados con células troncales mesenquimales de médula ósea alogénicas, durante 6 meses en comparación con un caballo sano (O); Caballo control (o).....</i>	<b>33</b>
<i>Figura 3. Escala de Grimace en caballos con laminitis crónica, antes del tratamiento con células troncales mesenquimales de médula ósea (líneas continuas) y 6 meses después del tratamiento con células troncales mesenquimales de médula ósea (líneas discontinuas). .....</i>	<b>35</b>
<i>Figura 4. Gráfica que muestra los cambios en la temperatura de los cascos de los caballos con laminitis crónica tratados con células troncales mesenquimales de médula ósea a lo largo de 6 meses de tratamiento en comparación con las temperatura del casco de un caballo sano (O); Caballo control (o).....</i>	<b>36</b>
<i>Figura 5. Las venografías de caballos con laminitis crónica muestran angiogénesis y regeneración laminar después de haber sido tratado con CTM-AMO. ....</i>	<b>42</b>

## **ANEXOS**

<b>ANEXO 1: TOMADA Y MODIFICADA DE: Driessen B, Bauquier SH, Zarucco L. Neuropathic Pain Management in Chronic Laminitis. Vet Clin of North America Equine Practice 2010;26:315-33.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO 2: Técnica de venografía. A. se muestra la colocación de la mariposa y la posición de las pinzas al ser inyectado el medio de contraste para realizar la venografía. B. Venografía latero-lateral de caballo con laminitis crónica antes de la aplicación del tratamiento con CTM. C. Venografía latero-lateral de caballo sano. D. Venografía dorso-palmar de caballo sano.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO 3: Técnica de biopsia lamelar. A. Perforación de la muralla del casco mediante un dremel. B. Perforación de la muralla del casco hasta llegar a corion laminar. C. Obtención de tejido laminar por medio del escariador de Frahm. D. Tejido laminar obtenido por medio de biopsia laminar. E. Tejido laminar congelado y embebido en Tissue Teck®. ....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO 4: A. Obtención de médula ósea de esternón de caballo. B. Médula ósea de esternón de caballo con Ficoll paque antes de ser centrifugada por gradiente de densidad.....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 5. Procesamiento de médula ósea para obtención de células mononucleares. B: Aplicación de CTM por perfusión regional intravenosa al casco. ....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO 6. SIGNOS HISTOLÓGICOS DE LAMINITIS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO 7.....</b>	<b>90</b>
<b>Electrofotografía de tejido laminar de un casco sano. ....</b>	<b>90</b>

## **1. RESUMEN**

La laminitis crónica es una enfermedad incapacitante que afecta el corion laminar en los cascos de los caballos. Se origina posterior a diversas enfermedades primarias sistémicas. Se ha propuesto que el evento fisiopatológico crítico que ocasiona la laminitis es la pérdida de células troncales mesenquimales en el casco. Esta pérdida celular provoca que el corion laminar pierda su habilidad de regeneración. Aunque hay trabajos previos que ofrecen credibilidad a este concepto, aún quedan problemas sin resolver y que deben ser dirigidos antes de aceptar esto como un hecho bien fundamentado. En este trabajo, reevaluamos el principio central del modelo fisiopatológico de laminitis al administrar células troncales mesenquimales alogénicas de médula ósea (CTM-AMO), a través de la vena digital palmar, en cascos de caballos afectados con laminitis crónica. Los caballos fueron evaluados durante 6 meses, utilizando la escala modificada de claudicación para laminitis Obel-Glasgow y termografía de cascos, mensualmente. Se realizaron venografías y biopsias lamelares al principio y al final del período de estudio, para reunir evidencias de la remodelación vascular y regeneración del corion laminar. Nuestros resultados mostraron que la administración de las CTM-AMO promueven la remodelación vascular y regeneración del corion laminar, reforzando la teoría que la pérdida de células troncales es el evento crítico que causa la laminitis. Este trabajo también demostró que la administración de CTM-AMO es segura, ya que los caballos que fueron tratados no desarrollaron reacciones locales o sistémicas, o manifestaciones clínicas negativas debido a reacciones de rechazo, al menos durante el período de 6 meses en los que se realizó el seguimiento y bajo las condiciones del esquema terapéutico propuesto.

### **PALABRAS CLAVE:**

Laminitis, células troncales mesenquimales, inflamación, dolor, analgesia, regeneración tisular, angiogénesis.

## **2. ABSTRACT**

Chronic laminitis is a disabling disease that affects the laminar chorion in horse's hooves. It originates after various primary systemic diseases. The critical pathophysiological event causing laminitis has been proposed to be the loss of mesenchymal stem cells in the hoof. This cell loss causes the laminar chorion to lose its ability to regenerate. Although there is previous work that offers credibility to this concept, there are still unsolved problems that must be addressed before accepting this as a well-founded fact. In this work, we re-evaluate the central principle of the pathophysiological model of laminitis by administering allogeneic mesenchymal stem cells from bone marrow (CTM-AMO), through the palmar digital vein, in hooves of horses affected with chronic laminitis. The horses were evaluated for 6 months, using the modified Obel-Glasgow laminitis claudication scale and hoof thermography, monthly. Lamellar biopsies and venographies were performed at the beginning and at the end of the study, to gather evidence of vascular remodeling and regeneration of the lamellar chorion. Our results showed that the administration of CTM-AMO promotes vascular remodeling and regeneration of the laminar chorion, reinforcing the theory that the loss of stem cells is the critical event that causes laminitis. This work also demonstrated that the administration of CTM-AMO is safe, since the horses that were treated did not develop local or systemic reactions, or negative clinical manifestations due to rejection reactions, at least during the 6-month period in which they were carried out the follow-up and under the conditions of the proposed therapeutic scheme.

### **KEY WORDS:**

Laminitis, mesenchymal stem cells, inflammation, pain, analgesia, Tissue regeneration, angiogenesis.

### **3. ABREVIATURAS**

CTM-AMO: Células troncales mesenquimales alogénicas derivadas de médula ósea.

aCTM: Células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

MMP: Metaloproteasas de matriz

CT: Células troncales

CTM: Células troncales mesenquimales

PRP: Plasma Rico en Plaquetas.

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

IGF: factor de crecimiento parecido a la insulina

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

TGF $\beta$ : Factor de crecimiento transformante Beta

IL1 $\beta$ : Interleucina 1 beta

IL6: Interleucina 6

IL8: Interleucina 8

FNT $\alpha$ : Factor de necrosis Tumoral alfa

IFN $\gamma$ : Interferón gamma

IHQ: Inmunohistoquímica

#### **4. INTRODUCCIÓN**

La laminitis es una de las condiciones podales más severas e incapacitantes en los caballos, tanto en la presentación aguda como en la crónica. En el mundo, la incidencia de la enfermedad se encuentra entre 7 y 14% (Leechi y cols 2017). Aristóteles en el año 350 AC, ya la describía por la relación entre laminitis y el consumo excesivo de cebada (Yang y López, 2019). La laminitis se desarrolla de forma secundaria a sepsis o endotoxemia, como consecuencia de enfermedades digestivas, respiratorias, urinarias o del tracto reproductivo, problemas endócrinos como disfunción de la *Pars intermedia* de la pituitaria y Síndrome metabólico equino. También se presenta en pacientes con lesiones ortopédicas que afectan uno o más miembros, apoyando mayor peso en uno de los miembros sanos, el cual será afectado por laminitis.

Anatómicamente, la falange distal está unida a la muralla interna del casco por un aparato suspensor fuerte y flexible: el corion laminar, por su forma característica de láminas dobladas, aumenta la superficie de unión del aparato suspensor. Leise en 2018, describe el aparato suspensor del casco del caballo como una “pieza de arte arquitectónica que ha evolucionado para soportar el peso, permitir el movimiento de los équidos y poder viajar a grandes velocidades en diferentes superficies” (Leise 2018).

La inflamación severa e isquemia del tejido laminar conlleva a la separación de la falange distal a la muralla del casco. Histológicamente está caracterizada por la lisis de la membrana basal lamelar, pérdida en el número de hemidesmosomas y por lo tanto pérdida de su unión a la célula epidermal basal (Visser y Pollitt 2011).

En la fase aguda, se presenta destrucción de la membrana basal de las láminas dérmicas y epidérmicas secundarias dentro del casco, y como consecuencia, el peso del caballo, así como las fuerzas de locomoción, provocan que la falange distal se pueda rotar distalmente dentro del casco, comprimiendo y dañando arterias y venas, lesionando el corion solar y coronario, este último debido a la rotación distal de la falange que estira ventralmente venas y arterias de este corion; asimismo puede presentarse hundimiento palmar de la falange distal (Pollit, 1999; Visser y

Pollitt 2011). Los signos de enfermedad son: dolor de diferentes grados, claudicación característica, aumento de la temperatura de los cascos, pulso digital positivo, postración, y en la fase crónica: crecimiento excesivo de la pared dorsal del casco, formación de surcos en la muralla del casco, puede presentarse perforación de la suela, exposición de la falange y osteomielitis (Lecchi y cols. 2017). El diagnóstico de laminitis se basa en la historia médica, signología, complementada por radiografías y venografías.

La laminitis se clasifica en 3 fases: fase en desarrollo, fase aguda y fase crónica; esta última puede ser dividida de tres formas teniendo en cuenta el cuadro clínico, hallazgos radiográficos y el tiempo de evolución: laminitis crónica inicial, laminitis crónica activa y laminitis crónica estable (O'Grady 2013; Faleiros y cols. 2017; Leise et al. 2018).

La cascada de eventos celulares en la fisiopatología de laminitis ha sido ampliamente descrita por Pollitt desde 1999, basado en un esquema de 3 fases, empezando con la fase en desarrollo. Esta fase, tiene una duración aproximada de ocho a doce horas, existiendo desde este momento destrucción y separación del tejido laminar sin que haya dolor, en esta etapa se presenta infiltración de células mononucleares (Leise y cols. 2018). En el curso de las siguientes horas, las células mononucleares liberan quimiocinas y citocinas inflamatorias (IL1 $\beta$ , IL6, IL8, FNT $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) aumentando la inflamación local, así como metaloproteasas (MMP9, MMP13) que degradan la membrana basal y la matriz extra celular. En laminitis crónica, además de las anteriores, se encuentra elevada en el plasma IGA (quizá por sus propiedades anti-inflamatorias), así también existe aumento de la proteína anti inflamatoria APOA-IV (Apolipoproteína A), como un mecanismo del sistema inmune para compensar la inflamación en caballos con laminitis crónica (Steelman y cols. 2013, Angelone y cols. 2017, Belknap y cols. 2017, Faleiros y cols. 2017, Leise y cols. 2018). Ya que los neutrófilos son las primeras células en responder a daño o infección, se especula que su presencia en laminitis crónica es la respuesta del daño mecánico que se presenta diariamente al estar apoyando. Se aumenta P13, el cual es un inhibidor de proteasas que protege contra el daño tisular excesivo causado



por la degranulación de neutrófilos, esta molécula es producida como respuesta a inflamación y es quimiotáctica para diferentes tipos de células inmunes. La expresión de este péptido puede ser la unión entre el daño mecánico al tejido laminar por la inestabilidad del pie y la inflamación crónica característica de esta enfermedad. La sobre expresión de MMP13, una enzima colagenasa, puede promover la inestabilidad del pie al degradar la colágena laminar. Se activa la producción de Especies reactivas de oxígeno; el aumento de superóxido dismutasa 2 (SOD2) (enzima anti oxidante) sugiere la presencia de daño oxidativo, posiblemente del estallido respiratorio en neutrófilos, causando daño endotelial, isquemia y daño laminar (Steelman y cols. 2013, Leise 2018).

La expresión de IL1 $\beta$  en las láminas dérmicas alrededor de los capilares, puede desencadenar la adhesión leucocitaria por la sobre regulación de moléculas de adhesión como E-selectina e ICAM-I (Leise 2018).

Las láminas primarias y secundarias se separan, comprometiendo el aparato suspensor de la falange distal, iniciando la fase aguda de la enfermedad. Así como el corion laminar se degrada progresivamente, así la falange distal se separa de la pared del casco, causando su rotación y hundimiento distal impactando al casco. La fase aguda tiene una duración de 24 a 48 horas. A las 12 horas de iniciada la laminitis se presentan cambios en la colágena lamelar tipo IV y laminina 332 (Ln332). La membrana basal está compuesta de capas delgadas de proteínas que separan el epitelio, endotelio, nervios y músculos de la matriz extracelular. Sus funciones son proveer una barrera, funciones estructurales, así como regular actividades celulares como crecimiento y migración. Están compuestas de lamininas, proteoglicanos y colágenas. La membrana basal durante la laminitis se empieza a lisar en la base de las láminas secundarias epidérmicas y posteriormente todo alrededor de la lámina (Visser y Pollitt 2011).

Existe afección neuro-vascular, ya que la falange distal que se rota comprime arterias, venas y nervios y presiona el corion de la suela y la corona. Esta etapa se caracteriza por diferentes magnitudes de dolor y claudicación, junto con aumento en la temperatura de los cascos y pulso digital. A las 48 horas inicia la tercera fase

que es la crónica. Puede durar semanas a años. Esta fase, fluctúa en la presencia y ausencia de signos. Los signos pueden ser dolor, que varía de ligero a severo, diferentes grados de claudicación, recumbencia, sobre crecimiento de la muralla del casco, formación de surcos en la muralla desde la banda coronaria hacia distal, perforación de suela y osteomielitis. Sin importar qué es lo que dispara la laminitis, a nivel celular y subcelular, inicia con infiltración de células mononucleares y liberación de metaloproteasas, destrucción del corion laminar y vasculatura (Angelone y cols, 2017). La degradación de la matriz extracelular y membrana basal, causan la separación del epitelio, incluyendo la pérdida de células troncales y pérdida de hemidesmosomas. Como consecuencia, la forma de las láminas epidérmicas secundarias cambia, la fuerza de unión entre el dígito distal y la muralla del casco se debilita; a mayor inflamación, mayor el debilitamiento. El elemento esencial en este modelo es la inflamación innata (Leise y cols. 2018). Por lo tanto, los mecanismos que disminuyen la regulación de la respuesta inmune innata del casco pueden estar disminuidos durante la laminitis.

Las células troncales son parte central en este argumento, ya que mantienen el control de la homeostasis del tejido laminar, remodelando y reparando el tejido dañado (Carter y cols. 2011), así como disminuyendo las respuestas inflamatorias locales. Actualmente se sabe que las células troncales promueven la regeneración del tejido, no sólo secretando factores de crecimiento (Salem and Thiemermann 2010; Keating y cols. 2012; Ma y cols. 2014; Hongwei y cols. 2015), pero también liberando citocinas antiinflamatorias (Ghannam y cols. 2010; Keating y cols. 2012; Cassano y cols. 2015; Angelone y cols. 2017) en respuesta a  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ , radicales libres, quimiocinas y leucotrienos (Ma y cols. 2014), mediadores anti fibrinolíticos y mediadores angiogénicos. Las células troncales, también tienen efectos antioxidantes protegiendo contra daño de hipoxia/reperfusión, preservando la integridad endotelial y promoviendo la angiogénesis (Angelone y cols. 2017).

Angelone y cols. (2017), evaluaron si la pérdida de células troncales mesenquimales era una parte fundamental del mecanismo fisiopatológico que conduce a laminitis crónica. Sus resultados respondieron su pregunta parcialmente.

Desafortunadamente, ellos no pudieron asegurar la mejora clínica y la evidencia venográfica de la angiogénesis que observaron en los caballos tratados con infusión de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo, ya que éstas fueron administradas junto con plasma rico en plaquetas, confundiendo sus resultados.

Las CT son definidas por los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular como células indiferenciadas, capaces de dividirse indefinidamente y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas. Deben adherirse al plástico, expresar marcadores de pluripotencia como CD105, CD73, CD90, en caballos también CD28, CD44 y no expresar marcadores hematopoyéticos como CD11, CD14 (monocitos); CD31, CD34; CD43, CD45 (leucocitos); CD19, CD79a (Linfocitos B), ni MHC II. Además, deben tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Ranera y cols. 2011).

La propuesta de este trabajo es probar la restauración en cascos de caballos con laminitis crónica, tratados con células troncales mesenquimales y su asociación con: 1) la disminución del estado inflamatorio, 2) restauración de la citoarquitectura del tejido laminar, y 3) mejora en la condición clínica. Este trabajo provee evidencia que soporta el concepto que la pérdida de células troncales promueve el estado inflamatorio en laminitis crónica formando parte importante del desarrollo de esta enfermedad y que su restitución, revierte este efecto inflamatorio, disminuye el dolor, disminuye claudicación, provoca regeneración tisular, así como angiogénesis, y por lo tanto una mejor calidad de vida en estos pacientes, sin necesidad de tener que seguir sacrificando caballos como consecuencia de esta enfermedad.

## **5. JUSTIFICACIÓN.**

Debido al avance en las investigaciones con células troncales mesenquimales (CTM) en medicina humana y veterinaria, resulta necesario incrementar el conocimiento de su uso y aplicaciones en el área de medicina en equinos; principalmente dirigido hacia los problemas musculo-esqueléticos y metabólicos; entre los que se encuentra la laminitis (Borjesson y cols. 2011, Mundra y cols. 2013, Schnabel y cols. 2013, López y cols. 2014).

Este proyecto tiene el objetivo de mostrar el efecto terapéutico de las CTM de médula ósea alogénicas para controlar el dolor, la inflamación y regenerar tejido laminar en caballos afectados con laminitis crónica.

## **6. HIPÓTESIS**

Las células troncales mesenquimales de médula ósea alogénicas, administradas en caballos con laminitis crónica por medio de perfusión regional intravenosa, son capaces de controlar el dolor, la inflamación y regenerar el tejido laminar.

## **7. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto terapéutico de células troncales mesenquimales alogénicas de médula ósea, administradas por perfusión regional endovenosa al pie del caballo para controlar el dolor, la inflamación y regenerar el tejido laminar lesionado en casos con laminitis crónica.

## **8. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Obtener CTM a partir de médula ósea de esternón de caballos sanos, caracterizarlas, y expandirlas.
2. Seleccionar caballos con laminitis crónica, evaluar escala de Obel-Glasgow, escala de Grimace, actitud y comportamiento, evaluar la temperatura de los cascos por medio de termografías, perfusión vascular en el pie de los caballos, usando venografías, realizar biopsias de tejido laminar de uno de los cascos, para su estudio histopatológico y ultraestructural.
3. Aplicar por medio de perfusión regional intravenosa las CTM en ambos miembros torácicos de los caballos en estudio, en el caballo control aplicar el medio en el que se entregan las células al salir de laboratorio, aplicando en 3 ocasiones con un mes de diferencia.
4. Evaluar cada mes, actitud, comportamiento, escala de Obel-Glasgow y escala de Grimace, y evaluar la temperatura de cascos.
4. A los 6 meses posteriores, evaluar además, perfusión vascular y realizar estudios histopatológicos y ultraestructurales del tejido laminar del casco de los caballos tratados.

## **9. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Obtención de médula ósea, aislamiento de células troncales, caracterización fenotípica e infusión**

#### **Obtención de médula ósea equina y aislamiento**

Se obtuvieron aspirados de médula ósea de esternón de caballos, clínicamente sanos (15 ml, utilizando jeringas de 20 ml con 1000 UI heparina / ml MO), con un rango de edad de 3 a 8 años, machos y hembras de diferentes razas (Tabla 1). Los caballos fueron sedados con hidroclicloruro de xilacina al 10% (1.1 mg/kg peso vivo); se rasura el área ventral del esternón y embroca quirúrgicamente, 3 ml de anestésico local fueron administrados de forma subcutánea (lidocaína 2%) (Pisacaína™, laboratorios Pisa); se realiza una incisión en piel hasta músculo, de 5 mm de longitud con una navaja de bisturí del número 15, se introduce una aguja de aspirado de médula ósea (Rosenthal, Kendall™, Texas, EUA) hasta sentir hueso y por medio de movimientos rotatorios, se introduce en el hueso, se aspira la médula ósea por medio de una jeringa de 20 ml con heparina a una concentración de 1000 UI por ml de médula ósea, para poder cultivar y expandir las células (Kasashima y cols. 2011). Se saca la aguja, y se homogeniza suavemente con la heparina. Se mantiene a 4°C para transportarse al laboratorio en condiciones asépticas.

<b>Caballo</b>	<b>Raza</b>	<b>Sexo</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Fin Zoot</b>	<b>Peso (kg)</b>	<b>Color</b>
Caballo	Pura sangre	Macho entero	2	Carrera	450	Alazán
Pony	Criollo	Macho castrado	8	Pony	350	Bayo
Yegua	Pura sangre	Hembra	3	Carrera	380	Colorada
Pony	Criollo	Macho castrado	10	Pony	400	Tordillo
Caballo	Criollo	Macho castrado	11	Pony	435	Alazán
Caballo	Pura sangre	Macho castrado	4	Pony	410	Colorado
Caballo	Pura sangre	Macho entero	2	Carrera	450	Colorado
Caballo	Pura sangre	Hembra	2	Carrera	450	Colorado
Caballo	Pura sangre	Macho entero	3	Carrera	480	Colorado

**Tabla 1. Caballos donadores de médula ósea de esternón para la obtención de células troncales mesenquimales.**

### **Procesamiento de muestras de médula ósea por gradiente de densidad.**

El procedimiento se debe realizar de manera estéril dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA).

La MO se transfiere de forma cuidadosa a tubos estériles de polipropileno de 50 ml, con Ficoll Paque™ (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) en proporción 1:2. Se centrifugan a 400 g por 30 minutos para separar la fracción mononuclear en un tubo estéril a 4°C. Posteriormente, se centrifuga a 300 g por 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se pueden observar 4 fracciones; en el fondo del tubo quedan los eritrocitos, la siguiente fracción es el Ficoll Paque, sigue la capa de células linfoides y el sobrenadante que consiste en un poco de suero con PBS. Se descarta el sobrenadante para recuperar las células que quedan en la interface linfoide, utilizando una micropipeta de 1000 µl; las células se re suspenden y se siembran, a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, en frascos de 25 cm<sup>3</sup> (Becton Dickinson, EUA) con DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (1:1) (Invitrogen Co. Gibco, NY, EUA), suplementado con suero fetal bovino, 500 U/ml de penicilina, 50 µg/mL de estreptomycin y 2.5 µg/mL de anfotericina B. Las células se incuban a 37°C y

5% CO<sub>2</sub> . El medio se cambia cada tercer día al alcanzar 80% de confluencia (Barberini y cols. 2014). Al alcanzar el 80% de confluencia se subcultivan levantándolas del frasco de cultivo con solución HBSS (Hanks' balanced salt solution, Gibco™) con 7.5 mg de tripsina porcina y 0.6 mg de EDTA y se siembran a una densidad de 5x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> en frascos de 75 cm<sup>3</sup> . Las células troncales mesenquimales se subcultivan nuevamente en frascos de 175 cm<sup>3</sup> con medio DMEM F12 (1:1) suplementado con suero fetal bovino, después de haber evaluado su viabilidad con azul de tripano con una cámara de Neubauer.

### **Caracterización por inmunofenotipificación de las CTM por citometría de flujo.**

Una muestra de 100 000 células, se re suspendió en 200 µl de PBS y se añaden 10 µl de los anticuerpos monoclonales contra antígenos de superficie: CD34, CD45, CD47, CD14, CD117, CD105, CD73, CD90, CD29, CD44 (BD Pharmingen™ [wwwbdbiosciences.com](http://wwwbdbiosciences.com)). Las muestras se incuban por 15 min a 4°C. Posteriormente se centrifugan para eliminar el exceso de anticuerpo durante 10 min a 300 g. Se re suspenden en solución salina a pH 7.4. Finalmente se procede al análisis utilizando el software de FACS Calibur del citómetro.

Los datos se analizaron con el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson), La emisión de fluoresceína (FITC) se midió en FL1, PE en FL2, APC en FL3, y 7-AAD en FL4. Se cuantifico el valor promedio de eventos a una longitud de emisión 88 nm. Este método analiza una región de la muestra (R1) representada por las células CD34+ seguida por las células CD90+ de la misma región (R2).

Los valores obtenidos de la inmunofenotipificación forman parte de la tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y la Salud Animal de la MVZ Gabriela Aranda Contreras ([https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB\\_UNAM/TES01000784551](https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000784551)).



## **Características de los caballos seleccionados para el tratamiento con AMO-CTM**

El caballo que se seleccionó como control, fue un macho castrado, de 8 años de edad, de 440 kg, su función zootécnica antes de presentar laminitis era caballo policía, presentaba laminitis crónica desde 2 años atrás, la causa fue el exceso de trabajo en piso duro, presentaba rotación de falange distal, y no estaba hundido, no tenía ningún tratamiento médico. A este caballo se le aplicó el medio, sin células, en el que se suspenden las células al salir de laboratorio. Los caballos con laminitis crónica de esta investigación, se muestran en la tabla 2. Todos los animales presentaban rotación de falange distal, sin presentar hundimiento palmar de la misma. Ninguno se encontraba en medicación o tratamiento. Se realizaron hemogramas al inicio del estudio para evaluar el estado de salud de cada individuo. Los caballos fueron estudiados y tratados en sus propias caballerizas. Tuvieron acceso libre al agua y fueron alimentados con paja de avena 2 veces al día. Se obtuvieron consentimientos firmados de cada uno de los propietarios. Los procedimientos clínicos, de manejo y experimentales fueron aprobados por el SICUAE (Comité para el Cuidado de los Animales de Experimentación) Universidad Nacional Autónoma de México (No. MC-2016/2-5; "Evaluación terapéutica del uso de células troncales mesenquimales alogénicas, en el control del dolor, inflamación y estructura laminar en caballos con laminitis crónica").

Cada animal fue sometido a una evaluación clínica antes, durante y después del tratamiento terapéutico que incluye: evaluación clínica con las escalas de Obel-Glasgow, y la escala de Grimace, termografías de los cascos, venografías de cascos y biopsias de tejido lamelar antes y después de 6 meses de la perfusión de CTM-AMO para su análisis histológico.

### **Evaluación de claudicación y dolor**

Se realizó un examen de claudicación en estática y en dinámica en cada caballo. Usamos la Escala multifactorial modificada de evaluación de dolor adaptada para

caballos con laminitis, que evalúa signos de dolor y comportamiento, al combinar los criterios de Obel y Glasgow (Dutton y cols. 2009; Driessen y cols. 2010). La máxima puntuación posible es 14, el cero corresponde a que no hay claudicación y a mayor puntuación es mayor el dolor.

Se usó en complemento, la escala de Grimace, la cual evalúa el dolor que se presenta en diferentes situaciones, a través de expresiones faciales en respuesta al grado de dolor que tienen los pacientes en una enfermedad como laminitis (Dalla Costa y cols. 2016).

Se realizaron pruebas pareadas de t de Student de una cola con una  $p=0.05$

Se realizó una prueba para cada una de las facciones de la cara que se toman en cuenta para la escala de Grimace, tomadas antes del tratamiento, mensualmente y después del tratamiento a los 6 meses.

### **Termografía de los cascos**

La inflamación del tejido laminar causa un aumento en la temperatura de los cascos (Douthit y cols. 2014). La termografía infrarroja puede ser usada para estimar el cambio de temperaturas al tener imágenes termográficas de los cascos. Para realizar las termografías tomamos en cuenta diversos factores: se realizan por la mañana a las 8 am, sin que el caballo haya salido de su caballeriza. Se realizan en la sombra, no se hacen a la luz del sol. Con los cascos secos y limpios. Las tomas se realizaron a 30 cm de distancia del casco, tanto laterales como dorsales. Se obtuvieron imágenes basadas en un código de color, en una escala linear calibrada propia de la cámara. Las termografías se realizaron con una cámara de termografía FLIR™ serie XX5 (Flir™, USA). Se tomaron imágenes de los cascos de miembros torácicos cada mes, durante 6 meses. Las mediciones fueron en la banda coronaria del casco. Decidimos usar la banda coronaria como referencia anatómica para medir la temperatura, ya que carece de la cobertura de la muralla del casco. Haciendo esta región sensible para obtener temperaturas reales; además de que la muralla del casco en caballos con laminitis crónica, se deforma en gran medida, lo que puede causar la obtención de mediciones de temperatura incorrectas.

## **Venografías**

La técnica de venografía en los cascos de los caballos con laminitis es útil en la detección de la presencia o ausencia de irrigación interna.

El protocolo para este procedimiento consiste en sedar al caballo con hidrocloreuro de xilacina al 10% (Procin Equus®, Pisa Farmacéutica, México) (1.1 mg/kg IV). Se realiza un bloqueo local del nervio digital palmar en su rama lateral y medial a nivel de sesamoides proximales, aplicando 3 ml de lidocaína 2% (Pisacaína 2%® PiSA Farmacéutica) medial y lateral. Se realiza lavado quirúrgico de la zona, y se coloca el torniquete usando una venda de Esmarch a nivel del menudillo. Se usa un catéter de mariposa del 23G en la vena digital lateral y en cuanto la sangre se observa en el catéter, el asistente coloca la jeringa del medio de contraste en la extensión, usamos Iopamidol (15 ml por casco) (Scanlux, San Chemia, México), se inyecta suavemente. Para asegurar una distribución adecuada del Iopamidol en todo el lecho vascular del dígito del caballo, los carpos se flexionan dorsalmente y los talones se levantan. De esta forma se ha observado que el medio se distribuye completamente en el pie del caballo, mejorando el diagnóstico, ya que de lo contrario, al no levantar carpos y talones la distribución del medio de contraste no se lleva a cabo en la región de la suela y talones, dando falsos negativos. Al finalizar la administración del medio de contraste, se pone la pinza de hemostato en la extensión y el pie se apoya totalmente. Se realizan tomas latero-mediales y dorso palmares durante los primeros 60 segundos después de la administración del medio de contraste (Rucker y cols. 2006).

No.	Raza	Sexo	Edad	Actividad	Causa de Laminitis	Tiempo con laminitis (meses)	Pronostico	Peso Inicial (kg)	Peso final (kg)	Obel-Glasgow Inicial	Obel-Glasgow final	Herraje
1	Cuarto de milla	Hembra	7	Charrería	Cólico	13	Malo	480	408	4	1	Ortopédico
2	Appendix	Hembra	12	Policía	Aborto	+24	Malo	430	450	13	4	Ninguno
3	Thoroughbred	Macho	8	Salto	Dieta	1	Malo	450	465	2	1	Ortopédico
4	Cuarto de milla	Macho castrado	3	Mascota	Recorte	12	Malo	320	360	7	2	Ninguno
5	Cuarto de milla	Macho	14	Charrería	Cólico	24	Malo	360	370	13	2	Ortopédico
6	Cuarto de milla	Hembra	19	Policía	Retención placenta	+24	Malo	460	470	12	4	Ninguno
7	Thoroughbre	Hembra	5	Carreras	Desconocido	12	Malo	496	490	11	4	Ortopédico
8	Cuarto de milla	Macho castrado	16	Charrería	Cambio dieta	+24	Malo	365	330	13	8	Estándar
9	Santa Gertrudis	Hembra	8	Militar	Desplazamiento colon	2	Malo	455	460	2	0	Ninguno
10	Thoroughbre	Macho	3	Carreras	Ejercicio	4	Malo	400	470	4	0	Ortopédico

**Tabla 2. Caballos con laminitis crónica, con rotación dorso-palmar de falange distal, utilizados en el estudio para administrar células troncales mesenquimales alogénicas de médula ósea.**

### **Obtención de Biopsia de tejido lamelar**

Se obtiene tejido lamelar antes y al finalizar el tratamiento con CTM. El procedimiento consiste en sedar el caballo con hidrocloreuro de xilacina 10% (Procin Equus®, Pisa Farmacéutica, México) (1.1 mg/Kg. IV), realizar un bloqueo abaxial lateral y medial del nervio digital palmar, administrando 4 ml de lidocaína 2% (Pisacaína 2%® PiSA Farmacéutica). Se coloca un torniquete en la región del menudillo usando una venda de Esmarch para disminuir el sangrado.

Se realiza una perforación en la muralla dorsal del casco, 2 cm distal de la banda coronaria usando un taladro con una piedra de pulir de 4.8 mm de diámetro (Dremel®, Bosch, EUA), se hace una perforación de 9.0 mm de diámetro, que se profundiza hasta al estrato externo y el estrato medio de la muralla sin causar lesión, llegando a la línea blanca, la cual indica proximidad al corion laminar. Durante el procedimiento se irriga con solución salina fisiológica 0.9% (SSF) evitando así una lesión por el calor del taladro en el tejido laminar. Se realiza de nuevo un lavado quirúrgico y se seca con gasa estéril, se incide el tejido laminar siguiendo el borde de la perforación en la muralla con una hoja de bisturí del número 11, que se introduce perpendicularmente a la muralla del casco y se avanza hasta sentir la parte dorsal de la falange distal. Se introduce un escariador de Frahm del número 2, hasta la falange distal, para desprender el tejido laminar de la falange, y utilizando unos fórceps de disección se saca la biopsia, midiendo aproximadamente 7mm en la base y 7 mm de altura, la cual se coloca en paraformaldehído bufferado al 4%, durante 24 horas. Posteriormente se cambia a solución bufferada de sacarosa 15% por 24 horas, y finalmente en sacarosa al 30%, mantenidos a 4°C hasta su uso. El sitio de la biopsia se seca con gasas, se sella con monómero y resina de metilmetacrilato (Nic Tone®, Manufacturera Dental Continental, México). Una vez que éste seca, se retira el torniquete, y se venda el casco del caballo (Gravena y cols. 2012).

### **Análisis histológico**

Las biopsias de tejido lamelar obtenidas del casco, se colocan en paraformaldehído bufferado al 4% y se guardan en refrigeración durante 24 horas. Posteriormente son cambiadas a una solución de sacarosa al 15% durante 24 a 48 horas, manteniéndolas en refrigeración. Por último se cambian a una solución de sacarosa al 30%, en la cual se pueden mantener en refrigeración hasta el momento de procesarlas.

El tejido es embebido en Tissue-Tek (Neg-50™, Richard-Allan Scientific, USA), se congela en hielo seco, y se corta longitudinalmente (30µm de grosor) en criostato a -25°C. Los cortes en series se montan en las laminillas previamente preparadas con gelatina y mantenidas a -4°C. Se obtuvieron 15 laminillas por muestra. Una laminilla cada tercera, para hacerlo al azar, fue seleccionada para teñirse con Violeta de Cresilo (el cual se usa principalmente para la tinción nuclear); ácido peryódico de Schiff (utilizado para la identificación de componentes celulares que contienen hidratos de carbono como son las membranas celulares, tejido conectivo y membrana basal), y Tricrómica de Masson (útil para visualizar fibras de colágena tipo I). Se hicieron preparaciones permanentes cubriéndolas con Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific). El análisis de la integridad citológica y grado de infiltración inflamatoria se realizó bajo los criterios descrito por Gravena y cols. (2012), utilizando un microscopio Olympus BX51-W y en el mismo se obtuvieron fotografías digitales utilizando el Software Stereo Investigator® del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM).

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Muestras de tejido laminar de un caballo sano y uno con laminitis crónica se fijaron en una solución buffer que contenía paraformaldehído 4% / glutaraldehído 2.5% (Electron Microscopy Sciences) durante 72 horas. Posteriormente se realizan 3 lavados con salina tamponada fosfatada (0.1M; pH 7.2), las muestras fueron post fijadas con tetraóxido de osmio (1%) por una hora, se deshidrataron y embebieron

en Epon 812 (Electron Microscopy Sciences). Se polimerizaron a 60°C por 24 horas. Se montaron secciones semi delgadas (150 nm) en portaobjetos para teñirse con azul de toluidina, el área de interés seleccionada se cortó en secciones ultra delgadas (70 nm) y montadas en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo 2% y citrato de plomo 50% (Electron Microscopy Sciences), se observaron en un microscopio de Transmisión Electrónica Jeol 1010 (60kV) del Instituto Nacional de Cancerología. Se evaluó la integridad ultraestructural y el grado de infiltración inflamatoria, se obtuvieron electro-fotografías representativas (Cheville y Stasko, 2014).

### **Administración de células troncales mesenquimales de médula ósea.**

Los caballos fueron sedados con hidrocloreuro de xilacina (Procin Equus®, Pisa Farmacéutica, México) (1.1 mg/Kg IV), y se prepararon como se describe anteriormente en la técnica de venografía. Las CTM, se diluyeron en solución salina fisiológica y se administraron  $10-30 \times 10^6$  células en la vena digital palmar lateral (o medial) usando un catéter de mariposa de 21G y una jeringa de 20 ml. Schnabel y cols. (2013), sugieren el uso de agujas con un calibre mayor a 23G para aumentar la viabilidad de las CTM. El torniquete se retiró 20 min después de la infusión y se colocó una venda en la cuartilla. Este procedimiento se realizó en tres ocasiones con intervalos de un mes para todos los caballos.

En el caballo control se realizó el mismo procedimiento, pero únicamente se infiltró el medio de la suspensión celular.

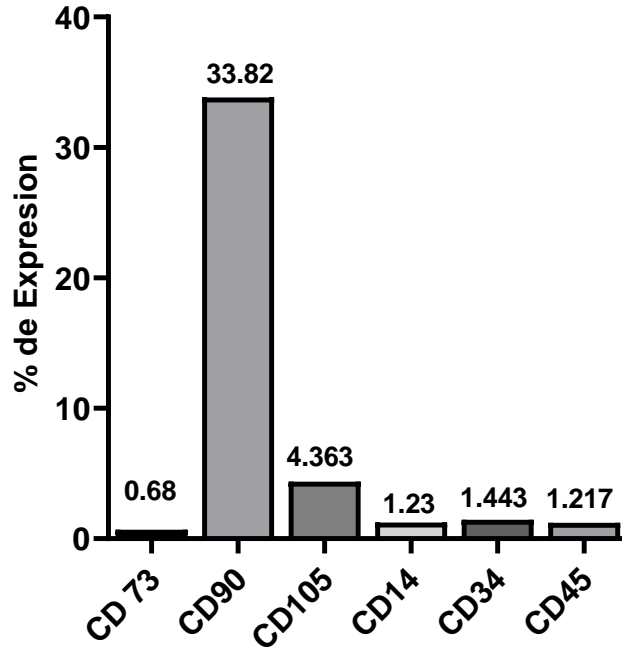
## **10. RESULTADOS**

### **Inmunofenotipificación**

Se realizó por medio de citometría de flujo, en el cuarto pase de cultivo, identificando los inmunofenotipos de las poblaciones celulares para su administración como terapia celular. Se analizaron 6 marcadores de superficie, tres de ellos reconocidos como marcadores de células troncales derivadas de médula ósea equina: CD73, CD90 y CD105 y tres indicadores del fenotipo celular hematopoyético CD14, CD34 y CD45. Los porcentajes de expresión de los marcadores analizados se muestran en la figura 1, en donde se encontró que las poblaciones analizadas presentaron marcadores de un estado *no diferenciado*, el marcador CD 90 presentó el mayor porcentaje (33.82%) y los marcadores con más baja expresión de linaje hematopoyético fueron CD14, CD34 y CD45 (1.23%, 1.443% y 1.217%, respectivamente), los marcadores CD73 y CD105 presentaron porcentajes de 0.68 y 4.36 respectivamente.

Las células fueron positivas a CD73, CD90, CD105, CD28 y CD44 (CD28 y CD44 son específicas para CTM de equino); y fueron negativas a CD45, CD34, CD14 y CD79 $\alpha$  (De Schauwer y cols. 2011; De Schauwer y cols. 2012; Carvalho y cols. 2013; Carvahlo, Yamada y cols. 2013; Michler y cols. 2018).





**Fig. 1. Porcentajes de expresión del inmunofenotipo de las poblaciones celulares de médula ósea de equino, resultados obtenidos después del cuarto pase del cultivo celular. (Tomado de la Tesis de Maestría “Evaluación de células troncales mesenquimales alogénicas en laminitis crónica con identificación de los receptores purinérgicos P2X en biopsias de tejido lamelar”, Gabriela Aranda Contreras. 2019;UNAM).**

### **DOLOR Y CLAUDICACIÓN**

Con la escala Obel-Glasgow para evaluar dolor-claudicación, en los caballos con laminitis crónica se obtuvieron valores de 2 a 13, antes del tratamiento con CTM-AMO (Fig. 2). El caballo control sin tratamiento con CTM-AMO, mostró claudicación, dolor y aumento de temperatura en los cascos, su valor en la escala fue de 9. Al progresar el estudio todos los caballos tratados con CTM-AMO mejoraron su condición clínica a partir del segundo o tercer mes de haber iniciado el tratamiento. Seis meses después, al finalizar el estudio, todos los caballos tuvieron una

puntuación de 0 a 4 en la escala de Obel-Glasgow, y mejoraron significativamente su movilidad y condición clínica. De forma general, los caballos que al inicio presentaban la peor condición clínica, fueron los que mostraron notable mejoría (Fig. 2). Todos los caballos aumentaron su movilidad, sin encontrarse postrados permanentemente, mejoró la calidad y la forma de la muralla de los cascos, mejoró su comportamiento, encontrándose más activos y alertas al medio, presentando en general una mejor calidad de vida. Esta mejora se atribuyó a la administración de CTM-AMO, mientras que el caballo control, tratado solamente con el medio de cultivo, no mejoró durante el tratamiento (Fig. 2).

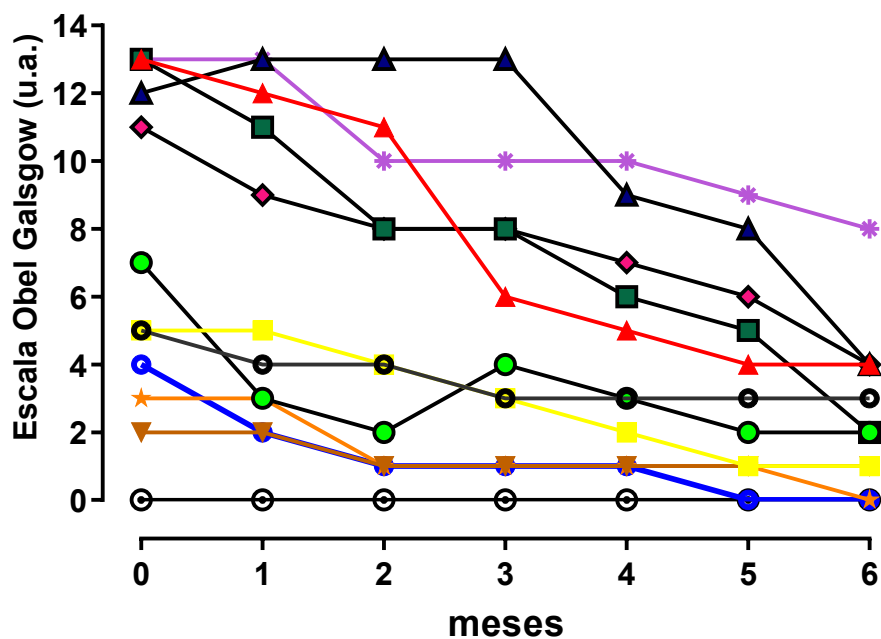


Figura 2. Gráfica que muestra la evolución clínica en la escala de Obel-Glasgow que evalúa el grado de claudicación y dolor de caballos con laminitis crónica tratados con células troncales mesenquimales de médula ósea alogénicas, durante 6 meses en comparación con un caballo sano (O); Caballo control (o)

## **ESCALA DE GRIMACE**

Se realizaron pruebas pareadas de t de Student de una cola con una  $p=0.05$

Se utilizó el programa Prisma 7.0 (GraphPad software, La Jolla, CA, USA).

Se realizó una prueba para cada una de las facciones de la cara que se toman en cuenta para la escala de Grimace (Fig. 3).

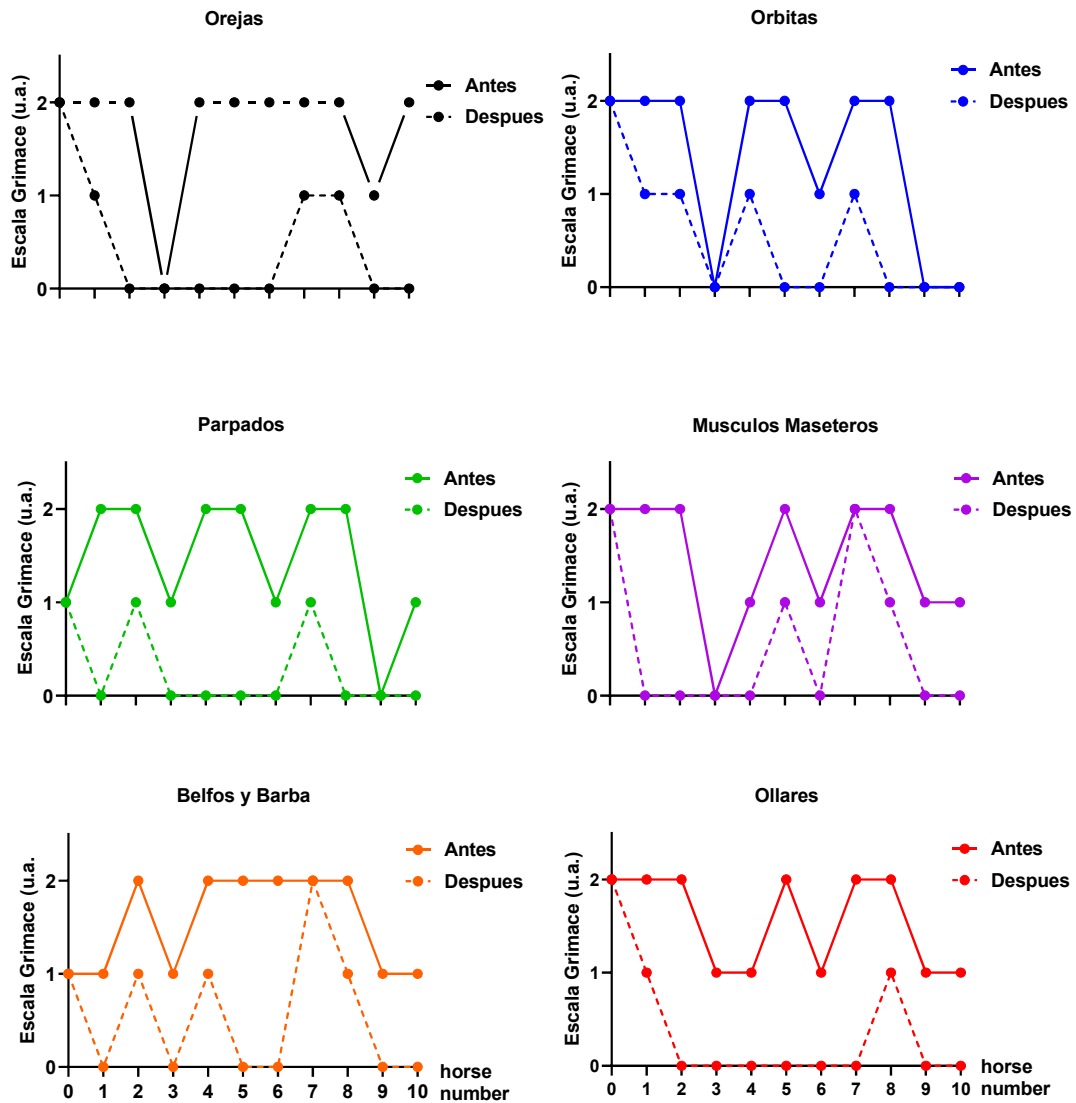
En la posición de las orejas se tuvo un valor de significancia de 0.0002. En la tensión de los músculos orbiculares el valor de  $p=0.0024$ . Para la posición de los párpados el valor de  $p=0.0002$ . En la tensión de músculos maseteros se obtuvo un valor de significancia de 0.0008. En la tensión de belfos y barbilla el valor de  $p=0.0002$  y en la tensión de ollares  $p<0.0001$ .

Para todas las facciones de la cara en la escala de Grimace el valor de p fue menor a 0.05, por lo que existe diferencia significativa para cada una de las facciones.

En la Fig. 3 podemos observar los valores obtenidos en la escala de Grimace de los caballos, antes del tratamiento (líneas continuas) y después del tratamiento a los 6 meses (líneas discontinuas). Antes del tratamiento con CTM-AMO, se obtuvieron valores de 1 y 2 indicando dolor severo, mostrando las orejas hacia atrás, sin movimiento, tensión de los músculos orbiculares, maseteros, zigomático, tensión de la barbilla y belfos, ollares distendidos y con forma ovalada, casi sin parpadeo, con la cabeza y la vista hacia abajo.

Seis meses después del tratamiento, mostraban valores en esta misma escala de 1 y 0, sin tensión facial, movimiento de las orejas hacia donde un estímulo los atraía, párpados abiertos con mirada atenta, sin tensión en músculos maseteros, zigomático, barbilla y belfos sin tensión, ni ollares distendidos, la cabeza erguida en posición normal, la conducta en general en estado de alerta y responsivos.

Lo que sugiere disminución del dolor de sus cascos, ya que los signos faciales relacionados al dolor, de acuerdo a la escala de Grimace eran poco evidentes a los 6 meses, así como también los signos relacionados al dolor con la escala de Obel-Glasgow.



**Figura 3. Escala de Grimace en caballos con laminitis crónica, antes del tratamiento con células troncales mesenquimales de médula ósea (líneas continuas) y 6 meses después del tratamiento con células troncales mesenquimales de médula ósea (líneas discontinuas).**



## **VENOGRAFÍAS**

Se observó que en las venografías tomadas antes del tratamiento con CTM-AMO, las arterias coronarias circunflejas estaban ausentes en 7 de 10 caballos, mientras que en 5 caballos no se observó el arco terminal, las arterias del corion laminar también estaban ausentes en 8 caballos, así como las arterias circunflejas de la suela en 6 caballos (Fig. 5B).

Al final del estudio, después de 6 meses del tratamiento con CTM-AMO, se observa en las venografías, signos de recuperación vascular, sin importar la condición clínica inicial, ni el grado de daño vascular inicial. Los vasos coronarios y del plexo de talones se observaron ensanchados y se observan brotes vasculares en los vasos con trayectorias aberrantes (Fig. 5C). Las venografías mostraron que en 8 de 10 caballos estaban presentes y bien definidas: las arterias circunflejas coronarias, el arco terminal, las arterias del corion laminar y arterias circunflejas de la suela.

Considerando los resultados anteriores, se sugiere un proceso de angiogénesis, aun cuando ninguno de los caballos tratados mostró una recuperación completa del patrón vascular después del tratamiento, sin embargo la recuperación clínica fue evidente en comparación con el caballo control, en el que no se observaron cambios venográficos de recuperación del patrón vascular.

## **BIOPSIAS LAMELARES**

Derivado de las biopsias realizadas del tejido laminar de los cascos del caballo control y de los que presentaron laminitis crónica, tanto antes y después de 6 meses de tratamiento con CTM, obtuvimos los siguientes resultados histopatológicos.

### **Análisis histológico de cascos de caballos sanos.**

Debajo del estrato perioplico se aprecia el estrato laminar primario sin cambios patológicos. La región interna no pigmentada del estrato medio es contigua con los ejes queratinizados de la epidermis primaria lamelar (PEL) que se interdigitan con las láminas primarias dérmicas (PDL). Las láminas epidérmicas secundarias (SEL)

y láminas dérmicas secundarias (SDL) están paralelas unas con otras. Las PEL y las PDL están intactas, las puntas de las SEL se observan redondeadas. Los núcleos de las células epidermales basales están en posición opuesta a la membrana basal (MB) (Fig. 5G). La colágena se observaba organizada, paralela a través de la dermis (Fig. 5J).

### **Análisis Histológico de los cascos de caballos con laminitis crónica.**

En general, los cascos de los caballos con laminitis crónica presentan daño tisular de grado 3 en láminas epidérmicas y dérmicas. Se observó pérdida de la arquitectura lamelar, no se observan SEL o SDL (Fig. 5E), existe hiperplasia de células basales epidermales, células con núcleo picnótico sin membrana nuclear definida (Fig. 5H), tejido conectivo abundante, infiltrado perivascular mononuclear. No hay membrana basal (Fig. 5H) o colágeno (Fig. 5K). Se observaron eritrocitos en la periferia y entre el tejido lamelar dérmico. Las células se observaron en división del material nuclear, indicativo del proceso mitótico. Se observaron cantidades moderadas de células inflamatorias (neutrófilos, macrófagos, linfocitos).

### **Análisis Histológico de los cascos de caballos con laminitis crónica tratados con CTM-AMO.**

Después de 6 meses, al final del estudio, se observa regeneración de las láminas con un arreglo-normal, presencia de tejido laminar epidérmico y dérmico primario y secundario, integridad de la capa epitelial, la membrana basal se observó continua y la colágena presente y organizada (Fig. 5F, I y L). No se observa infiltración perivascular de células mononucleares. En algunas preparaciones se observó la presencia de islas epidermales en la punta de láminas epidérmicas secundarias. Las características histológicas a nivel celular y sub-celular de los cascos de caballos con laminitis crónica tratados con CTM-AMO fueron muy similares a los de caballos sanos.

En todos los casos, hubo una mejora en la calidad de vida de los caballos, lo que les permitió permanecer por más tiempo de pie, disminuyó el tiempo de postración

y tuvieron mayor tiempo de movilidad, indicativo de ausencia de dolor, mejoraron su ingesta de alimento estando de pie, lo que condujo a aumento de peso, las úlceras de piel que presentaban por decúbito cicatrizaron, y mejoró el estado de su pelaje al no presentar dolor y permanecer más tiempo deambulando y comiendo, su comportamiento cambió drásticamente y estaban alertas y responsivos. Al término del estudio se observó que la calidad de la muralla del casco mejoró en forma y firmeza, desaparecieron las seños sobre la muralla, teniendo mejor apariencia, y por lo tanto un casco de mejor calidad y más fuerte. Los caballos que al inicio presentaban pérdida de continuidad en las suelas, al final del estudio presentaban una suela sin lesiones, bien formada y fuerte.

### **MICROSCOPIA ELECTRÓNICA**

Para evaluar la integridad epitelial a nivel ultraestructural de la lámina basal en los cascos tanto del caballo sano así como en los tratados con CTM-AMO, se realizaron análisis por microscopía electrónica.

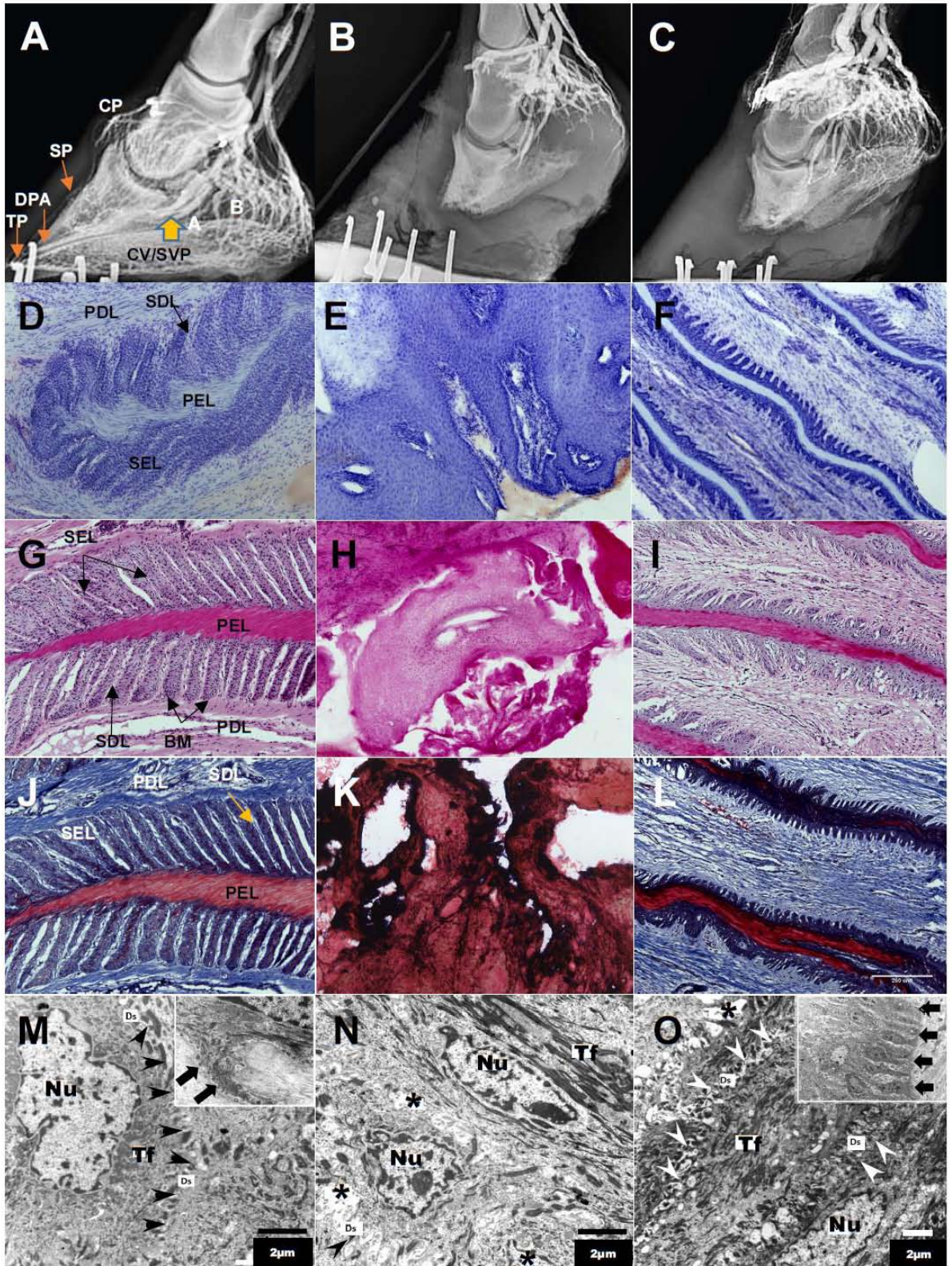
En las muestras del casco del caballo sano (Fig. 5M), no se observaron cambios en la ultraestructura de la lámina basal, encontrándose que las láminas primarias y secundarias, y los queratinocitos conservan sus uniones intercelulares intactas (desmosomas). Se observó la unión entre las células basales con numerosos desmosomas y en el citoplasma numerosos filamentos intermedios electrodensos (tonofilamentos) y mitocondrias. Los núcleos exhiben discretas irregularidades en la envoltura nuclear, además de uno a dos nucléolos evidentes.

En las muestras del casco de caballos con laminitis crónica, antes de iniciar el tratamiento (Fig. 5N), se observa la ultraestructura de la membrana basal irregular y con pérdida de electrodensidad, hay gran cantidad de espacios electrolúcidos entre las células epiteliales, compatibles con edema. Las células basales mostraron núcleos con acúmulos de cromatina, pérdida de hemidesmosomas, además que estaban disgregados o separados, se aprecian tonofilamentos desorganizados en el citoplasma de células epidérmicas y sin membrana basal.

En las preparaciones de los caballos después de ser tratados CTM-AMO, la



ultraestructura de la membrana basal, y laminas primarias y secundarias, (Fig. 5O), muestran reducción de los espacios electrolúcidos entre los queratinocitos, se aprecia una mayor densidad de hemidesmosomas que antes del tratamiento, se aprecian algunos queratinocitos contraídos y más electrodensos, y en la mayoría de ellos muestran numerosos filamentos intermedios electrodensos, los núcleos se observaron con formas regulares y arreglos de cromatina. Los cambios de la ultraestructura están estrechamente relacionados con el proceso de regeneración, ya que multifocalmente se aprecian desmosomas intactos.



**Figura 5. Las venografías de caballos con laminitis crónica muestran angiogénesis y regeneración laminar después de haber sido tratado con CTM-AMO.**

**A-C.** Venografía representativa de un caballo sano (**A**), caballo con laminitis (**B**), y caballo tratado con CTM-AMO (**C**). Nótese la respuesta vascular en cascos tratados con CTM-AMO. **CP:** Plexo coronario; **SP:** plexo sublamelar; **DPA:** ápice de la falange distal; **TP:** plexo terminal; **CV:** Vasos circunflejos; **A:** arco terminal de los vasos digitales palmares; **B:** plexo de talones; **SVP:** plexo solar; **D-L:** Fotomicrografías representativas de secciones sagitales del corion laminar de un caballo sano (**D,G,J**), con laminitis (**E,H,K**) y tratado con CTM-AMO (**F, I, L**), teñidos con Violeta de cresilo (Núcleo celular; (**D-F**), Ácido periódico de Schiff (Membrana basal; (**G-I**), y Tricrómica de Masson (Colágena; **J-L**). Nótese la regeneración del corion lamelar en caballos tratados con CTM-AMO. **PEL:** Láminas primarias epidérmicas; **PDL:** Láminas primarias dérmicas; **SEL:** Láminas secundarias epidérmicas; **SDL:** láminas dérmicas secundarias; **BM:** membrana basal. **M-O.** Electro-Microfotografías mostrando características ultra-estructurales de células basales en caballos sanos (**M**), con laminitis (**N**), y caballos tratados con CTM-AMO (**O**). Nótese la recuperación de la cromatina y la organización de los tonofilamentos, así como los desmosomas en caballos tratados con CTM-AMO. **Nu:** Núcleo; **Tf:** tonofilamentos; **Ds y cabezas de flechas:** desmosomas, \*: edema; **flechas en los insertos** señalando la membrana basal.

## **11. DISCUSIÓN**

Los resultados de este estudio demuestran que la administración de células troncales mesenquimales alogénicas de médula ósea por perfusión regional intravenosa en vena digital palmar a caballos con laminitis crónica, induce el proceso regenerativo del corion laminar y angiogénesis del casco, lo cual está asociado a la disminución de la claudicación, dolor y temperatura de los cascos, por lo tanto, mejora la calidad de vida de estos pacientes. Algo importante también, es que debido a esta mejoría, los caballos no se tienen que seguir sometiendo a la eutanasia debido al dolor severo de esta enfermedad.

Hasta el momento, no existen otros estudios que demuestren con pruebas específicas, el uso y propiedades terapéuticas de las CTM-AMO en caballos con laminitis, además de este trabajo.

### **LAMINITIS CRÓNICA**

La laminitis crónica es una enfermedad inflamatoria e incapacitante que afecta el tejido laminar de los cascos de caballos. Comprende una inflamación severa del corion laminar, que a nivel molecular se evidencia por aumento en la expresión de genes que codifican a mediadores pro-inflamatorios, reclutamiento de neutrófilos, aumento de la actividad de MMP y aumento en la expresión de genes que codifican para ADAMTS-4 (proteínas de superficie miembros de la familia de metaloproteasas). Existe evidencia de apoptosis en células epiteliales basales, queratinocitos y fibroblastos; así como destrucción de la membrana basal y disminución en el número de hemidesmosomas, terminando en el desequilibrio de la unión entre epidermis y dermis laminar, por lo que se pierde el soporte del aparato suspensor de la falange distal, llevando al desprendimiento de su unión al casco y por lo tanto rotación dorso-palmar, exposición de la falange por la palma del casco y como consecuencia, osteomielitis. Todo esto conlleva a la presencia de dolor severo y sufrimiento en los caballos afectados, teniéndose que tomar la decisión de eutanasia debido al grado de sufrimiento en estos caballos (Black, 2009).

Los resultados que obtuvimos en este trabajo demuestran que la administración de CTM-AMO por perfusión regional intravenosa en la vena digital, puede cambiar el ambiente pro inflamatorio dentro del casco afectado, por un ambiente anti inflamatorio. Comprobamos que al final del tratamiento con CTM-AMO, hubo regeneración laminar y angiogénesis en los tejidos del casco en estos pacientes, comprobamos la presencia de nuevas laminas epidérmicas y dérmicas, primarias y secundarias, observamos formación de nueva membrana basal, así como presencia de hemidesmosomas alrededor de las células epidermales basales. Dando como resultado disminución de dolor, disminución de claudicación, mejora en la calidad de la muralla del casco, mejorando la calidad de vida de los caballos tratados. Con el uso de CTM como tratamiento en caballos con laminitis crónica se evita llegar a la eutanasia de estos pacientes, ya que se les da calidad de vida, disminuyendo el dolor severo que se presenta en esta enfermedad.

## **DOLOR**

El dolor es una experiencia compleja, que incluye no sólo la transducción de estímulos nocivos, si no también un proceso cognitivo y emocional en el cerebro. Comprende procesos anatómicos, bioquímicos, fisicoquímicos, que conducen a una serie de cascadas de señalización a nivel periférico y central. Se presenta de forma aguda y crónica. La forma aguda es una señal de alerta y defensa para el organismo. El dolor, cuando se cronifica, puede volverse debilitante, en lugar de ser un sistema de protección. La transición a la fase crónica incluye cambios en el cordón espinal y cerebro. Presentando hiper-sensibilización periférica y central, así como alodinia, dando como resultado pacientes que son difíciles de tratar, ya que puede tornarse en dolor neuropático o hiperalgesia, requiriendo analgésicos potentes a altas dosis, dosificaciones frecuentes y uso de analgesia multimodal (Julius, 2001). Se debe considerar que más del 75% de caballos afectados con laminitis, eventualmente desarrollan claudicación severa o crónica y por lo tanto, dolor severo.

Las terminaciones nerviosas en las papilas dérmicas del tejido dañado liberan

péptidos como CGRP, que provoca inflamación neurogénica, extravasación de plasma y atracción de leucocitos. Las señales nociceptivas continuas crean un estado de hiperalgesia central mediada por aminoácidos excitatorios, prostanoïdes y citocinas. Activando neuronas, así como astrocitos y microglia, excitando a las neuronas del asta dorsal.

La hiperalgesia central y periférica explican el dolor severo en laminitis aguda (Driessen y cols. 2010). Las causas de dolor en laminitis aguda y crónica se deben a los mediadores inflamatorios liberados, isquemia del dígito, vasoconstricción, formación de puentes arterio-venosos, trombosis y compresión de la vasculatura solar causada por la falange que se movió de posición. Es importante considerar, que debido a estos procesos nociceptivos complejos en laminitis, la mayoría de los caballos con laminitis aguda o crónica, no responden adecuadamente a los analgésicos comunes; son pacientes en los que no se tiene un buen control del dolor, desarrollan hiperalgesia y dolor neuropático.

La inervación sensorial del pie del caballo consiste de fibras gruesas mielinizadas A, de bajo umbral mecánico ( $A\beta$ ), fibras mielinizadas delgadas ( $A\delta$ ) y fibras no mielinizadas C que transmiten un umbral nociceptivo alto. Las fibras  $A\beta$  inervan corpúsculos lamelares (parecidos a los de Pacini), se encuentran en los talones del casco del caballo, funcionando como propioceptores proveyendo un caminar seguro. Las fibras  $A\delta$  y C, se encuentran distribuidas en las capas dérmicas, en las papilas dérmicas de la suela y región bulbar y láminas dérmicas. Existen también fibras nerviosas no mielinizadas del sistema autónomo junto con la red de vasos sanguíneos y anastomosis arterio-venosas dentro del casco, que se encargan de regular el tono vasomotor (Driessen y cols. 2010).

La evaluación certera del dolor, es fundamental para el bienestar animal y el manejo clínico del paciente con laminitis. En la práctica diaria, se utilizan métodos subjetivos para evaluación del dolor, como el examen clínico junto con pinzas para cascos. Las escalas de dolor que se han utilizado, incluyen características del comportamiento y parámetros fisiológicos. La escala de Obel y el sistema de



puntuación clínica son escalas descriptivas simples desarrolladas para evaluar claudicación. La escala de Obel fue específicamente desarrollada para caballos con laminitis, pero no toma en cuenta el comportamiento por dolor en caballos. El sistema de puntuación clínica usa expresiones para describir intensidad del dolor (sin dolor, ligero, moderado y severo), asignando un valor a cada clasificación, y su uso en veterinaria, dependerá de quién la esté utilizando, dando un valor de acuerdo a su experiencia en caballos. Existen diversas escalas de dolor usadas en equinos. Viñuela-Fernández y col. en el 2011, realizaron un estudio comparativo entre sistemas de evaluación de laminitis. Compararon 3 sistemas subjetivos: escala visual análoga (EVA), escala de Obel y sistema de puntuación clínica. Concluyendo que los 3 sistemas son confiables para evaluar la claudicación, siempre que los evalúe personas con experiencia en equinos.

En el 2009, Dutton y cols. crearon una escala multifactorial modificada de dolor, que incluye componentes de la escala de Obel y la de Glasgow (Driessen y cols. 2010). Esta es la escala que utilizamos en este trabajo para evaluar el grado de dolor en caballos con laminitis crónica.

Los valores obtenidos en la escala, antes del tratamiento estuvieron entre 2 y 13. El caballo control presentó un valor de 9. Los caballos que recibieron el tratamiento de CTM, conforme avanzaba el estudio, fueron mejorando su condición clínica a partir del segundo o tercer mes de haber iniciado el tratamiento. A los seis meses, al finalizar el estudio, bajó significativamente el dolor que presentaron en la claudicación, teniendo valores de 0 a 4. Los caballos que al inicio se encontraban en la peor condición clínica, fueron los que mostraron una mejoría más notable. Al final del estudio, todos los caballos aumentaron su movilidad, deambulaban por más tiempo, no se encontraban postrados, mejoró la calidad y forma de la muralla de los cascos, estos crecieron de forma normal posterior al tratamiento, la calidad de la muralla era prácticamente normal, una muralla más gruesa y firme; el comportamiento mejoró, siendo que se encontraban alertas y activos, no tenían depresión como al inicio, mejoró la calidad de vida de estos caballos. A diferencia del caballo control, que se trató únicamente con el medio en que venían las células,

que no mostró ninguna mejoría. Por lo tanto, el cambio en los caballos tratados, se atribuyó a la administración de CTM-AMO.

Para complementar con la escala de Obel-Glasgow, se utiliza la escala de Grimace, un sistema codificado basado en expresiones faciales debidas al dolor, está siendo utilizada de forma efectiva en caballos con laminitis (Dalla Costa y cols. 2016; Lecchi y cols. 2017). Toma en cuenta 6 facciones: movimiento de las orejas hacia atrás, tensión en las orbitas, tensión muscular sobre los ojos, tensión en músculos masticatorios (zigomático y masetero), belfos contraídos y barbilla contraída, ollares alargados y aplanados. Cada facción tiene un valor de 0 a 2. El cero indica que no se presenta la facción, el 1 está moderadamente presente, el 2 indica que está claramente presente (Dalla Costa y cols. 2016). Esta escala la utilizamos en este trabajo.

Todos los caballos estudiados en esta investigación, mostraron dolor, observado en la expresión facial previo al tratamiento con CTM-AMO, todos ellos indicadores de dolor severo, sin embargo, al final del estudio, después de 6 meses del tratamiento, las expresiones faciales, indicadores de dolor se modifican favorablemente y presentan una conducta más alerta al medio que les rodeaba.

Para todas las facciones de la cara en la escala de Grimace el valor de p fue menor a 0.05, por lo que existe diferencia significativa para cada una de las facciones.

Lo que sugiere disminución del dolor de sus cascos, ya que los signos faciales relacionados al dolor, de acuerdo a la escala de Grimace eran poco evidentes a los 6 meses, así como también los signos relacionados al dolor con la escala de Obel-Glasgow. Indicando que todos los caballos, al presentar menos dolor, tuvieron una mejor calidad de vida, deambulaban continuamente, su actitud al medio que los rodeaba era normal, alerta, activos, mejoraron su alimentación en cuanto a cantidad, se observó que subieron de peso, las úlceras por decúbito cicatrizaron, mejoró la calidad de su pelaje, mejoró la calidad de sus cascos y de la muralla, siendo más fuerte y sin fisuras. Al tener estos resultados en un caballo con laminitis crónica, ya no se debe de pensar en la eutanasia.



## **CULTIVO CELULAR**

El aislamiento frecuentemente utilizado de células mononucleares de médula ósea de adulto se lleva a cabo por el método de gradiente de densidad. En el caballo no existe un método de aislamiento estandarizado, sin embargo, se ha utilizado el de gradiente de densidad. Las células se mantienen en cultivos plásticos con condiciones específicas para que se expandan. Estas diferencias pueden significar cambios en las células aisladas. Se proveen hormonas, nutrientes y proteínas para el crecimiento celular y factores de crecimiento endógenos, por medio de suero fetal bovino. El suero fetal bovino, se puede sustituir por lisado alogeneico de plaquetas, suero autólogo y sustituto de suero comercial. Para el cultivo celular es necesario proveer las condiciones de oxigenación, temperatura y humedad para su expansión, así como factores específicos para su diferenciación celular (López y Jarazo, 2014).

Las células troncales utilizadas en este estudio, fueron obtenidas por la técnica de gradiente de densidad, al cuarto pase, e inmunotipificadas por citometría de flujo, siendo positivas a CD90 (33.82% de la población total), CD105 (4.36%), CD73 (0.68%), negativas a CD14, CD34 y CD45.

## **LAMINITIS CRÓNICA A NIVEL CELULAR Y MOLECULAR**

Steelman y cols. en 2013, estudiaron en caballos con laminitis crónica, que los monocitos y las concentraciones de IL-1 e IL-6 se encuentran elevados, sin que TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  lo estén, proponen que el origen de estas citocinas pudieran ser los queratinocitos lamelares o fagocitos. El análisis del factor reumatoide fue negativo en caballos con laminitis crónica, enfermedad que presenta algunas similitudes con la artritis reumatoide, sin embargo, en laminitis la concentración de IgA se encontró elevada. A la fecha se desconoce con exactitud la función de la IgA sérica en su forma monomérica, pero se sabe que se eleva en problemas de inflamación crónica, teniendo propiedades antiinflamatorias, disminuyendo la producción de TNF $\alpha$  e IL6, alterando la fagocitosis y quimiotaxis. Así mismo, están elevados los niveles de metaloproteinas 13 (MMP13), una enzima que degrada la colágena laminar y

promueve la inestabilidad mecánica del pie, aumenta las quimiocinas de macrófagos, CCL2, IL8 y la quimiocina de neutrófilos. Sin que las quimiocinas de linfocitos CCL4 y CCL7 se encuentren elevadas. Los marcadores celulares CD3 (células T), CD14 (macrófagos) y CD19 (células B) no se expresaron en mayor cantidad en comparación con los caballos control.

En el corion laminar se encontraron neutrófilos, pero están ausentes en la dermis. También encontraron un ligero aumento en la expresión de una enzima antioxidante, super óxido dismutasa 2, (SOD2), sugiriendo que existe un daño oxidativo, quizá por el estallido respiratorio de neutrófilos, causando inflamación, isquemia y daño laminar (Steelman y cols. 2013, Leise 2018).

Dado que los neutrófilos pueden liberar proteinasas, especies reactivas de oxígeno y citocinas inflamatorias, se piensa que estas células contribuyen al daño del tejido laminar durante la laminitis crónica y que su presencia en estas láminas, más que un problema inmune, es el resultado del trauma mecánico continuo al tejido por la actividad diaria del peso del caballo (Steelman y col, 2013). Dando evidencia de la importancia de los mediadores inflamatorios de los queratinocitos y la infiltración de neutrófilos en la inflamación y dolor en caballos con laminitis crónica.

En nuestro estudio, no se analizaron citocinas inflamatorias o alguna otra molécula, sin embargo en las histopatologías se mostró la presencia de neutrófilos en tejido laminar, indicando inflamación presente antes del tratamiento, en las histopatologías finales se observó la disminución en la cantidad de neutrófilos, debido a la disminución de la inflamación causada por la presencia de CTM-AMO. En estudios futuros es deseable cuantificar citocinas inflamatorias, anti inflamatorias y metaloproteasas antes y al finalizar el tratamiento con CTM-AMO, para establecer entre la presencia de estas y la eficiencia del tratamiento.

### **RECLUTAMIENTO CELULAR**

Se desconoce la forma precisa de movimiento de las CT, sin embargo se piensa que pueda ser parecido al reclutamiento de leucocitos.

El reclutamiento de leucocitos a los tejidos se da como resultado de daño

traumático, autoinmune, daño de isquemia-reperfusión, y la presencia de patógenos. Células como neutrófilos, monocitos y linfocitos, entran a los tejidos por medio de mecanismos dependientes de integrinas, selectinas y reclutamiento de linfocitos  $T\alpha\beta$ , con un reconocimiento previo de MHC en los endotelios, vía receptores específicos de antígenos de células T. El reclutamiento de estos leucocitos a tejidos y su movimiento en la matriz extra celular se da por medio de quimiocinas, anafilotoxinas y péptidos quimiotácticos (Black, 2009).

### **MOVIMIENTO CTM**

Las CTM se encuentran en nichos específicos de varios tejidos, como médula ósea, hígado, hueso, y un pequeño número circulan en sangre periférica, aumentando su número cuando se presentan condiciones de hipoxia. El modo preciso por el que las CTM migran a tejidos lesionados no está del todo comprendido, se ha propuesto que su migración sea semejante al proceso de migración de los leucocitos. Durante la inflamación, se requiere, por parte de diferentes células, una secuencia coordinada de pasos y cascadas de señalización para el reclutamiento de las células: iniciando por el rodamiento celular mediado por selectinas (E-selectina, P-selectina; expresadas constitutivamente por células endoteliales de médula ósea y por endotelios inflamados), activación celular por medio de quimiocinas y citocinas, activación de integrinas, y adhesión firme al endotelio mediada por integrinas (Antígeno tardío 4: VLA4, también conocido como integrina  $\alpha4\beta1$ ; Molécula de adhesión celular vascular: VCAM-1), seguido de migración celular trans endotelial por moléculas de adhesión (JAM`s, cadherinas y Molécula de adhesión plaquetas-endotelio1 (PECAM-1/CD31) que median la translocación a la matriz extracelular por medio de integrinas, VCAM-1, VLA-4 y metaloproteasas, adhiriéndose por medio de colágena, fibronectina, ácido hialurónico y CD44 (Salem y Thiernemann 2010).

Las CTM expresan receptores para quimiocinas, por lo que las células son activadas

por estas quimiocinas. La quimiocina SDF-1/CXCL12 la expresan de forma constitutiva las células troncales de médula ósea. También expresan el receptor SDF-1/CXCR4. Otras moléculas de adhesión, que responden a SDF-1 y quimiocinas son CX3CL1, CXCL16, CCL3, CCL19 y CCL21. SDF-1 estimula el reclutamiento de las CTM al sitio lesionado. Se ha visto que SDF-1 recluta CTM a tejidos isquémicos. Tanto SDF-1/CXCR4 como CCL21/ CCR7 (en queratinocitos) son vías de reclutamiento de CTM (Salem y Thiemermann 2010).

Se ha observado que el número de pases cambian el fenotipo de las CTM y esto afecta el “homing”, ya que disminuye la expresión de moléculas de adhesión, se pierden receptores de quimiocinas (CXCR4) y por lo tanto falta de respuesta quimiotáctica.

Es por esto que decidimos utilizar las células al cuarto pase para administrarlas a los caballos con laminitis, donde se ha visto que aún conservan sus propiedades generales de troncalidad, sin perder sus propiedades de diferenciación y su efecto parácrino.

A pesar de que los leucocitos contribuyen al daño tisular, al liberar enzimas, radicales de oxígeno y nitrógeno, también colaboran en la reparación tisular al liberar moléculas anti-inflamatorias y factores de crecimiento (Black, 2009).

Las células T juegan un papel muy importante en la inmunidad humoral, y su inhibición es un objetivo primordial en enfermedades autoinmunes y condiciones inflamatorias. Se han utilizado diferentes fármacos inmunosupresores (Muromonab, Basiliximab, Daclizumab) dirigidos contra estas células, de forma directa y bloqueando la actividad de citocinas circulantes que están involucradas en la proliferación o activación de células T. Sin embargo, los tratamientos inmunosupresores producen efectos secundarios severos como infecciones, anafilaxia y aumento del riesgo de cáncer.

Por sus propiedades inmunosupresoras, es por lo que últimamente se han estudiado las CTM de diferentes orígenes, como médula ósea, cordón umbilical,

tejido adiposo, músculo, etc. (Fayyad-Kazan y cols. 2016).

En este trabajo, aunque no fue el objetivo, podemos decir que el uso de CTM es seguro en caballos, no se produjeron efectos adversos sistémicos ni locales, al menos durante el período de estudio de 6 meses. Y podemos sugerir que no expresaron MHC tipo II y provocaron inmunosupresión de células T.

### **CÉLULAS TRONCALES**

Las CT son definidas por los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular como células indiferenciadas, capaces de dividirse indefinidamente y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas. Deben adherirse al plástico, expresar marcadores de pluripotencia como CD105, CD73, CD90, en caballos también CD28, CD44 y no expresar marcadores hematopoyéticos como CD11, CD14 (monocitos y macrófagos); CD31, CD34; CD43, CD45 (leucocitos); CD19, CD79a (Linfocitos B), ni MHC II. Además, deben tener la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condroblastos (Ranera y cols. 2011).

Las células que utilizamos en este trabajo fueron obtenidas de médula ósea de esternón por la técnica de gradiente de densidad, presentaron adherencia al plástico, expresaron los marcadores CD105, CD73 y CD90, y en un porcentaje muy bajo CD14, CD34 y CD45 (1.23%, 1.443% y 1.217%, respectivamente).

### **FUNCIONES DE LAS CTM**

Las células troncales mesenquimales tienen diferentes propiedades, tanto en tejidos sanos como tejidos lesionados o inflamados, entre sus funciones, se encuentran efectos parácrinos, secretan factores de crecimiento, citocinas, mediadores anti fibróticos y mediadores angiogénicos al sitio lesionado (Cassano y cols. 2015; Kusuma GD y cols. 2017). Actualmente, los efectos parácrinos de las CTM, son más estudiados que su función de diferenciación, ya que se ha visto que a partir de este efecto se pueden generar diferentes terapias médicas (Kusuma GD y cols. 2017). Entre sus efectos conocidos, se sabe que las CTM producen inmunosupresión, por lo que a estas células se les ha llamado inmuno privilegiadas. Para que se lleve a

cabo esta inmunosupresión por parte de las CTM se requiere la activación de  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL1\alpha$ ,  $IL1\beta$ . La inmunosupresión por CTM está mediada por factores solubles como IDO (Indolamina 2, 3 di-oxigenasa), que en estimulación con  $IFN\gamma$ , es una enzima que metaboliza el triptófano a kinurenina, causando la depleción de triptófano y la acumulación de productos tóxicos (Ghannam y cols. 2010; Ma y cols. 2014). Las CTM inhiben la producción de células T de diferentes maneras, las CTM de ratones producen sintasa de óxido nítrico inducida por  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL1\alpha$ ,  $IL1\beta$ , para producir óxido nítrico (ON), inhibiendo a las células T. También la  $PGE_2$ , inhibe la mitosis de células T y la producción de IL-2, el cual es un cofactor para la inducción de células Th tipo 2 (perfil anti inflamatorio) (Ghannam y cols. 2010; Ma y cols. 2014; Cassano y cols. 2015).

A la fecha, todos los reportes dan evidencia de cuatro conceptos en la modulación de células T, que incluyen la activación, co-estimulación, proliferación y producción de citocinas.

La primera incluye la inhibición de la proliferación de células T a través de una reducción importante en el número de estas células, disminuyendo la expresión de CD38; mientras en la segunda categoría, las CTM, modulan marcadores de una población específica de células T, como CD134 y CD154, que llevará a una reducción en la población de células T. Las células que expresan CD38 son células T recién activadas, además que producen IL-2 e  $IFN\gamma$ . La siguiente categoría inhibe la proliferación celular y la última promueve un perfil de citocinas anti-inflamatorio al aumentar IL-10 e IL-11 (Ma y cols. 2014;; Cassano y cols. 2015; Fayyad-Kazan y cols. 2016).

Las CTM en humanos y equinos, pueden expresar de forma constitutiva Galectina-1 (que es una lectina) y semaforina-3A (ligando que arresta a las células T en la fase G0/G1 del ciclo celular), son proteínas que regulan la inflamación, adhesión y migración de células troncales, capaces de inhibir la proliferación de células T a través de su unión al receptor Neuropilina-1 el cual se expresa en células T de forma constitutiva. Galectina-1 y semaforina-3A son proteínas inmuno-reguladoras y anti inflamatorias, que tienen que ver con las funciones de las CTM, galectina 3

promueve re-epitelialización de tejidos (Lepelletier y cols. 2010; Ma y cols. 2014; Reesink y cols. 2017).

Las CTM aumentan la expresión de las citocinas IL-10 e IL-11, las cuales son importantes en inmunomodulación. IL-10 disminuye y controla la inflamación al activar receptores de IL-10. Mitigando la señalización inflamatoria en varias células de la respuesta inmune innata y adaptativa. La IL-11 puede estimular la producción de sintasa de óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por macrófagos activados, producir óxido nítrico e inhibir la producción de IL-2 e IFN $\gamma$  (Ghannam y cols. 2010; Ma y cols. 2014; Fayyad-Kazan y cols. 2016).

La PGE<sub>2</sub> se ha visto que está involucrada en la inmunosupresión por CTM. La PGE<sub>2</sub> es un producto del ácido araquidónico que actúa como un potente inmunosupresor, inhibiendo la mitosis de células T y la inhibición de IL-2, así como es un cofactor para la producción de células T-helper (Th) tipo 2. La producción de PGE<sub>2</sub> por CTM, es estimulada por TNF- $\alpha$  o IFN $\gamma$ .

Las CTM inhiben la proliferación de células B, arrestándolas en G<sub>0</sub>. En cuanto a las células dendríticas, las CTM inhiben su maduración, mediadas por la secreción de IL-6 y PGE<sub>2</sub>.

También disminuyen el potencial pro inflamatorio de las células dendríticas al inhibir su secreción de TNF- $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-12 y aumentando los niveles de IL-10 induciendo a las dendríticas a un fenotipo anti-inflamatorio. En cuanto a las células natural killer (NK), suprimen su actividad citolítica por medio de TGF $\beta$ 1 y PGE<sub>2</sub> (Ghannam y cols. 2010).

Otra molécula que puede intervenir en la inhibición de la proliferación de células T, es la molécula inhibitoria de muerte programada (PD-1), unido a sus ligandos PD-L1 y PD-L2, (Salem y Thiernemann 2010).

Las propiedades inmunosupresoras de las CTM, no necesariamente están mediadas por la inducción de la muerte de células T. Lo que hacen, es mantener sus poblaciones bajas y en estado quiescente, enviándolas a G<sub>0</sub>, suficiente para inducir un efecto de inmunosupresión (Fayyad-Kazan y cols. 2016).

Las CTM retrasan la apoptosis de neutrófilos, los cuales son importantes

mediadores de la respuesta inmune innata, responsables de matar microorganismos al producir especies reactivas de oxígeno (ROS). Retrasan su apoptosis a través de un mecanismo mediado por IL-6, que está asociada a la disminución de especies reactivas de oxígeno. De esta forma, se preserva la cantidad necesaria de neutrófilos para responder de forma rápida a infecciones.

Se ha sugerido que el LPS (lipo-polisacárido) y TNF- $\alpha$ , durante la septicemia, estimulan a las CTM para que éstas secreten grandes cantidades de PGE<sub>2</sub>, la cual reprograma a monocitos y macrófagos para producir IL-10, a su vez, esta evita la migración de neutrófilos a los tejidos y que no causen mayor daño oxidativo en éstos. Por lo tanto, las CTM son capaces de modular la respuesta inmune innata y mejorar la supervivencia por septicemia (Ghannam y cols. 2010).

En eventos isquémicos cardíacos se ha demostrado que mejoran la función cardíaca y cambia de un estado pro-inflamatorio por macrófagos M1 a un estado anti-inflamatorio M2 en el sitio del infarto; esto debido a la secreción de PGE<sub>2</sub> de las CTM, llevando a una secreción de IL-10 por parte de los macrófagos (Cassano y cols. 2015).

Cassano y cols. mencionan, que similar a la polarización de macrófagos de M1 a M2, las CTM también pueden cambiar a un estado pro-inflamatorio CTM1 y un fenotipo inmunomodulador CTM2.

En resumen, las CTM suprimen la función de varias células inmunes: disminuyen la proliferación de células T, inhiben la maduración de células dendríticas, disminuyen la citotoxicidad por células NK, inducen células anti inflamatorias como T<sub>reg</sub>'s, mediadas por IDO, PGE<sub>2</sub>, TGF $\beta$ , factor de crecimiento de hepatocitos, óxido nítrico, entre otros. Se ha sugerido que las CTM también son capaces de inducir un cambio de perfil de citocinas de Th1 a un perfil Th2 anti inflamatorio (Ghannam y cols. 2010).

Nosotros proponemos que en estudios futuros del uso de CTM en caballos con laminitis, es importante realizar estudios sobre los diferentes efectos parácrinos que



tienen las CTM administradas, así como de las células locales del tejido laminar del casco. De ésta forma se podrá tener mayor evidencia de su acción como tratamiento para pacientes con laminitis crónica y aguda. Será importante realizar un seguimiento de las células, una vez que son administradas, en días o meses después, para conocer si estas siguen presentes en los tejidos internos del casco o han migrado a otro lugar. Así como conocer la cantidad de células que aún pudieran seguir en el sitio, y conocer cuánto tiempo permanecen dentro del casco. Esto se puede realizar marcando las células por medio de perlas fluorescentes con cromóforos, fluoróforos, nano partículas de óxido de hierro, radioisótopos, esferas magnéticas, biotina-avidina, marcaje enzimático, dependerá de la tecnología con que se cuente para seleccionar la técnica más adecuada.

### **FORMAS DE ACCIÓN DE LAS CTM**

Las CTM tienen dos formas de acción, local y sistémica. En su acción local secretan mediadores que inhiben la proliferación de células inmunes; y a nivel sistémico, tienen respuesta cambiando el perfil anti inflamatorio a Th2 o generando células T<sub>regs</sub>.

Hasta el momento se conoce que las CTM tienen muy diferentes formas de acción. En su acción parácrina, secretan o inducen la producción de diversas moléculas con múltiples formas de acción.

Las CTM producen estaniocalcina 1 (STC-1), protegiendo contra especies reactivas de oxígeno originadas por daño de hipoxia-reperfusión que se producen en tejidos lesionados, evitando mayor daño a células y tejidos, evitando su oxidación y muerte celular.

Expresan Receptores antagonistas de interleucina 1 (IL-1Ra), actuando de esta forma, frente a procesos inflamatorios que estén presentes en diferentes tejidos y órganos, al inhibir a IL-1. Dando como resultado un efecto anti-inflamatorio.

Expresan Factor de necrosis tumoral inducible del Gen 6 (TSG-6), el cual es anti inflamatorio e inhibe la acción de metaloproteasas, evitando o disminuyendo la destrucción de matriz extra celular y epitelios.

Expresan Factor 1 derivado de células estromales (SDF1), el cual es un gen codificado por CXCL12, que recluta a las CTM y endoteliales a los tejidos que se encuentren inflamados y dañados. Induciendo migración de CT a tejidos lesionados para disminuir y reparar el daño en dichas células y tejidos.

Proponemos que es probable que la forma de acción de las CTM-AMO que administramos en los caballos con laminitis crónica, hayan tenido las dos formas de acción conocidas de las CT, local y sistémica, por los resultados tan notorios que obtuvimos. Sugerimos que sí hubo un cambio de perfil Th1 a Th2, y la generación de T<sub>reg</sub>'s. Ya que hubo disminución de la inflamación que también fue observada por la disminución del dolor. Es probable que se haya expresado el IL-1Ra, disminuyendo el proceso inflamatorio en el tejido laminar y disminuyendo el dolor. Podría ser sugerente así mismo la expresión del Factor de necrosis tumoral inducible del Gen 6 (TSG-6), que es anti inflamatorio, y que por la presencia de este factor se hayan inhibido las metaloproteasas, que se conoce están aumentadas en casos de laminitis y debido a esto se disminuyó la destrucción de MEC y de epitelios, teniendo como resultado de nuevo la formación de nuevas láminas epidérmicas y dérmicas por acción de factores de crecimiento secretados por las CTM.

El Factor 1 derivado de células estromales (SDF1), también debió haberse expresado, causando el reclutamiento de las CTM administradas hacia las laminas inflamadas y dañadas, de esta forma provocando la acción de las CTM para regenerar tejidos y provocar angiogénesis.

### **CTM EN EL CORION LAMINAR DEL CASCO DE LOS CABALLOS**

Las células troncales que se encuentran en el tejido laminar de los cascos poseen la función de regular la expresión de genes de adhesión epitelial a la matriz extracelular. Regulando integrinas como  $\alpha 6\beta 4$  y proteínas de hemidesmosomas y desmosomas.

Las metaloproteasas, enzimas que destruyen la matriz extracelular y proteínas de hemidesmosomas, lisan la membrana basal, y desintegran epitelios, se encuentran

aumentadas durante laminitis. Carter y cols. en 2011, observaron que en caballos con laminitis crónica, se presenta disminución de células troncales y esta disminución provoca mayor pérdida de matriz extracelular y hemidesmosomas, así como lisis de membrana basal, encontrándose por lo tanto un perfil inflamatorio con presencia de células Th1.

En el estudio que realizamos, hemos propuesto que la causa de laminitis crónica es la pérdida de células troncales del casco de los caballos. Carter en 2011 ya lo había sugerido al observar la disminución de células troncales en el casco de caballos con laminitis crónica. En las histopatologías que realizamos, observamos que antes del tratamiento con CTM, no existían laminas epidérmicas y dérmicas en las biopsias del tejido laminar, la membrana basal se encontraba lisada, no se observaban células epidermales y había una menor cantidad de hemidesmosomas, todas estas son funciones de las células troncales residentes del tejido laminar y del corion coronario, mantener la adhesión de epitelios a la matriz extracelular y regular las proteínas de hemidesmosomas y desmosomas. Al perderse estas células troncales en un proceso inflamatorio como la laminitis, se pierden estas funciones y se presenta la pérdida de homeostasis de los epitelios. Al haber administrado CTM en el pie del equino, se logró que estas células cambiaran a un ambiente anti inflamatorio, regenerando el tejido laminar dañado, regenerando la membrana basal y proteínas para formación de nuevos hemidesmosomas. Así mismo, como se sabe que las MMP están elevadas en laminitis siendo causantes de la destrucción de MEC y proteínas de hemidesmosomas, nuestro estudio puede sugerir que las CTM que administramos, expresaron el Factor de necrosis tumoral inducible del Gen 6 (TSG-6), que inhibió la acción de estas enzimas, disminuyendo la destrucción de matriz extra celular y proteínas. Por lo que la regeneración de epitelios y formación de nuevos hemidesmosomas, fue inminente en este trabajo.

### **¿LAS CT SON INMUNO-PRIVILEGIADAS?**

El concepto que las CTM son inmuno-privilegiadas está basado en resultados de

laboratorio, pero aún no se conoce una respuesta definitiva *in vivo*. Las CTM pueden expresar MHC I, el cual sirve para diferenciar lo propio de lo no propio. Y se ha mencionado que no expresan MHC II (usado para auto reconocimiento y activación inmune) ni tampoco moléculas co-estimuladoras como CD80 o CD86 *in vitro* (Wang y cols. 2019); Cassano y cols. en su laboratorio, han observado que la expresión de MHC II en CTM es variable entre individuos y puede cambiar de acuerdo a los países en cultivo, siendo los países 2 al 4, los que pueden expresar MHC II o de acuerdo al nivel de diferenciación de las CT. Pero también CTM negativas a MHC II lo pueden expresar en presencia de IFN $\gamma$ , el cual frecuentemente se encuentra expresado en procesos inflamatorios. Mencionan que solamente las CTM negativas a MHC II son inmuno-moduladoras *in vitro* (Schnabel y cols. 2013; Cassano y cols. 2015).

Otros autores como Salem y Thiernemann y Wang y cols. en 2019, mencionan que las CTM no expresan MHC II, ni tampoco moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86, o CD40. Sin embargo, pueden expresar MHC II bajo ciertas circunstancias al ser inducidas con IFN $\gamma$ , lo cual es relevante, ya que en muchos ambientes inflamatorios se encuentra sobre-expresado IFN $\gamma$ , lo que puede resultar en la expresión de MHC II (Salem y Thiernemann 2010, Wang y cols. 2019).

Wang y cols. en 2019, mencionan que no son inmuno-privilegiadas, si no que evaden la respuesta inmune. Se ha sugerido que sus propiedades inmunes son binarias, pueden cambiar ya sea a un fenotipo pro inflamatorio en un ambiente ligeramente inflamatorio, o a un fenotipo anti-inflamatorio en un medio severamente inflamatorio; esto dependerá de los receptores Toll-like o de otras moléculas desconocidas.

Ambos mencionan que no hay cambios inmunológicos al usar células alogénicas, sin embargo debe seguirse investigando si hay reacciones inmunes a nivel celular, ya que los donadores serán diferentes.

Aunque hay evidencia previa que las células troncales alogénicas no causan efectos adversos en la salud de los caballos, aún si pueden iniciar respuestas inmunes contra antígenos extraños (Renzi y cols. 2013; Carrade y cols. 2013; Kol y cols.

2015; Pezzanite y cols. 2015; Ardanaz y cols. 2016; Owens y cols. 2016; Brandao y cols. 2018; Zayed y cols.2018). Se ha demostrado que las células troncales de tejido adiposo que expresan biomarcadores de senescencia muestran baja plasticidad de células troncales (Jung y cols. 2019), por tanto impidiendo su potencial uso como fuente autóloga de uso terapéutico; pudiendo ser también el caso de células alogénicas. Van Hecke y cols. en el 2021 estudiaron la aplicación intra articular repetida de células troncales mesenquimales y observaron que no inducían ninguna respuesta inmune o humoral en caballos.

Angelone y cols. en 2017 optaron por administrar primero células troncales mesenquimales de tejido adiposo alogénicas y posteriormente autólogas, sin que tuvieran efectos adversos locales o sistémicos en los caballos.

De acuerdo a la predicción de Angelone, la administración de CTM-MO en las venas digitales de cascos con laminitis, mejoró significativamente las condiciones clínicas de todos los caballos tratados, y supone que regeneró la citoarquitectura del corion laminar de los cascos. Hubo disminución del infiltrado inflamatorio peri-vascular de células mononucleares, basado en sus resultados de biología molecular; donde encontraron aumento de la expresión del RNAm de citocinas anti-inflamatorias y proteínas anti-oxidantes.

Sin embargo, nosotros decidimos aplicar únicamente CTM-AMO, para no confundir los resultados entre células autólogas y alogénicas o células de tejido adiposo o de médula ósea. Nosotros pudimos comprobar por medio de histopatologías del tejido laminar de los caballos tratados, la regeneración tisular y por medio de venografías comprobamos la angiogénesis, Angelone y cols. solo dedujeron la regeneración tisular, ya que no realizaron biopsias. Pero a diferencia de su trabajo, nosotros no medimos citocinas anti inflamatorias.

Ellos propusieron que las CTM-AMO promueven la regeneración tisular por sus acciones anti-inflamatorias, así como degradación de metaloproteasas de matriz

celular, disminuyendo el daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), reclutando células endoteliales locales y sistémicas circulantes, así como estimulando angiogénesis. Las venografías que obtuvimos de los caballos con laminitis crónica tratados con CTM-AMO, apoyan también esta información, ya que observamos vasos sanguíneos de nueva formación en los sitios que no se veían antes del tratamiento, esto es en corion coronario, corion laminar y región palmar de los cascos.

Aunque sus caballos mejoraron significativamente, y a pesar de la evidencia de la angiogénesis en los caballos tratados, la regeneración tisular en el casco solo pudo ser inferida en su trabajo. Así mismo, no pudieron comprobar que sus hallazgos clínicos y venográficos eran exclusivamente por la administración de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo en caballos con laminitis, ya que éstas fueron administradas junto con plasma rico en plaquetas. Del mismo modo hubo confusión en sus datos, dado que primero administraron células alogénicas y después autólogas. Algo muy importante, es que no pudieron comprobar directamente la regeneración del corion laminar en los caballos que mejoraron de la enfermedad ya que no realizaron biopsias.

Ellos propusieron que la pérdida de células troncales es fundamental en la fisiopatología de laminitis crónica.

Como ya se mencionó, existen varias diferencias entre el trabajo de Angelone y el nuestro. Ya que nosotros sí pudimos comprobar la regeneración del corion laminar por medio de las histopatologías de las biopsias de tejido laminar.

Además de que podemos asegurar que nuestros resultados se debieron a las CTM-AMO, a diferencia de su trabajo, donde aplicaron células de tejido adiposo, alogénicas y después autólogas, aunado a que las combinaron con PRP.

Pero sí creemos, al igual que Angelone, que la pérdida de CT en caballos con laminitis crónica, es la causa de esta enfermedad, dado que al aplicar CT podemos restaurar las condiciones perdidas por la falta de éstas dentro de los tejidos del casco.

## **PRESENCIA DE CTM EN LOS TEJIDOS DEL CASCO DE LOS CABALLOS**

Carter en 2011, encontró que el factor de transcripción p63, se encuentra disminuido en caballos con laminitis crónica. Este factor tiene un papel importante en la proliferación de queratinocitos y diferenciación en la epidermis.

La epidermis es un epitelio estratificado auto renovable, en el que las células progenitoras comprometidas al linaje epidermal, de la capa basal, proliferan y se diferencian a células de capas suprabasales para formar la barrera epidermal. Al diferenciarse a queratinocitos, se presentan cambios estructurales y bioquímicos en el núcleo, asociados a la transición de un estado activo en la capa basal a un estado inactivo en el estrato cornificado (corneocitos), en donde el DNA se degrada y el núcleo se elimina. La forma y tamaño del núcleo están controlados por la envoltura nuclear (EN) que provee sitios de anclaje para varios componentes del citoesqueleto y para la cromatina. Regula la estabilidad mecánica del núcleo, regula el transporte entre núcleo y citoplasma, la organización de la cromatina y expresión de genes. Las proteínas como nesprinas-1/2/3/4, interactúan en la membrana nuclear externa, y en la parte interna, proteínas como Sun 1/2, formando puentes entre membrana externa e interna entre citoesqueleto y cromatina (Rapisarda y cols, 2017).

Rapisarda y cols. mencionan que el mantenimiento de la arquitectura nuclear, la organización de genes y la maquinaria de transcripción, tienen un papel importante en el desarrollo y regeneración tisular. Y la falta del factor de transcripción p63 en células progenitoras epidermales, altera la forma del núcleo, disminuyendo la expresión de laminina B1, laminina A/C, Sun1, Nesprinas y plectinas, disminuyendo la actividad transcripcional. En los queratinocitos en los que se pierde p63, se presentan alteraciones de la heterocromatina y forma del núcleo.

En los queratinocitos, los filamentos de queratina y las lamininas nucleares contribuyen a regular la forma nuclear y su integridad. Las proteínas nesprina, plectina y Sun1 contribuyen a la integridad epidermal.

El factor de transcripción p63 es un regulador maestro de desarrollo epidermal. Controla la expresión de genes de adhesión epitelial, señalización, y componentes

de linaje específicos del citoesqueleto como queratinas. La falta de este factor, conduce a que se presenten severos defectos en la morfogénesis epidermal. Controla la expresión de remodeladores de cromatina (Satb1, Brg1, Cbx4) que regulan la expresión de genes en células troncales epidermales durante su desarrollo. Regula la forma del núcleo y la expresión de genes asociados a la envoltura nuclear, asociados a la organización de heterocromatina. Por lo tanto p63 tiene un papel complejo integrando el citoesqueleto, envoltura nuclear y cromatina en la diferenciación de células troncales durante la morfogénesis. Diferentes proteínas asociadas a la envoltura nuclear como plectina, nesprina, y Sun1, disminuyen en queratinocitos que no expresan p63. Plectina es una proteína que une al citoesqueleto y está asociada a los filamentos de actina, filamentos intermedios e integrinas de hemidesmosomas de queratinocitos; y es también necesaria para unir el núcleo a los filamentos intermedios del citoplasma, en interacción con nesprina-3. Por lo que como resumen, la falta de plectina en queratinocitos cambia la forma del núcleo, y en general la disminución del Factor p63, causa severos defectos en la piel, apareciendo una epidermis frágil y lesiones severas, como la enfermedad conocida como epidermólisis bullosa en humanos y en caballos causa el desarrollo de laminitis (Rapisarda y cols, 2017).

Carter en 2011, menciona la presencia de células troncales en el tejido laminar de los cascos de caballos, Yang y López MJ en 2019, encuentran células troncales en el corion laminar de los cascos de caballos sanos, Lopes da Silva y cols. en el 2020, reportan la presencia de células troncales mesenquimales en el corion coronario de los cascos de caballos, y Marycz y cols. en 2021 encontraron células troncales en el corion coronario del casco de caballos sanos.

Es por esto, que es tan importante conocer que en el casco del caballo existen células troncales que mantienen la homeostasis de los tejidos internos y que la disminución o ausencia de estas células, provoca las lesiones del corion laminar y tejidos internos del casco que conocemos como laminitis.



Sabiendo que normalmente hay CT en los cascos de los caballos y los resultados que obtuvimos en este trabajo, proponemos que la pérdida de células troncales mesenquimales dentro del casco de los caballos, juega un papel fundamental en la patogenia de laminitis crónica; y la administración de CTM-AMO, puede revertir esta condición.

### **REGENERACIÓN TISULAR**

Este trabajo describe por primera vez, la técnica de obtención de biopsias de tejido laminar del casco en caballos con laminitis crónica.

Pocos estudios han descrito la técnica de biopsias laminares de cascos sanos, por acceso transmural en caballos de pie (Croser y Pollit 2006; Hanley y cols. 2009; Wattle y Hansson 2010; Gravena y col. 2012; Ribeiro y cols. 2017).

Nosotros decidimos realizar la técnica de biopsia laminar, con los caballos de pie, y así obtener mayor información de esta enfermedad sin tener que sacrificar a los caballos, como se hace en la mayoría de los trabajos de investigación en laminitis, y de ésta forma tener información que respalde la regeneración tisular de las laminas del casco en caballos tratados con células troncales mesenquimales alogénicas. La técnica que se realiza, es la descrita por Gravena y colaboradores en 2012, Gravena compara las técnicas anteriormente mencionadas, tanto a nivel microscópico como ultraestructural por medio de microscopía de transmisión, y encuentra que con su técnica, es con la que se obtiene una biopsia completa sin que se lleguen a romper o lesionar las estructuras del tejido.

Croser y Pollit, 2006, describen cambios que observan en las biopsias de caballos con laminitis aguda; encuentran separación generalizada entre dermis y epidermis a las 48 horas posteriores a la inducción de laminitis, con grandes espacios entre láminas primarias epidérmicas (LPE) y láminas primarias dérmicas (LPD). Las LPE estaban muy alargadas y sólo algunos remanentes de las LPD se veían en los espacios. Las LPD se encontraban retraídas hasta cerca de las LPE. La MB se extendía más allá de la punta de las LSE. Las fibras de colágena no se observaban

y la MB formaba vesículas vacías muy grandes (islas epidermales) en las puntas de las LES. Se observan algunas células polimorfo nucleares.

Nosotros evaluamos que ningún caballo presentó incomodidad o dolor al momento de realizar la biopsia del tejido laminar, los caballos toleraron bien el procedimiento. Posterior a la biopsia, y semanas después, ningún caballo estudiado presentó dolor o claudicación.

Observamos que el tejido laminar de caballos con laminitis crónica, es más difícil de obtener que en caballos sanos, ya que el tejido se encuentra friable o ya está necrosado, por lo que en diversas ocasiones no se puede obtener la biopsia completa como es el caso del tejido laminar sano, si no solamente se obtienen fragmentos del tejido.

Los cambios que observamos en las histopatologías tomadas antes del tratamiento mostraron que dermis y epidermis estaban separadas y las láminas alargadas, la membrana basal se encontraba lisada o retraída hacia la LPE, pero en caballos con Obel-Glasgow elevado (8 hacia arriba) no presentaban láminas dérmica o epidérmicas, o estaban necrosadas, la membrana basal estaba en fragmentos, las fibras de colágena no se observaban o estaban distribuidas en diferentes partes de lo que quedaba de tejido. A nivel ultraestructural, se presentaba gran cantidad de espacios electrolúcidos entre las células epiteliales, compatibles con edema, la ultra estructura de la membrana basal se observa irregular y con pérdida de electrodensidad. Las células basales mostraron núcleos con acúmulos de cromatina, los hemidesmosomas se encontraban disgregados o separados, y en menor número del que debieran ser.

A partir de estas biopsias, obtuvimos resultados trascendentales sobre la regeneración tisular, la cual fue notable. No hubo evidencia de mala cicatrización, ni se formaron cicatrices de ningún tipo, al menos en el sitio de la biopsia, en todos los caballos evaluados. Esta información sugiere que los cascos de los caballos

quizá mantienen un ambiente bioquímico similar al observado en estados ontogénicos. Esta hipótesis puede tener sustento de estudios en el cerebro, en donde el hipotálamo del adulto presenta un potencial grande de plasticidad debido a la presencia de moléculas de glican poli-sialilated que favorecen la remodelación tisular (Theodosios y cols. 2008; Bonfanti, Theodosios 2009). Estudios enfocados en comparar la composición molecular del tejido conectivo de los cascos en diferentes etapas de la vida, puede dar evidencia para evaluar esta hipótesis.

En el 2009, Nourian y cols. realizaron un estudio de lesiones ultra estructurales en ponies con laminitis ocasionada por hiperinsulinemia, encontrando que todas las láminas se encontraban elongadas con considerables células basales epidermales en mitosis, separación de la unión dermis-epidermis, separación de la lamina densa de la MB de la membrana de las células basales epidermales, engrosamiento de la lamina densa de la MB, disminución en el número de hemidesmosomas e infiltración de algunos leucocitos. Las lesiones encontradas en estos ponies fueron tanto de laminitis aguda como crónica, características de laminitis ocasionada por hiperinsulinemia. En humanos que presentan diabetes mellitus, se ha comprobado que a nivel renal, la MB glomerular también se encuentra engrosada y separada, siendo una de las primeras manifestaciones de nefropatía diabética, causando falla renal; este engrosamiento es causado por exceso de colágena IV y laminina, y se piensa que en caballos, pueda ser equivalente este engrosamiento, ya que la colágena IV y laminina, son constituyentes de la MB laminar (Nourian y cols. 2009).

### **TERMOGRAFÍAS**

La termografía es una técnica no invasiva que detecta y mide la radiación infrarroja emitida espontáneamente por cualquier objeto que tenga temperatura arriba del cero absoluto (-273.16°C), cualquier objeto la emite, incluso el hielo. El término “imagen térmica” se refiere a la representación gráfica de la radiación electromagnética emitida por una superficie, la cual es convertida en una imagen visible (Redaelli y col. 2014).

La radiación infrarroja consiste de ondas electromagnéticas cuya longitud es

demasiado larga para ser detectada por el ojo humano y es percibida como calor. A mayor la temperatura del objeto, la onda de la radiación infrarroja es más pequeña (Redaelli y col. 2014).

En un organismo vivo se basa en la circulación y metabolismo de los tejidos. La temperatura corporal cambia al haber cambios en la perfusión local. Regularmente se pueden ver las venas más calientes que las arterias, dado que estas drenan de tejidos metabólicamente activos. Y ésta es la base del uso de la termografía (Redaelli y col. 2014).

La termografía puede detectar “puntos calientes” por inflamación o daño, así como “puntos fríos” por trombosis venosa, edema, infartos o un órgano dañado. Esta técnica no proporciona un diagnóstico, pero ayuda a conocer el área de inflamación cercana.

En el pie del caballo se usa para detectar problemas como laminitis, síndrome navicular, abscesos, escarza. La diferencia de temperatura de más de un grado centígrado en cualquiera de los cascos es anormal. La laminitis es detectada como un aumento de temperatura entre la banda coronaria y la pared del casco de más de 1 a 2 °C. La termografía puede ser útil al detectar la laminitis antes de que aparezcan los signos clínicos, y se puede usar para evaluar a los pacientes que tienen alto riesgo de desarrollar laminitis (Eddy y cols. 2001).

Un hallazgo interesante en nuestro estudio es que a pesar de que los caballos tratados con CTM-AMO mejoraron su condición clínica y mejoró la citoarquitectura del tejido lamelar, la temperatura de los cascos se mantuvo elevada en todos los caballos tratados. Esto podría hacer pensar que medir la temperatura de los cascos no es un procedimiento de monitoreo sensible para dar seguimiento a la enfermedad. Sin embargo, el hecho de que la recuperación vascular es parcial en todos los caballos tratados, sugiere algo diferente. Esta respuesta pudiera indicar que permanece cierto grado de inflamación que produce que la temperatura permanezca alta en el tejido avascular de los cascos que siguen recuperándose. Sin embargo, la temperatura de los cascos más alta que lo normal, no está

relacionada a inflamación crónica ya que la claudicación y el dolor disminuyeron en los caballos tratados. Alternativamente, la falta de una recuperación completa del lecho vascular puede poner en riesgo la disipación del calor de los cascos. Está establecido que los lechos vasculares pueden funcionar como enfriadores de tejidos en otras partes del cuerpo en mamíferos (Radiator Theory, Falk 1990); sin embargo, en nuestro conocimiento, esta función no está aún estudiada en la red vascular del casco de los caballos. Deben realizarse estudios a largo plazo de la temperatura y el lecho vascular del casco en los caballos tratados para evaluar esta posibilidad.

### **ANGIOGÉNESIS**

La neo-vascularización es el proceso por el que el organismo puede formar vasos sanguíneos donde los necesite un tejido o un órgano. Se lleva a cabo por dos procesos independientes: angiogénesis, proceso en el que se forman nuevos vasos sanguíneos provenientes de un precursor existente y vasculogenesis, cuando se forman vasos sanguíneos *de novo*, mediados por células progenitoras que se diferencian a endoteliales (King y cols. 2014; Schabbir y cols. 2015; Cortéz-Toledo y cols. 2018).

Actualmente las CTM se están utilizando como estrategia de tratamiento en pacientes con heridas crónicas que no cicatrizan, ya que se ha visto que tienen características angiogénicas tales como que se pueden diferenciar a células endoteliales y pericitos, y presentan señalización parácrina liberando diferentes factores pro-angiogénicos.

En los tejidos lesionados e inflamados, donde se encuentra un medio hipóxico, hay altos niveles de Factor Derivado Estromal-1 (SDF-1) y Factor Inducible de Hipoxia-1 (HIF-1), los cuales median la respuesta de las CTM al activar su autoreplicación y liberar factores pro-angiogénicos como Factor de crecimiento vasculo-endotelial (VEGF), Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Factor de crecimiento placentario, angiopoyetina, y SDF-1. La vía de señalización VEGF, es una de las vías más importantes en regular el desarrollo vascular y la diferenciación endotelial. También

la estimulación mecánica tiene un papel importante para regular la diferenciación de las CTM. El golpe de los líquidos en los vasos sanguíneos, puede inducir la diferenciación endotelial de las CTM (King y cols. 2014; Gu y cols. 2017).

Los cascos de los caballos se encuentran irrigados por un lecho vascular altamente anastomosado, formado por el plexo coronario y las papilas coronarias, el plexo venoso sub-laminar, las papilas terminales, los vasos circunflejos y los plexos venosos de la suela y los talones (Fig. 2A).

En los caballos con laminitis, la rotación de la falange irrumpe esta red vascular compleja, así como la presencia de microtrombos en los pequeños vasos. Como se observa en la figura 2B, los cascos prácticamente se tornan avasculares; en el lecho vascular de los caballos con laminitis crónica, en las venografías se observa que hay defectos en el llenado del medio de contraste excepto en vasos coronarios y el plexo de los talones, ahí los vasos se observan irregulares y engrosados. La severidad del daño vascular se correlaciona con la severidad de los signos.

Obtuvimos venografías de caballos con laminitis crónica, tratados con CTM-AMO, teniendo como evidencia angiogénesis del plexo coronario, dorsal laminar y de los talones. Estos datos pueden interpretarse de 3 formas diferentes. 1) los vasos sanguíneos de los cascos mantienen su habilidad para producir células endoteliales capaces de producir nuevos vasos sanguíneos funcionales; así, la administración de células troncales mesenquimales pueden liberar células troncales locales. 2) La administración de CTM-AMO comprometen al linaje celular endotelial para estimular la angiogénesis en los cascos. 3) las células troncales mesenquimales favorecen el reclutamiento de células troncales circulantes que se comprometen al linaje endotelial.

Está claro con las condiciones experimentales usadas, que tanto el plexo coronario como el plexo de los talones, contienen nichos que facilitan la angiogénesis en condiciones adecuadas.

Este proceso semeja las secuencias embriogénicas, ya que la vasculogenesis en el casco embrionario sigue un patrón de crecimiento semejante de proximal a distal (Parks, 2017).

## **ESTUDIOS FUTUROS**

En estudios futuros, se requerirá incrementar el número de caballos control para fortalecer este trabajo. Nuestra investigación no reveló cómo es que las CTM-AMO promueven la regeneración tisular; ya que la reconstitución vascular fue solo parcial (Angelone y cols. 2017; King 2014; Gu y cols. 2017). Las CTM-AMO pueden haber migrado del nicho vascular y colonizar sitios relativamente avasculares. Así también, las CTM-AMO pueden producir y liberar factores solubles o exosomas (Scabbir y cols. 2015; Ching y cols. 2018; Zhang y cols. 2014; Bier y cols. 2018), que pueden fortalecer las células troncales locales para proliferar, diferenciarse y regenerar el tejido dañado.

Se debe tomar en cuenta otra consideración más respecto al uso de células troncales alogénicas. Se piensa que la posibilidad de inducir una respuesta inmunológica, aumenta al usar células alogénicas (Kim, Adams 2017). Nuestros resultados y los resultados publicados de otros autores (Angelone y cols. 2017; Augello y cols. 2007; Kol y cols. 2015) apoyan el hecho que la administración de células troncales alogénicas es segura en caballos ya que su administración no causa efectos adversos ni rechazo. Y a pesar de que muchos autores consideran seguro el uso de células troncales autólogas, estudios recientes muestran que estas células pueden desarrollar mutaciones *de novo* en DNA mitocondrial que produce neo-epítomos inmunogénicos (Deuse y cols. 2019), por tanto, aumentando la posibilidad de reacciones inmunológicas (Nishikawa y cols. 2008; Bix y cols. 1991; De Almeida y cols. 2013; Barrachina y cols. 2017).

En estudios futuros, se deben investigar las medidas encaminadas a prevenir la pérdida de células troncales, induciendo tolerancia inmune en los cascos o estimular auto inmunidad en caballos con laminitis aguda.

Se debe de empezar a considerar factores importantes en el uso terapéutico de CTM, como son, el sitio de administración, el tiempo de pases en cultivo, estado de la enfermedad y cantidad de células administradas, ya que esto puede afectar su

efectividad. Se han estudiado diferentes vías de administración de las CTM, entre las que se encuentran intravenosa, intraperitoneal, intra arterial, in situ.

Algo que se ha estudiado y merece futuras investigaciones más, es que aunque se aumente la dosis administrada, no se mejoran los efectos terapéuticos de las células (Ma y cols. 2014).

### **PREGUNTAS QUE RESOLVER**

Aún existen muchas preguntas sobre el uso clínico de células troncales: ¿Cuál es el tejido óptimo para obtener células troncales para cada aplicación clínica? ¿Cuál es la dosis indicada de células troncales para tratar cada problema? ¿Cuáles son los mejores protocolos de administración? ¿Cuál es la mejor vía de administración, local o intravenoso? ¿Se deben de aplicar factores de crecimiento o plasma rico en plaquetas para dirigir la función de las células implantadas? Éstas y otras preguntas requieren diversas investigaciones.

Nuestra pregunta principal fue la evaluación del efecto terapéutico de CTM-AMO para controlar dolor, inflamación y regenerar tejido lamelar en caballos con laminitis crónica. En donde demostramos la efectividad de las CTM-AMO para regenerar tejidos y disminuir la inflamación y el dolor en caballos con laminitis crónica.

### **12. CONCLUSIÓN**

Los resultados de este trabajo demostraron que la administración de células troncales mesenquimales de médula ósea alogénicas, en cascos de caballos con laminitis crónica:

- 1) regeneraron la citoarquitectura del corion laminar,
- 2) regeneraron segmentos del lecho vascular
- 3) mejoraron clínicamente el paso de los caballos tratados, sin tener efectos adversos locales o sistémicos, durante el tiempo del estudio.
- 4) disminuyeron el dolor y la claudicación



En conclusión, la administración de células troncales mesenquimales de médula ósea, por vía regional intravenosa de la vena digital palmar, mejoran la condición clínica, promueven la angiogénesis y regeneración tisular del corion laminar de los cascos de caballos con laminitis crónica, disminuyen la inflamación y el dolor y mejoran la calidad de vida de los pacientes, evitando así que los caballos afectados tengan que ser sacrificados.

El procedimiento es seguro, inocuo (Kol y cols. 2015), y efectivo al menos en el período de 6 meses. En futuros estudios, es necesario aumentar el número de la muestra y el tiempo de seguimiento para realmente apreciar los beneficios del tratamiento a largo plazo y conocer si se necesitan más administraciones de células troncales mesenquimales. Se debe también de estudiar si existen métodos menos invasivos para la administración, aunque estudios previos, demostraron que la administración a través de esta vía no afecta la eficiencia y eficacia terapéutica de las células, si la dosificación es correctamente calculada (Angelone y cols. 2017). También es de suma importancia evaluar y estudiar los efectos del herraje y recorte de los cascos en caballos con laminitis, tratados con CTM.

Finalmente, el uso de CTM-AMO para el manejo del dolor en caballos con laminitis es un tema que requiere mayor investigación, en un futuro próximo va a ganar un gran uso, de acuerdo a nuestros resultados obtenidos.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis que la pérdida de células troncales es de hecho, el evento crítico que conlleva a laminitis crónica (Angelone y cols. 2017). Por tanto se deben de tomar medidas encaminadas para inducir tolerancia inmunitaria hacia el tejido de los cascos y así prevenir esta pérdida. De acuerdo a esto, la administración de antígenos mesenquimales obtenidos de cascos con laminitis, en la cámara anterior del ojo, para inducir ACAID, puede ser una investigación para años por venir (Martínez-Alcantar y cols. 2019). La desviación inmune asociada a la cámara anterior del ojo (ACAID, por sus siglas en inglés), es un proceso que puede proteger de daños inmunes futuros, cambiando

el ambiente a un perfil anti inflamatorio. Es un fenómeno que ocurre al introducir un antígeno en la cámara anterior del ojo y se inicia una respuesta inmune antígeno específica en todo el cuerpo, suprimiendo respuestas Th1 e induciendo FoxP3 o células Tregs, que inhiben la diferenciación de linfocitos, así como la función de células T citotóxicas. La cual puede llegar a usarse como una estrategia profiláctica en diferentes enfermedades inflamatorias.

### **13. REFERENCIAS**

1. Angelone M, Conti V, Biacca C, Battaglia B, Pecorari L, Piana F, et al. The contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: A proof of concept. *Int J of Molecular Sci* 2017;18:2122.
2. Ardanaz N, Vázquez FJ, Romero A, Remacha AR, Barrachina L, Sanz A, et al. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: Effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Vet Res* 2016;12:65.
3. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2007;56(4):1175-1186.
4. Barberini DJ, Paiva Freitas NP, Sartori-Magnoni M, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res and Therapy* 2014;5:25.
5. Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades M, et al. Priming equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells with proinflammatory cytokines: Implications in immunomodulation-Immunogenicity balance, cell viability and differentiation potential. *Stem Cells and Dev* 2017;26(1).
6. Bier A, Berenstein P, Kronfeld N, Morgoulis D, Ziv-Av A, Goldstein H, et al. Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy. *Biomaterials* 2018;174: 67-78.
7. Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 1991;349:329-331.

8. Black SJ. Extracellular matrix, leukocyte migration and laminitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2009;129(3–4):161–163.
9. Bonfanti L, Theodosis DT. Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell Adhesion and Migration* 2009;3(1):43-50.
10. Brandao JS, Alvarenga ML, Pfeifer JPH, dos Santos VH, Fonseca-Alves CE, Rodrigues M, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. *Res in Vet Sci* 2018;118:423-430.
11. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!. *Stem Cells Translational Medicine* 2017;00:1445–1451.
12. Carter R, Engiles J, Megee S, Senoo M, Galantino-Homer H. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Equine Vet J* 2011;43(5):543-551.
13. Carrade DD, Borjesson DL. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 2013;63:207-217.
14. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Jorge LL, Conceição ML, et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013;65(4):939-945.
15. Carvalho AM, Yamada ALM, Martins JRB, Maia L, Gloim MA, Deffune E, et al. Isolation and characterization of equine peripheral blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Pesq Vet Bras* 2013;33(9):1151-1154.
16. Cassano J, Schnabel L, Betancourt A, Antczak D, Fortier L. Mesenchymal Stem Cell Therapy: Clinical Progress and Opportunities for Advancement. *Current Pathology Reports* 2015;3(1):1-7.
17. Cheville NF, Stasko J. Techniques in Electron Microscopy of Animal Tissue. *Veterinary Pathology* 2014;51(1):28–41.
18. Ching RC, Wiberg M, Kingham PJ. Schwann cell-like differentiated adipose stem cells promote neurite outgrowth via secreted exosomes and RNA transfer. *Stem Cell Res and Therapy* 2018;9:266.

19. Collins F, Grady SEO. Focus Meeting on the Foot. AAEP FOCUS ON THE FOOT PROCEEDINGS; 2014; USA: A Practical Approach to Managing Acute Laminitis.
20. Cortez-Toledo E, Rose M, Agu E, Dahlenburg H, Yao W, Nolta JA, et al. Enhancing retention of mesenchymal stem cells with prosurvival factors promotes angiogenesis in a mouse model of limb ischemia. *Stem Cells and Development* 2018;0:0.
21. Croser E, Pollitt, C. Acute laminitis: descriptive evaluation of serial hoof biopsies. *Proceedings of the 52nd Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*; 2006; USA:AAEP, 2006:52:542–546.
22. Dalla Costa ED; Stucke D; Dai F; Minero M; Leach MC; Lebelt D. Using the horse Grimace scale (HGS) to assess pain associated with acute laminitis in horses (*Equus caballus*). *Animals* 2016;6:47.
23. De Almeida PE, Ransohoff JD, Nahid A, Wu JC. Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives. *Circ Res* 2013;112:549-561.
24. De Lima LR. Histologic and inflammatory lamellar changes in horses with oligofructose-induced laminitis treated with a CXCR1/2 antagonist. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 2016;36(1):13–18.
25. De Los Angeles A. Hallmarks of pluripotency. *Nature* 2015;525(7570):469-478.
26. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. *Theriogenology* 2011;75:1431-1443.
27. De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JL, et al. In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A*, 2012;81(4):312-323.
28. Deuse T, Hu X, Agbor-Enoh S, Koch M, Spitzer MH, Gravina A, et al. De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nature Biotechnology*. Letters 2019.

29. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–317.
30. Douthit TL, Bormann JM, Bello NM. Assessing the association between hoof thermography and hoof Doppler ultrasonography for the diagnosis of lameness in horses. *J Equine Vet Sci* 2014;34(2):275-280.
31. Driessen B, Bauquier SH, Zarucco L. Neuropathic Pain Management in Chronic Laminitis. *Vet Clin of North America, Equine Practice* 2010;26:315-337.
32. Durham AE. Equine Metabolic Syndrome. In *Equine Laminitis* 2016;329–333.
33. Eddy AL, Van Hoogmoed LM, Snyder JR. The role of thermography in the management of equine lameness. *Veterinary Journal* 2001;162(3):172–181.
34. Eustace R. Equine laminitis. In: Belknap JK, Geor R, editors. *Equine Laminitis*. Willey, Blackwell, Iowa, USA, 2017:91-101.
35. Faleiros RR, Belknap JK. Leukocytes and Inflammatory signaling in Laminitis: Leukocytes. In: Belknap JK, Geor R, editors. *Equine Laminitis*. Willey, Blackwell, Iowa, USA, 2017:91-101.
36. Falk D. Brain evolution in *Homo*: The “radiator” theory. *Behavioral and Brain Sci* 1990;13:333-381.
37. Fayyad-Kazan H, Faour WH, Badran B, Lagneaux L, Najjar M. The immunomodulatory properties of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are defined according to multiple immunobiological criteria. *Inflamm. Res.* 2016;65(6):501–510.
38. Flores-Figueroa E, Montesinos JJ, Mayani H. Células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigacion Clinica* 2006;58(5):498–511.
39. Fortier LA, Travis AJ. Stem Cells in Veterinary Medicine. *Stem Cells* 2014:235–245.

40. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res and Therapy* 2010;1:2.
41. Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Skka M, Buhe V, et al. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell* 2017; 8(9):644-661.
42. Gravena K, Sampaio R, Dias D, Canola P, Peiró J, de Lacerda-Neto J. Evaluation of the integrity of Horse Hoof Dermal and Epidermal Tissues Collected by Dorsal Transmural Access. *J of Equine Vet Sci* 2012;32(12):858-862.
43. Gu W, Hong X, Potter C, Qu A, Xu Q. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation* 2017;24:e12324.
44. Hanly BK et al. Use of serial laminar tissue collection via biopsy in conscious healthy horses. *American Journal of Veterinary Research* 2009;70(6):697–702.
45. Hoogduijn MJ. Are mesenchymal stromal cells immune cells? *Arthritis Research & Therapy* 2015.
46. Julius D, Bausbam AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001; 413(September):203–210.
47. Jung JS, Volk C, Marga C, Navarrete Santos A, Jung M, Rujescu D, et al. Adipose-derived stem/stromal cells recapitulate aging markers and show reduced stem cell plasticity affecting their adipogenic differentiation capacity. *Cellular Reprogramming* 2019;21(4):187-199.
48. Karikoski N, Patterson-Kane J, Asplin K, McGowan T, McNutt M, Singer E, et al. Morphological and cellular changes in secondary epidermal laminae of horses with insulin-induced laminitis. *American Journal of Veterinary Research* 2014;75(2):161–168.

49. Kasashima Y, Ueno T, Tomita A, Goodship AE, Smith RKW. Optimization of bone marrow aspiration from the equine sternum for the safe recovery of mesenchymal stem cells. *Equine Veterinary Journal* 2011;43(3):288-294.
50. Keating A. Mesenchymal stromal cells: New directions. *Cell Stem Cell* 2012;10(6):709-716.
51. Kim SC, Adams AB. Pluripotent stem cells that evade the immune radar. *Nature Biotechnology* 2017;35(8):722-723.
52. King A, Balaji S, Keswani SP, Crombleholme TM. The role of stem cells in wound angiogenesis. *Advances in wound Care* 2014;10:614-625.
53. Kol A, Wood JA, Carrade HDD, Gillette JA, Bohannon-Worsley LK, Puchalski SM, et al. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cells Research Ther* 2015;6:73.
54. Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to engineer the therapeutic effect. *Stem Cells and Development* 2017;26(9):617-631.
55. Lanza R, Atala A. *Essentials of Stem Cell Biology*. Third ed. 2013.
56. Laskoski LM, Valadao C, Dittrich R, Deconto I, Faleiros R, et al. An update on equine laminitis. *Ciência Rural* 2016;46(3):547–553.
57. Lecchi C, Dalla Costa E, Lebelt D, Ferrante V, Canali E, Cecilian F, et al. Circulating miR-23b-3p, miR-145-5p and miR-200b-3p are potential biomarkers to monitor acute pain associated with laminitis in horses. *Animal* 2018;12(2): 366-375.
58. Leise B. Leukocytes and Inflammatory signaling in Laminitis: Inflammatory Signaling. In: Belknap JK, Geor R editors. *Equine Laminitis*. Willey, Blackwell, Iowa, USA, 2017:102-114.
59. Leise B. The role of neutrophils in equine laminitis. *Cell and Tissue Res* 2018;(371):541-550.
60. Leme F, Marval C, Santos R, Faleiros R. Com Ketoprofeno, Fenilbutazona E Flunixin Meglumine. 2010(ii):241–250.



61. Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Femand JP et al. Galectin-1 and Semaphorin-3A Are Two Soluble Factors Conferring T-Cell Immunosuppression to Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell. *Stem Cells and Development* 2010;19(7):1075–1079.
62. Lopez MJ, Jarazo J. State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Veterinary Journal* 2015;47(2):145–154.
63. Lopez da Silva L, Silveira MD, da Costa Garcia CAS, Bencke P, Ferreira MC, Beyer NN. Coronary corium, a new source of equine mesenchymal stromal cells. *Veterinary Research Communications* 2020; 44:41-49.
64. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation* 2014;21(2):216-225.
65. Martínez-Alcantar L, Talavera-Carrillo DK, Pineda-Salazar JU, Ávalos-Viveros M, Gutiérrez-Ospina G, Philips-Farfán BV, et al. Anterior chamber associated immune deviation to cytosolic neural antigens avoids self-reactivity after optic nerve injury and polarizes the retinal environment to an anti-inflammatory profile. *J Neuroimmunology* 2019;333(476964).
66. Marycz K, Pielock A, Kornicka-Garbowska K. Equine Hoof Stem Progenitor Cells (HPC) CD29+/Nestin+/K15+- a Novel dermal/epidermal Stem Cell population with a Potential Critical role for laminitis Treatment. *Stem Cell Reviews and Reports* 2021;17:1478-1485.
67. Michler JK, Hillmann A, Saykovic V, Mulling CKW. Horse hair follicles: A novel dermal stem cell source for equine regenerative medicine. *Cytometry Part A*, 2018;93(1):104-114.
68. Morrison S, Dryden V, Bras R, Morrell S. How to Use Stem Cells in Clinical Laminitis Cases. 2014;60:499–503.
69. Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras C. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Review Molecular Cell Biology* 2008;9:725-729.

70. Nourian A, Asplin K, McGowan C, Sillence M, Pollit C. Equine laminitis: ultrastructural lesions detected in ponies following hyperinsulinaemia. *Equine veterinary journal* 2009;41(7):671–677.
71. Owens SD, Kol A, Walker NJ, Borjesson DL. Allogeneic mesenchymal stem cells treatment induces specific alloantibodies in horses. *Stem Cells International* 2016; DOI: 10.1155/2016/5830103
72. Parks AH. Anatomy and function of the equine digit. In: Belknap JK, Geor R editors. *Equine Laminitis*. Willey, Blackwell, Iowa, USA, 2017:22-38.
73. Pezzanite LM, Fortier LA, Antczak DF, Cassano JM, Bronahan MM, Miller D, et al. Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses in vivo. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(54).
74. Pollitt CC. Equine laminitis: A revised pathophysiology. *American Association of Equine Practitioners* 1999;45:188–192.
75. Pollitt C. Equine Laminitis. *Proceedings of the AAEP* 2002;49(Stashak 2002):2002–2004.
76. Pollitt CC. Lamellar function at the cellular level. In: Belknap JK, Geor R editors. *Equine Laminitis*. Willey, Blackwell, Iowa, USA, 2017:22-38.
77. Ranera B, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2011;144(1–2):147–154.
78. Rapisarda V, Malashchuk I, Asamaowei IE, Poterlowicz K, Fessing MY, Sharov AA et al. p63 Transcription factor regulates nuclear shape and expression of nuclear envelope-associated genes in epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2017;(137):2157-2167.
79. Redaelli V, Bergero D, Zucca E, Ferrucci F, Costa L, Crosta L, et al. Use of thermography techniques in equines: Principles and applications. *Journal of Equine Veterinary Science* 2014;34(3):345–350.

80. Reesink HL, Sutton RM, Shurer CR, Peterson RP, Tan JS, Su J, et al. Galectin-1 and galectin-3 expression in equine mesenchymal stromal cells (MSCs), synovial fibroblasts and chondrocyte, and the effect of inflammation on MSC motility. *Stem cell Research & Therapy* 2017; 8:243.
81. Renzi S, Ricco S, Dotti S, Sesso L, Grolli S, Cornali M, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: A clinical report. *Res Vet Sci* 2013;(95):272-277.
82. Ribeiro R, Mendez H, Valadares R, Paz C, de Oliveira A, Junior O, et al. A Novel Equine Hoof Lamellar Tissue Biopsy Technique. *Journal of Equine Veterinary Science* 2017;49(49):63–68.
83. Rucker A, Redden RF, Arthur EG, Reed SK, Hill BW, Dziuban EM, et al. How to perform the digital Venogram. In: *AAEP proceedings USA*, 2006;52:526-530.
84. Salazar H, Jara-Oseguera A, Rosenbaum T. El canal TRPV1 como diana para tratar el dolor. *Revista de Neurologia* 2009;48(7):357–364.
85. Salem H, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010;28(3):585-596.
86. Schabbir A, Cox A, Rodríguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. *Stem Cells and Development* 2015;24(14):1635-1647.
87. Schnabel LV; Fortier LA; McIlwraith CW; Nobert KM. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Veterinary Journal* 2013;197(3):570–577.
88. Schnabel L, Pezzanite L, Antczak D, Felipe M, Fortier L. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem cell research & therapy* 2014;5(1):13.
89. Siniscalco D, Giordano C, Galderisi U, Luongo L, de Novellis V, Rossi F, et al. Long-Lasting Effects of Human Mesenchymal Stem Cell Systemic

Administration on Pain-Like Behaviors, Cellular, and Biomolecular Modifications in Neuropathic Mice. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 2011;5.

90. Steelman SM, Chowdhary BP. Plasma proteomics shows an elevation of the anti-inflammatory protein APOA-IV in chronic equine laminitis. *Veterinary Res* 2012;8(179).
91. Steelman SM, Johnson D, Wagner B, Stokes AM, Chowdhary BP. Cellular and humoral immunity in chronic equine laminitis. *Vet Immunology and Immunopathology* 2013;153 (3-4):217-226.
92. Theodosios DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiology Rev.*2008;88: 983-1008.
93. Trela J, Spriet M, Padgett K, Gallupo L, Vaughan B, Vidal M. Scintigraphic comparison of intra-arterial injection and distal intravenous regional limb perfusion for administration of mesenchymal stem cells to the equine foot. *Equine Veterinary Journal* 2014;46(4):479–483.
94. Van Hecke L, Magri C, Duchateau L, Beerts C, Geburek F, Suls M y cols. Repeated intra-articular administration of equine allogeneic peripheral blood-derived mesenchymal stem cell does not induce a cellular and humoral immune response in horses. *Veterinary Immunology and immunopathology* 2021; 239.110306.
95. Viñuela-Fernández I, Jones E, Chase-Topping ME, Price J. Comparison of subjective scoring systems used to evaluate equine laminitis. *The Veterinary Journal* 2011;188(2):171–177.
96. Visser MB, Pollitt CC. The timeline of lamellar basement membrane changes during equine laminitis development. *Equine Veterinary Journal* 2011;43(4):471–477.
97. Wang Y, Tian M, Wang F, Chin Heng B, Zhou J, Cai Z, et al. Understanding the Immunological Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Allogeneic

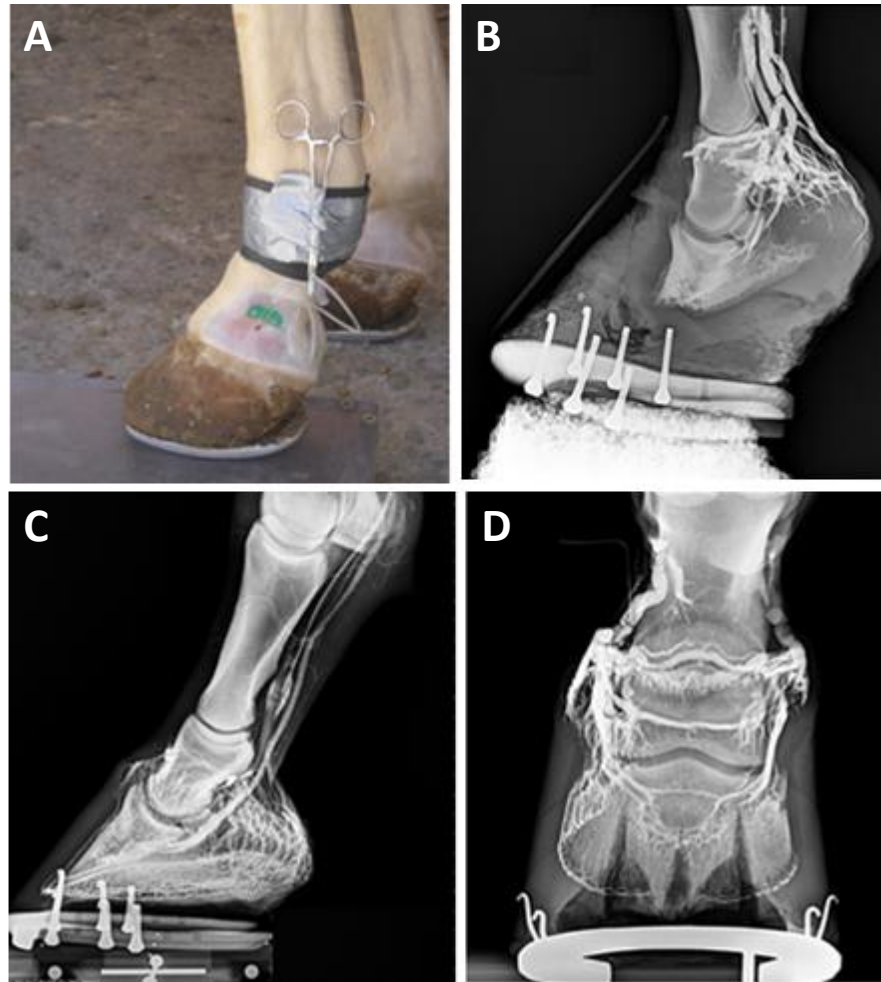
Transplantation: from the aspect of Major Histocompatibility Complex Class I. *Stem Cells and Development* 2019;28(17):1141-1150.

98. Wen HL, Young ML, Jee YK, Seokwon K, Sangmin K, Kyu HK, et al. Transient receptor potential vanilloid-1 mediates heat-shock-induced matrix metalloproteinase-1 expression in human epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 2007;127:2328-2335.
99. West M. The Odd Couple : The Professor and the Thermographer. Available at: <http://jent.net.au/wp-content/uploads/2014/12/FLIR-Laminitis-2007-094-ProfPollit.pdf>.
100. Wylie C, Collins S, Verheyen K, Newton J. Risk factors for equine laminitis: A systematic review with quality appraisal of published evidence. *Veterinary Journal* 2012;193(1):58–66.
101. Yang Q, Lopez MJ. The equine Hoof: Laminitis, Progenitor (stem) Cells, and Therapy development. *Toxicologic Pathology* 2019.
102. Yu H, Fischer G, D Ebert A, Wu H, Bai X, Hogan QH. Analgesia for neuropathic pain by dorsal root ganglion transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cell: initial results. *Molecular Pain* 2015;11(5).
103. Zayed M, Adair S, Ursini T, Schumacher J, Misk N, Dhar M. Concepts and challenges in the use of mesenchymal stem cells as a treatment for cartilage damage in the horse. *Res. Vet. Sci.* 2018;118:317-323
104. Zhang JC, Zceng GF, Wu L, Ou Yang LY, Li WX. Bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing human basic fibroblast growth factor increase vasculogenesis in ischemic rats. *Brazilian J Medical and Biological Res* 2014;47(10):886-894.

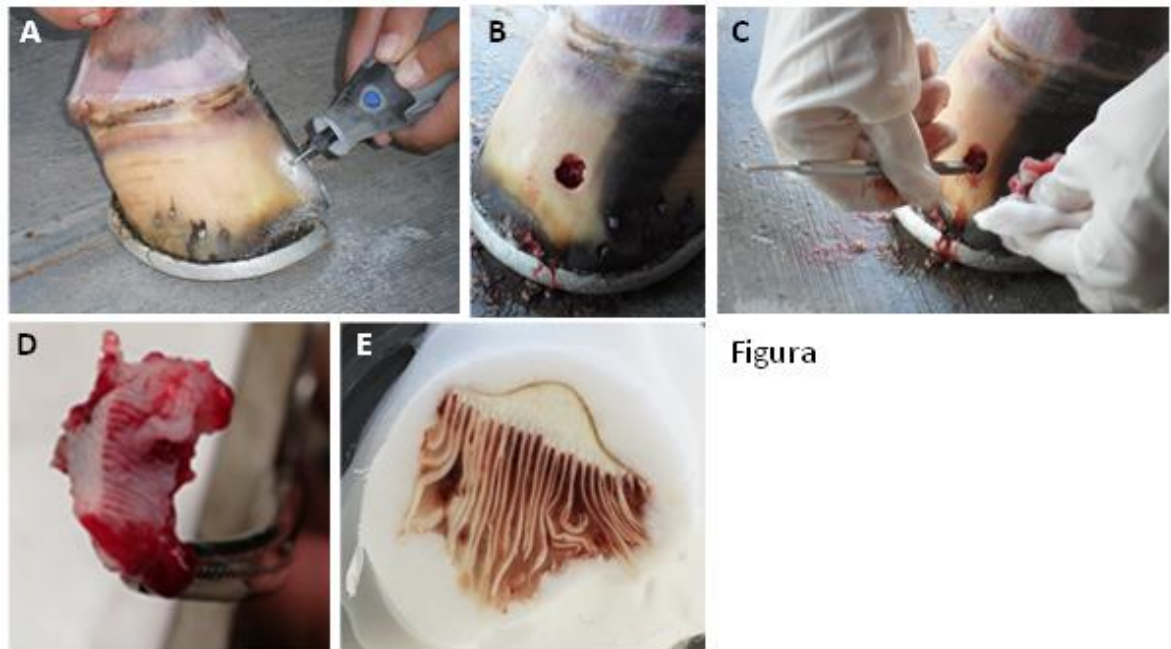
## 14. ANEXOS

<b>ESCALA MODIFICADA DE OBEL GLASGOW</b>	
ESCALA DINÁMICA: SISTEMA OBEL	
VALOR	DESCRIPCIÓN
1	Cambio frecuente de peso entre manos, no claudicación al paso
2	No resiste que se levante una mano, no se resiste a caminar, pero claudica
3	Se resiste a que se levante una mano, se resiste a caminar
4	Camina sólo si se le fuerza
ESCALA ESTÁTICA: ESCALA COMPUESTA DE GLASGOW	
1	No dolor: comportamiento normal
2	Dolor ligero: irritable, inquieto, disminución apetito
3	Dolor ligero: 2 + se resiste al manejo
4	Dolor ligero-moderado: 3 + parado al fondo de caballeriza o de espaldas a la puerta
5	Dolor moderado: 4 + abierto de manos, aumento de pulso digital
6	Dolor moderado-severo: 5 + decúbito constante, FC >44/min, FR >24/min
7	Dolor moderado-severo: 6 + sudoración, temblores musculares, movimientos de cabeza
8	Dolor severo: 7 + no se mueve
9	Dolor severo-extremo: 8 + cuando está de pie, no soporta su peso
10	Dolor extremo: 9 + decúbito permanente, agonizante

**ANEXO 1: TOMADA Y MODIFICADA DE: Driessen B, Bauquier SH, Zarucco L. Neuropathic Pain Management in Chronic Laminitis. Vet Clin of North America Equine Practice 2010;26:315-33.**



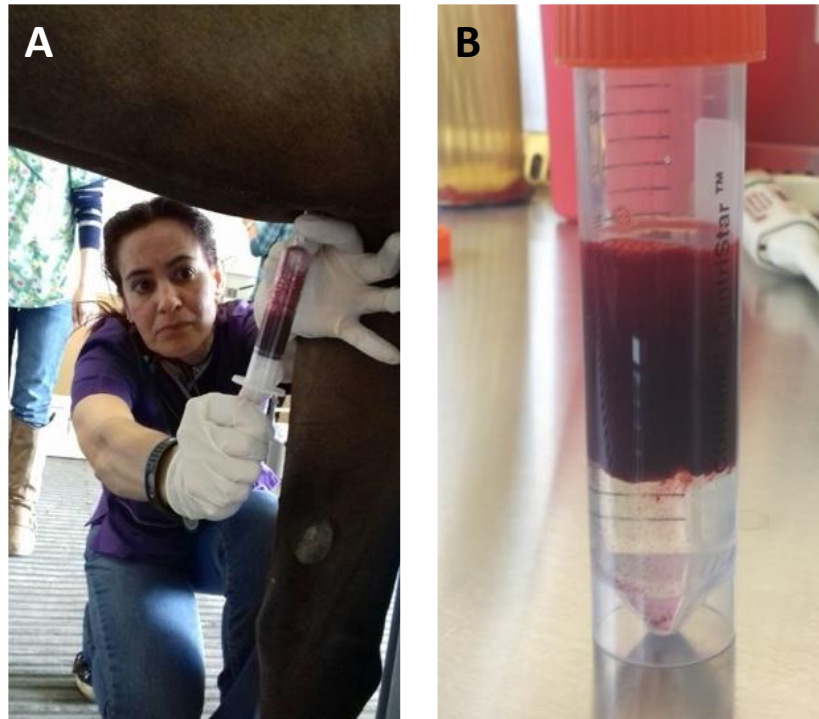
**ANEXO 2: Técnica de venografía. A. se muestra la colocación de la mariposa y la posición de las pinzas al ser inyectado el medio de contraste para realizar la venografía. B. Venografía latero-lateral de caballo con laminitis crónica antes de la aplicación del tratamiento con CTM. C. Venografía latero-lateral de caballo sano. D. Venografía dorso-palmar de caballo sano.**



Figura

**ANEXO 3: Técnica de biopsia lamelar. A. Perforación de la muralla del casco mediante un dremel. B. Perforación de la muralla del casco hasta llegar a corion laminar. C. Obtención de tejido laminar por medio del escariador de Frahm. D. Tejido laminar obtenido por medio de biopsia laminar. E. Tejido laminar congelado y embebido en Tissue Teck®.**



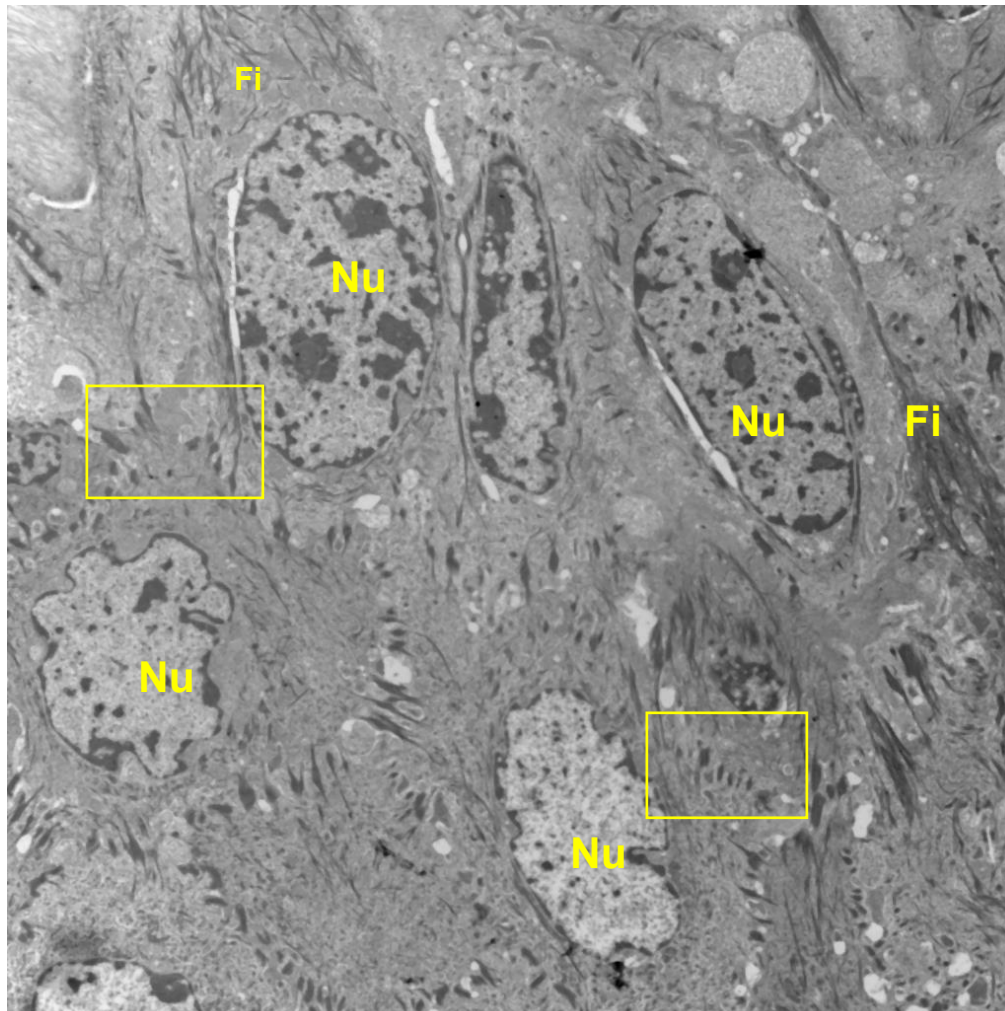


**ANEXO 4: A. Obtención de médula ósea de esternón de caballo. B. Médula ósea de esternón de caballo con Ficoll paque antes de ser centrifugada por gradiente de densidad.**



**ANEXO 5. Procesamiento de médula ósea para obtención de células mononucleares. B: Aplicación de CTM por perfusión regional intravenosa al casco.**





casconormal-1.tif

casconormal-1

Print Mag: 5540x @ 7,0 in

12:08 11/29/18

Microscopist: AMB

2 microns

HV=60kV

Direct Mag: 4000x

X: Y:

AMT Camera System

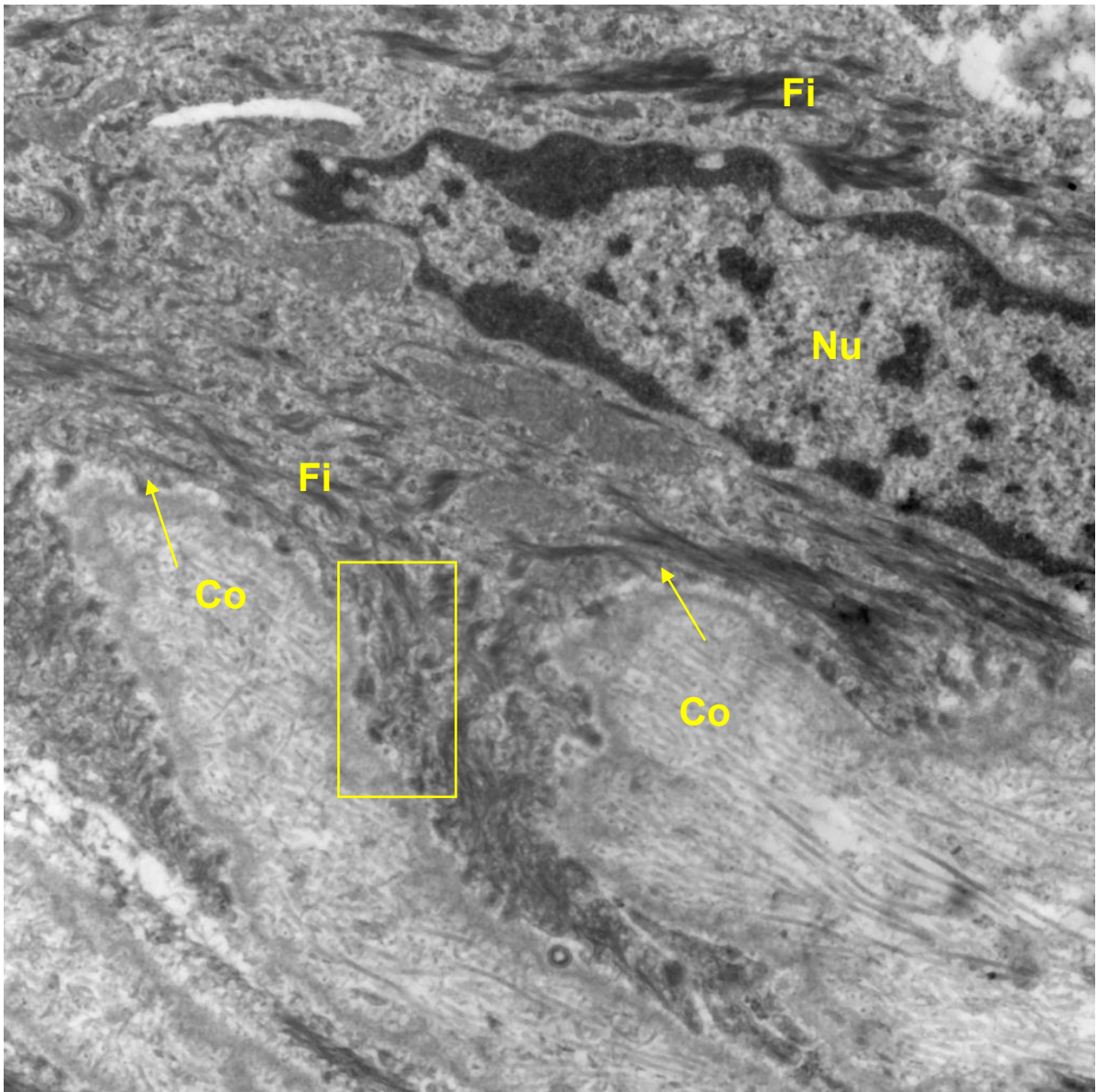
## **ANEXO 7.**

### **Electrofotografía de tejido laminar de un casco sano.**

Técnica de contraste general con acetato de uranilo y citrato de plomo. Barra 2 micras.

Desmosomas organizados (recuadros)  
Filamentos intermedios en citoplasma (Fi)  
Núcleo (Nu).





casconormal-22.tif

casconormal-22

Print Mag: 27700x @ 7,0 in

12:43 11/29/18

Microscopist: AMB

500 nm

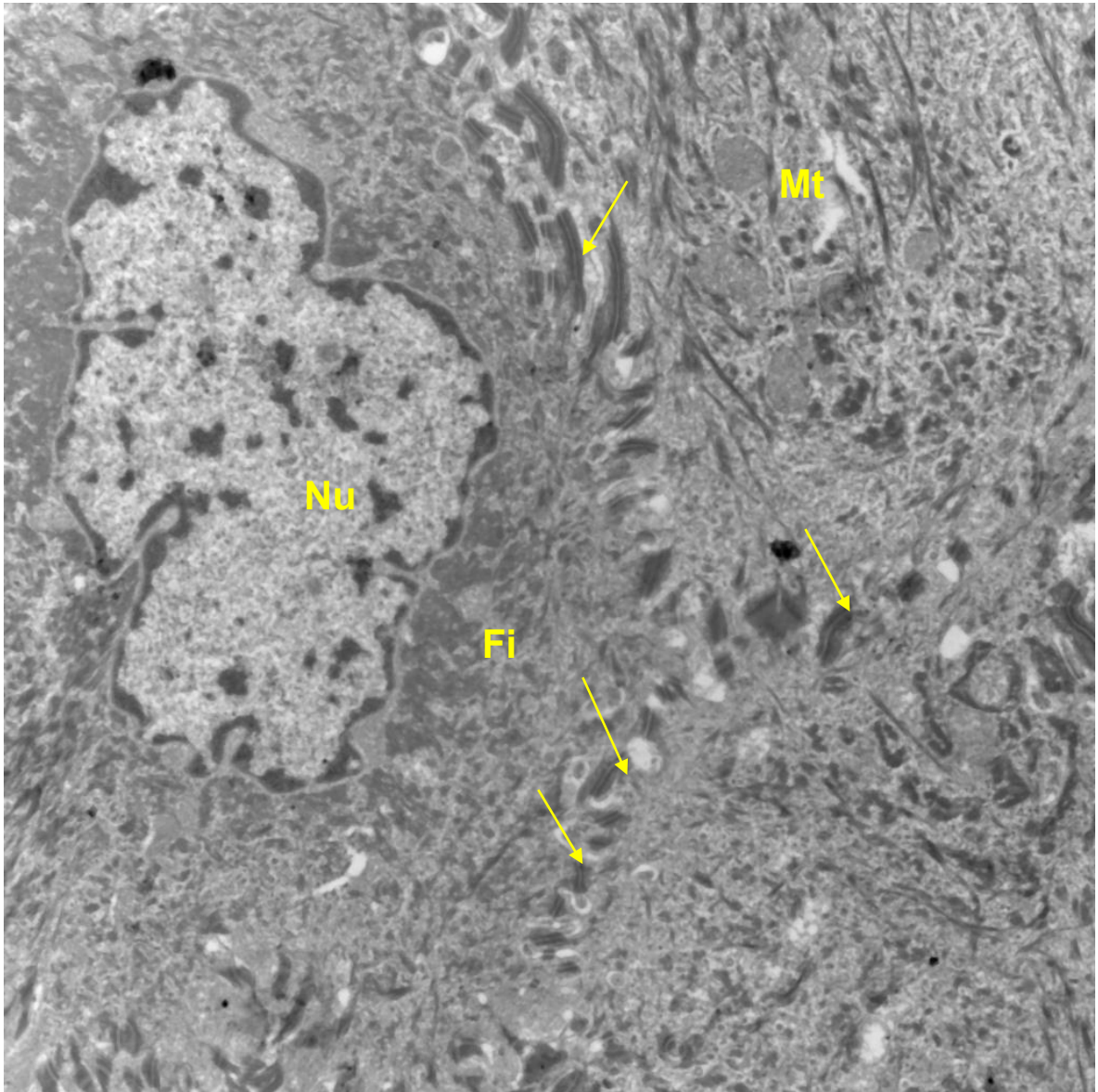
HV=60kV

Direct Mag: 20000x

X: Y:

AMT Camera System

Membrana basal (flecha) y queratinocitos que conforman las lamelas normales.  
Desmosomas (recuadro)  
Filamentos intermedios en el citoplasma (Fi)  
Núcleo (Nu).



casconormal-7.tif

casconormal-7

Print Mag: 13800x @ 7,0 in

12:22 11/29/18

Microscopist: AMB

2 microns

HV=60kV


Direct Mag: 10000x

X: Y:


AMT Camera System

Queratinocitos unidos por desmosomas normales (flecha)  
Citoplasma exhibe numerosos filamentos intermedios (Fi)  
Mitocondria (Mt), Núcleo (Nu), Nucleolo (Nc).

## 15. PUBLICACIÓN



## Treating horse chronic laminitis with allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells



Alma A García-Lascuráin <sup>a,b</sup>

Gabriela Aranda-Contreras <sup>c</sup>

Margarita Gómez-Chavarín <sup>d</sup>

Ricardo Gómez <sup>e</sup>

Adriana Méndez-Bernal <sup>f</sup>

Gabriel Gutiérrez-Ospina <sup>g</sup>

María Masri <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos. 04510 Ciudad de México, México.

<sup>b</sup> UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Ciudad de México, México.

<sup>c</sup> UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Hospital para Equinos, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

<sup>d</sup> UNAM. Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología. México.

<sup>e</sup> Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”. Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Ciudad de México, México.

<sup>f</sup> UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Patología. Ciudad de México, México.

<sup>g</sup> UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Ciudad de México, México.

\* Corresponding author: [masri@unam.mx](mailto:masri@unam.mx)

**Abstract:**

Chronic laminitis is a disabling condition that affects the laminar *corium* of the horse's hooves. Commonly, it develops as a collateral injury of numerous primary systemic diseases. It is believed that the critical physiopathological event that renders a hoof laminitic is the loss of mesenchymal stem cells. This loss greatly impairs the ability of the laminar *corium* to regenerate. Although previous work provides credibility to this notion, there remain unsettled issues that must be addressed before accepting it as a well-founded fact. Here, it was reexamined the central tenet of the physiopathological model of laminitis by infusing allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells (ABM-MSCs), through the digital palmar vein, into the hooves of horses afflicted by chronic laminitis. Horses were clinically monitored during 6 mo by evaluating them monthly using the lameness-modified Obel-Glasgow's scale and hooves thermography. Venograms and lamellar biopsies were taken at the beginning and at the end of the study period to gathered evidence on vascular remodeling and laminar *corium* regeneration. The results showed that ABM-MSCs infusion promotes vascular remodeling and laminar *corium* regeneration, further supporting that the loss of stem cells is the critical event leading to chronic laminitis. This work also demonstrated that the infusion of ABM-MSCs is safe since the treated horses did not develop local or systemic, negative clinical manifestations attuned with rejection reactions, at least during the 6-mo period they were follow up and under the therapeutic scheme proposed.

**Key words:** Horses, Laminitis, ABM-MSCs, aMSCs, MMP, MSCs, PRP, Platelet rich plasma.

Received: 13/08/2020

Accepted: 30/11/2020

## Introduction

Chronic laminitis is an incapacitating podal condition in horses. Its prevalence ranges 7 to 14 % worldwide<sup>(1)</sup>. Laminitis is the negative collateral outcome of numerous primary digestives, respiratory, urinary, metabolic, orthopedic and reproductive diseases<sup>(2-4)</sup>. Faleiros *et al*<sup>(5)</sup> and Leise *et al*<sup>(6)</sup> have elaborated a three-phase model to understand the progression of laminitis: the developmental phase, the acute phase, and the chronic phase.

It has been proposed that the laminar *corium* in hooves of horses afflicted by chronic laminitis loses its abilities to sustain regenerative processes<sup>(3)</sup>. Since mesenchymal stem cells are responsible for carrying out this task, a central piece of the puzzle to understand the physiopathology of chronic laminitis is therefore the loss of mesenchymal stem cells



during the inflammatory process<sup>(3)</sup>. This notion is not incongruous since mesenchymal stem cells keep under tight control the homeostasis, remodeling and repair of the laminar *corium*<sup>(7-8)</sup>, promote tissue regeneration by secreting growth factors<sup>(9-12)</sup>; and anti-inflammatory cytokines<sup>(11,13,14)</sup>. They also protect against oxidative damage and against hypoxia / reperfusion injury by preserving endothelial integrity and promoting angiogenesis<sup>(3)</sup>.

In 2017, Angelone *et al*<sup>(3)</sup> pioneered an experimental work aimed at assessing whether the loss of mesenchymal stem cells was indeed a fundamental piece of the physiopathological mechanism leading to chronic laminitis. Their results answered positively their enquiry, only to some extent. Unfortunately, they could not irrefutably ascribe the clinical improvement and the venographic evidence of angiogenesis observed in the treated horses solely by the infused adipose tissue-derived mesenchymal stem cells because the cells were co-infused with platelet-rich plasma. In addition, even though previous evidence has revealed that allogeneic stem cells have no deleterious effects on the horses' health even if they may trigger immune responses in the treated horse against foreign antigens<sup>(15-21)</sup>, they opted to first infused allogeneic and then infused autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells, thus confounding the interpretation of their results. Lastly, even though treated horses improved significantly when clinically assessed and despite the evidence presented supporting ongoing angiogenesis in the infused laminitic hooves, the cytological regeneration within the hoof can only be inferred. The present work was designed to overcome some of the technical pitfalls of the pioneer experimental assessment conducted by Angelone, while evaluating the role of mesenchymal stem cells in the pathophysiological process underlying laminitis. To successfully do this, it was infused allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells (ABM-MSCs), suspended in culture media, into both front hooves of horses chronically affected by laminitis, monitored the clinical progress of infused horses through clinical and venographic assessments. In addition, the study included hooves biopsies to directly evaluate laminar *corium* regeneration and hooves thermography to keep track of hooves temperature. Overall, the results showed that ABM-MSCs infusions: 1) restore to a significant extent the cytoarchitecture of the laminar *corium*, 2) regenerate segments of the vascular bed and 3) notoriously improves the clinical stance of the treated horses, while having no local nor systemic deleterious effects on the horses' health at least for up to the time the horses were followed and under the treatment protocol devised here. Hence, our observations support that the loss of mesenchymal stem cells play a fundamental role in the pathogenesis of chronic laminitis; their restitution may well reverse the condition. As subsidiary corollaries, clinicians must investigate measures aimed at preventing mesenchymal stem cell loss through inducing hooves protective immune tolerance or by encouraging hooves beneficial auto-immunity in horses coursing with primary, pro-laminitis diseases. Lastly, it is worth to emphasize the need to investigate the possibility of using mesenchymal stem cells to manage pain in horses.

## **Material and methods**

### **Animals**

Female (n= 5) and male (n= 5) horses of different breeds, age and different activities afflicted by chronic laminitis were used to conduct this study (Table 1), none of the horses were under any current treatment. All of the animals displayed distal phalanx rotation but were not sinkers. Blood cell count (CBC) was drawn from the jugular vein was used to appraise the initial inflammatory state. All horses were kept and treated in their corresponding regular stalls. Animals had free access to water and were fed with oat hay twice a day. Informed consent forms were signed by the owners. Horse clinical and experimental procedural and handling protocols were approved by the Veterinary College (FMVZ-UNAM) Institutional Animal Care and Use of Animal Committee (No. MC-2016/2-5; “Evaluación terapéutica del uso de células troncales mesenquimales alogénicas, en el control del dolor, inflamación y estructura lamelar en caballos con laminitis crónica”).

**Table 1:** Horses of different breeds, age and different activities afflicted by chronic laminitis

No.	Breed	Sex	Age (years)	Activity	Laminitis cause	Laminitis duration	Initial prognosis	Initial weight	Final weight	Initial Obel-Glasgow	Final Obel-Glasgow	Shoeing
1	Quarter Horse	Mare	7	Mexican sport	Colic	13 months	Poor	480	408	4	1	Orthopaedic
2	Appendix	Mare	12	Police service	Abortion	+24 months	Bad	430	450	13	4	None
3	Thoroughbred	Male	8	Jumper	Diet	1 month	Poor	450	465	2	1	Orthopaedic
4	Quarter horse	Gelding	3	Pet	Trimming	12 months	Poor	320	360	7	2	None
5	Quarter horse	Male	14	Mexican sport	Colic	24 months	Bad	360	370	13	2	Orthopaedic
6	Quarter horse	Mare	19	Police service	Placental retention	+24 months	Bad	460	470	12	4	None
7	Thoroughbred	Mare	5	Race	Unknown	12 months	Bad	496	490	11	4	Orthopaedic
8	Quarter horse	Gelding	16	Mexican sport	Diet change	+24 months	Bad	365	330	13	8	Standard
9	Santa Gertrudis	Mare	8	Military service	Colon displacement	2 months	Poor	455	460	2	0	None
10	Thoroughbred	Male	3	Race	Running	4 months	Poor	400	470	4	0	Orthopaedic

## Lameness assessment

An orthopedic evaluation was made by observing the static and dynamic postures of each horse. It was used the modified multifactorial evaluation pain score adapted for laminitic horses that rates signs of pain and altered behavior by combining, respectively, Obel's and Glasgow's criteria<sup>(4)</sup>. The highest the score (maximum 14), the greatest the pain.

## Hooves temperature assessment

Lamellar inflammation leads to increments in hooves temperature<sup>(20)</sup>. Infrared thermography may be used to estimate the change in temperature through hoof imaging. It was utilized the infrared FLIR XX5 camera (Flir™, USA) to image real time front limb hooves of horses once a month for six months. The temperature of the coronary band was recorded *in situ* and graphed individually. It was decided to use the coronary band as an anatomical reference to measure the temperature because it lacks hoof wall. This feature makes this region amenable for obtaining reliable temperature readings; the anatomy of hoof wall in chronic laminitic horses may become greatly deformed. Imaging sessions were conducted at the same hour ( $\approx$  8 AM), while keeping horses stood in its stall and before being hand-walked. Hooves were always cleaned before imaging. Lateral and dorsal views were taken at a distance of 30 centimeters away from the hoof. Color coded images were obtained based on a calibrated linear scale built up on the camera acquisition program.

## Venography

Horses were sedated with 10% xylazine hydrochloride injected through the jugular vein. The lateral and medial palmar digital nerve were blocked using 2% lidocaine at level of proximal sesamoids; previously the area was shaved and cleaned with a solution containing 20% chlorhexidine gluconate. A tourniquet was placed with an Esmarch bandage at the fetlock. The lateral digital vein was then punctured using a butterfly catheter 23G and the contrast medium Iopamidol (Scanlux, San Chemia, México) injected through it slowly. To assure an adequate distribution of Iopamidol throughout the entire horse's digit vascular bed, the knee dorsal aspect was flexed dorsally, and the heels lifted from the ground. At the end of the administration, the heels were weight bearing, the syringe removed, and the catheter clamped with a Halsted tweezers. Latero-medial and dorso-palmar views were taken at 60 sec from the contrast medium<sup>(21)</sup>.

## Lamellar biopsy

The fetlock and pastern were washed and dried. Horses were sedated and abaxial lateral and medial nerves blocked following the guidelines provided above. A tourniquet was placed in the fetlock using an Esmarch bandage to reduce bleeding. The dorsal hoof wall was drilled with a 4.8 mm diameter polishing stone (Dremel, Bosch, USA), 2 cm distal from the coronary band. The cavity made (9 mm diameter) traversed the external and medium strata of the hoof's wall until reaching the white line, an anatomical landmark that indicates proximity to the lamellar *corium*. Saline solution was constantly irrigated to avoid overheating during drilling. Once in the white line, the laminar *corium* was incised with a scalpel armed with a No. 11 blade, oriented perpendicular to the hoof wall. The scalpel was moved clockwise following the perimeter of the cavity until reaching the third phalanx. Then, with a No. 4 Frahm's scaler, the laminar tissue was removed from third phalanx<sup>(22)</sup>. A cylindrical-shaped laminar sample, measuring approximately 7 mm at the base and 7 mm in height, was obtained. The biopsy was fixed in buffered paraformaldehyde (4%) for 24 h, then submerged into a buffered sucrose solution (15 %) for 24 h, and finally transferred to a buffered 30% sucrose solution at 4 °C until evaluation. The surgical area was dried with gauzes and sealed with methyl-methacrylate. The tourniquet was removed after methyl-methacrylate dried.

## Histology

Biopsies were embedded in Tissue-Tek (Neg-50™, Richard-Allan Scientific, USA), frozen in dry ice and cut longitudinally (30 µm thick) in a cryostat (SLEE), at -25 °C. Serial sections were mounted on to gelatin subbed slides and stored at -4 °C until used. A total of 15 slides were obtained per sample. A slide was taken every third to be stained with Cresyl violet, Periodic Acid-Schiff's base and Masson's Trichromic stain. Slides were cover slipped with Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific) and observed through an Olympus BX51-WI microscope. The tissue cytological integrity and degree of inflammatory infiltration was estimated qualitatively, and representative fields of this material were digitally photomicrographed, under bright-field microscopy, by using the Stereo Investigator™ Software (10X).

## Transmission electronic microscopy

Samples of the *lamellar corium* obtained from a healthy and a laminitic horses were fixed in a tampon solution containing 4% paraformaldehyde / 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 72 h. After three gentle washes with phosphate buffer-saline

(0.1M; pH 7.2), the samples were post-fixed with osmium tetroxide (1%) for 1 h, then dehydrated and embedded in Epon 812. Polymerized at 60 °C for 24 h. Semi-thin sections (150 nm) were mounted in slides and dyed with Toluidine blue, the interest area was chosen and Ultra-thin sections (70 nm) were mounted on copper grids, contrasted with uranyl acetate (2%) and lead citrate (50%) (Electron Microscopy Sciences) and observed through a Jeol 1010 transmission electron microscope (60kV). The tissue ultrastructural integrity and degree of inflammatory infiltration was estimated qualitatively, and representative fields of this material were digitally photomicrographed.

### **Bone marrow sampling and mesenchymal stem cell collection, isolation and expansion**

Bone marrow (BM) samples (15 mL) were collected (using 20 mL syringes containing 1,000 UI heparin/ml BM) through a sternal puncture from male and female healthy horses (3-8 yr-old) of different breeds. Samples were stored at 4 – 8 °C and transferred in aseptic conditions to the cell culture facility within an hour from collection. Bone marrow was transferred to sterile tubes filled with Ficoll Hypaque at a 1:2 proportion. The samples were centrifuged at 400 xg for 30 min and the mononuclear fraction was isolated in a sterile tube at 4°C. The fraction was centrifuged at 300 xg for 10 minutes at 4 °C. The supernatant was discarded and the cells were re-suspended and seeded, at a density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>, in 25 cm<sup>3</sup> flasks containing DMEM:F12 (1:1) supplemented with 20% fetal bovine Serum, 500 U/mL of penicillin, 50 µg/mL of streptomycin and 2.5 µg/mL amphotericin B. The cells were incubated at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and the culture media were changed every three days until reaching an 80% confluence<sup>(23)</sup>.

### **Equine mesenchymal stem cell subculture and scaling**

After the 80 % confluence was reached, the cells were sub-cultured weekly as follows: the monolayer was washed with DPBS and the cells were detached using HBSS with 7.5 mg of porcine trypsin and 0.6 mg of EDTA. The cells were seeded at a density of  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>3</sup> flasks (first subculture) and then in 175 cm<sup>3</sup> (subsequent subcultures) with DMEM F12 (1:1) supplemented with 20% Fetal Bovine Serum.

### **Flow-cytometry**

Allogenic, bone marrow mesenchymal stem cells were characterized through flow-cytometry. Three sets of antibodies were used to immunophenotype them. ABM-MS

used for infusion were positive to the surface markers CD73, CD90, CD105, CD28 and CD44 (CD28/CD44 specific for equine MSC), negative to CD45, CD34, CD14 and CD79. Flow cytometry was conducted based upon protocols previously reported<sup>(24-28)</sup>.

### **Administration of ABM-MSC's**

Horses were sedated and prepared for administration of ABM-MSC's as previously described (see venography section). ABM-MSCs were diluted in physiologic saline solution and administered ( $10\text{-}30 \times 10^6$ ) into the lateral (or medial) digital palmar vein under sterile conditions via a 21-gauge butterfly catheter, attached to a 20 mL syringe, in the standing horse. Tourniquet was removed 20 min after administration of cells. The digit was kept bandaged for one day. ABM-MSCs were injected three times at one-month intervals.

## **Results**

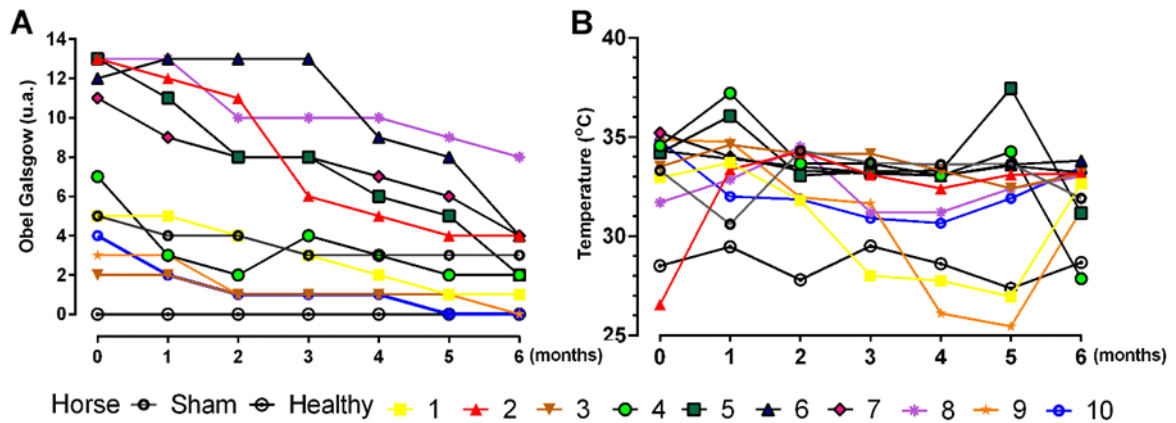
### **Clinical condition of horses treated with ABM-MSCs**

Horses with chronic laminitis had Obel-Glasgow's scores that range between 2 to 14 before ABM-MSCs treatment onset (Figure 1A). In contrast, the healthy horse displayed neither lameness or pain, nor hooves temperature increments at any time along the period evaluated. As the study progressed, all ABM-MSCs treated horses improved their clinical condition after the second or third month of having received ABM-MSCs venous infusions. By the end of the six months' period, all ABM-MSCs treated horses decreased their Obel-Glasgow scores and significantly improved their mobility and clinical condition. Overall, the horses with the worst initial condition, improved the most (Figure 1A). All horses had an improvement in mobility, quality and shape of the hoof, they also improved their behavior and the factions of their faces (Grimace scale), having a good quality of life. This improvement was attributable to ABM-MSCs infusion, since the sham horse treated only with vehicle did not improve through the course of the experimental time (Figure 1A).

In contrast, hooves' temperature in laminitic horses ranged between 27 °C and 35.5 °C (average  $33.26 \text{ °C} \pm 2.58$ ) before ABM-MSCs treatment started. As a reference, the temperature in the healthy horse's hooves ranged between 27 °C and 30 °C (average  $28.56 \text{ °C} \pm 0.79$ ). ABM-MSCs treatment had no major impact on hooves temperature (Figure 1B). In a handful of treated horses, hoof's temperature tended to decrease slightly (1 to 3 °C) after ABM-MSCs infusions (average  $32.27 \text{ °C} \pm 1.78$ ). In others, temperature shifts

were highly variable throughout the experimental timeline. In all cases, nonetheless, ABM-MSCs treated horses and the sham horse (average  $33.01\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.29$ ) never reached steady healthy values of hooves' temperature.

**Figure 1:** Clinical evolution of horses after being treated with allogenic bone marrow, mesenchymal stem cells (ABM-MSCs)



(A) ABM-MSCs treated horses, monitored by the Obel-Glasgow scale and infrared thermography, (B) Hooves temperature.

### Hooves vascular pattern and histology of the laminar *corium* after ABM-MSCs treatment

The horse's hooves are irrigated by a highly anastomosed vascular bed formed by the coronary plexus and papillae, the sublamellar venous plexus, the terminal papillae, the circumflex vessels and the sole and heel's venous plexuses (Figure 2A). In laminitic horses, the chronic dislocation stands of the distal phalanx significantly disrupted this neat vascular pattern. As seen in Figure 2B, hooves virtually become avascular; the entire vascular bed showed severe contrast media filling defects except for stem vessels in coronary and heel's plexus where vessels looked irregular and somewhat engorged. In general, the severity of vascular damage correlated with the severity of the symptoms (not shown). In contrast to the venographic findings described for the vascular landscape in laminitic hooves, images from the hooves obtained by the end of the 6<sup>th</sup> month of having begun ABM-MSC treatment revealed, in all horses regardless of the initial clinical condition and degree of vascular damage, hints of vascular recovery. Commonly, stem vessels of the coronary and heel plexus became widened and images of vascular sprouts were frequently observed as were vessels traversing somewhat "aberrant" trajectories (Figure 2C). In other words, a process of angiogenesis is clearly on its way. None of the horses treated, however, showed a full recovery of the vascular pattern, even though their clinical improvement was evident. Lastly, the sham horse showed no clinical improvement, nor venographic patterns of vascular recovery (not shown).

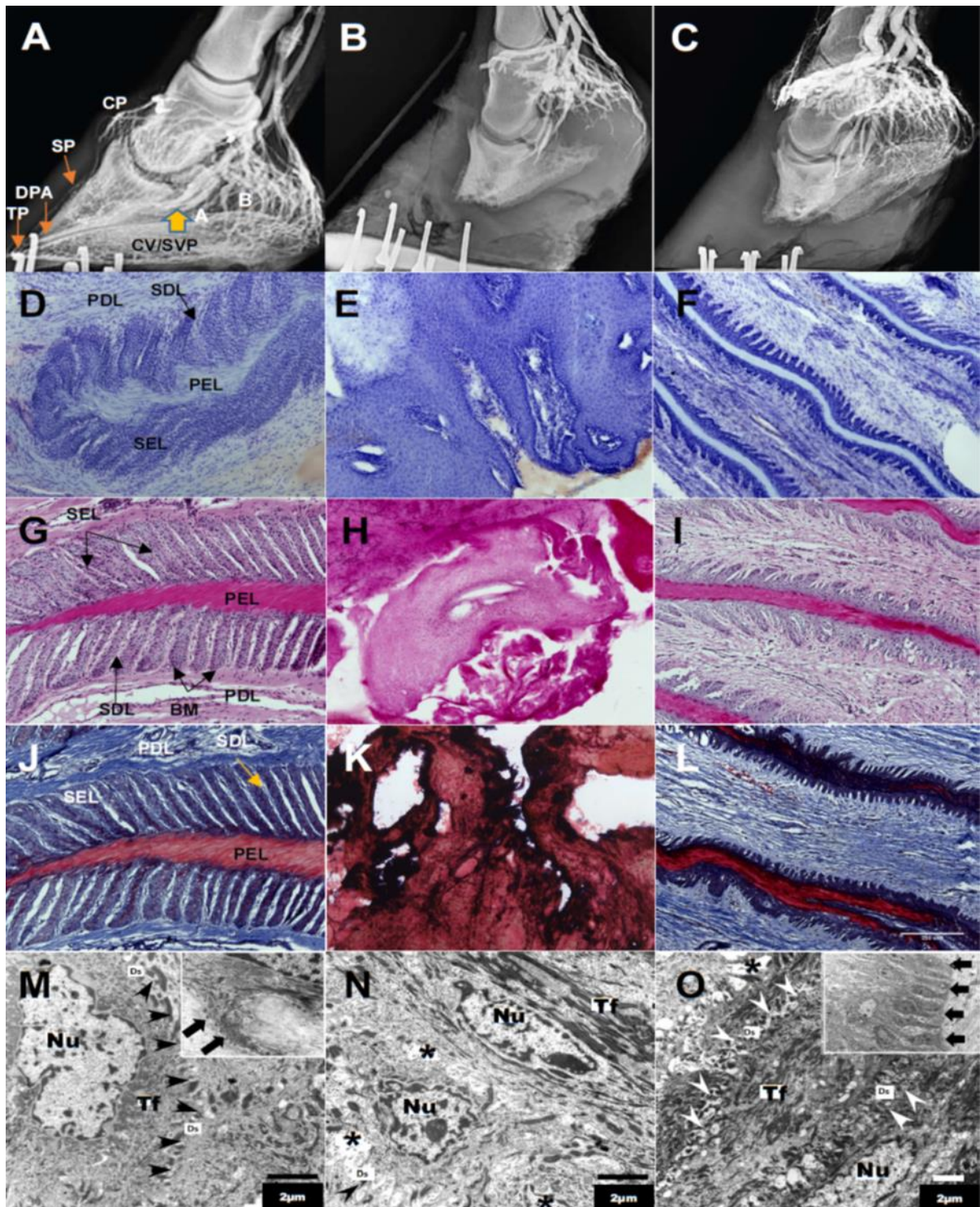


## Histological features

ABM-MSC-infused, but not the sham, horses improved their clinical condition and their hooves' vascular patterns by the end of the 6<sup>th</sup> mo of treatment. To evaluate whether this recovery might be associated to hooves' tissue restoration, it was biopsied and histologically evaluated the laminar *corium* of a healthy, sham/laminitic and laminitic horses; the second and the third groups were sampled before and by the end of the treatment, 6 mo later from the first biopsy taken. Representative results are exhibited in Figure 2. In the healthy horse's hoof (Figure 2D), it was observed primary epidermal and dermal lamellae interdigitating regularly. Secondary epidermal and dermal lamellae, on the other hand, ran in opposite directions, but parallel next to each other. Secondary lamellae displayed rounded ends thanks to the basal cell's covering that progressed continuously up to the tip. The epidermal basal cells' nuclei were juxtaposed opposite to the basal membrane (not shown). Finally, the basal membrane formed a thin and continuous layer underneath the epithelia lining (Figure 2G) and the collagen regularly organized in parallel bundles across the dermis (Figure 2J). In sharp contrast, the hooves histology in horses with chronic laminitis showed a virtual loss of the laminar architecture (Figure 2E), basal cell hyperplasia with numerous picnotic cell profiles, (Figure 2H), abundant connective tissue, as well as perivascular mononuclear cell infiltration (not shown). No basal membrane (Figure 2H) or collagen (Figure 2K) was observed. Finally, ABM-MSC-infused, but not the sham, horses' hooves regained the laminar arrangement, the integrity of the epithelial monolayer upon a regular, continuous basal membrane and the organization and presence of collagen (Figure 2F, I and L). No evidence of significant perivascular mononuclear infiltration was detected.

Lastly, it was conducted electron microscopic observations to further evaluate the epithelial integrity in hooves of ABM-MSC-infused horses. In the healthy horse (Figure 2M), basal cells join one another by numerous desmosomes. Their eu-chromatic nuclei displayed irregular shapes characterized by indentations. They also presented a conspicuous cytoplasmic arrangement of tonofilaments. The electron dense basal lamina they were attached on was thin, regular and continuous. Laminitic hooves (Figure 2N), on the other hand, showed scarce desmosomes, abundant electro-lucid intercellular spaces. Basal cells tended to show nuclei with chromatin clumps. Cytoplasmic tonofilament aggregates were also frequent, and no evidence of basal membrane was observed. Hooves in ABM-MSC-infused horses (Figure 2O) showed a marked reduction of electro-lucid intercellular spaces. Desmosomes become a regular finding and cell nuclei return to their regular shape and chromatin arrangement.

**Figure 2:** Vascular pattern and histology of the laminar *corium* after ABM-MSCs treatment



A-C. Representative hoof venographies of a healthy (A), laminitic (B) and ABM-MSCs infused horses (C). Notice the vascular response in hooves of ABM-MSCs-infused horses. CP, Coronary Plexus; SP: Sublamellar Plexus; DPA: Distal Phalanx Apex; TP: Terminal Plexus; CV: Circumflex Vessels; A: Terminal Arch of the palmar digital vessels; B: Heel plexus; SVP: Soleal Venous Plexus. D-F). Representative photomicrographs of sagittal sections of the laminar *corium* of a healthy (D, G, J), laminitic (E, H, K) and ABM-MSCs infused horses (F, I, L) stained with Cresyl Violet (cell nuclei; D-F), PAS (Basal membrane; G-I) or Masson's (Collagen; J-L) histochemical techniques. Notice the restoration

of the laminar *corium* in ABM-MSCs infused horses. PEL: Primary Epidermal Lamellae; PDL: Primary Dermal Lamellae; SEL: Secondary Epidermal Lamellae; SDL: Secondary Dermal Lamellae; BM: Basal Membrane. M-O. Representative electron micrographs showing ultrastructural features of basal cells in healthy (M), laminitic (N) and ABM-MSCs infused horses (O). Notice the recovery of the chromatin and tonofilaments arrangement, as well as of desmosomes in ABM-MSCs infused horses. Nu: Nucleus; Tf: Tonofilaments; Ds and arrowheads: Desmosomes; \*: oedema; Arrows in insets pinpoint the basal membrane. Refer to the text for a detailed description of Figure 2.

## Discussion

Chronic laminitis is an inflammatory disease that affects the horse's hooves. Angelone *et al*<sup>(3)</sup> proposed that the loss of mesenchymal stem cells is the fundamental event that underlies the physiopathology of chronic laminitis. Although their results support their claim, they could not irrefutably ascribe their clinical and venographic findings to the infused adipose tissue-derived mesenchymal stem cells because the cells were co-infused with platelet-rich plasma. In addition, they confound the interpretation of their results because they infused first allogeneic and then autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in the laminitic horses. Lastly, they did not provide direct proof of laminar *corium* regeneration in the recovered horses. In this work overcome all these technical issues by infusing only ABM-MSCs, suspended in culture media, into both front hooves of horses chronically affected by laminitis. According to Angelone's prediction, infusion of ABM-MSCs into the lateral digital vein of laminitic hooves significantly improved the clinical conditions of all horses treated, while restoring considerably the cytoarchitectural features of the hooves' laminar *corium*. This was accompanied by a reduction of the inflammatory perivascular infiltration of mononuclear cells, as also predicted by Angelone *et al*<sup>(3)</sup> based upon their molecular biological results; they found increased mRNA expression of anti-inflammatory cytokines and anti-oxidative proteins. The specificity of these findings is supported by the fact that the sham horse, infused only with culture media, remained symptomatic and his hooves displayed the characteristic histological deterioration of the laminar *corium* by the end of the experimental time. Even though these results circumstantially support that ABM-MSCs promotes hooves tissue regeneration by, in part, reducing local inflammation, in this case, this notion still awaits direct confirmation by estimating pro-inflammatory cytokines in the laminar *corium* of ABM-MSCs-treated and untreated laminitic horses. As far as it is known, up to date, there is no reliable way to conduct such estimations<sup>(29,30)</sup>. In any event, as commented already, these results back up those reported by Angelone *et al*<sup>(3)</sup>, who suggested that mesenchymal stem cells would promote laminar *corium* regeneration by exerting not only anti-inflammatory actions, but also by inhibiting MMPs-mediated extracellular matrix degradation, buffering ROS damage and recruiting local and circulating stem and endothelial cells. Certainly, the venographic evidence obtained in this research from treated horses also supports Angelone's call.



A clinically relevant finding was that, even though ABM-MSCs-infused horses improved their clinical condition and restored to a great extent hooves' cytoarchitecture, hooves' temperature remained elevated in treated horses. At first glance, one might think that these findings rule out temperature monitoring as a sensitive procedure to follow up treatment progress. However, the fact that vascular restoration is partial in all treated horses by the end the experimental period suggests otherwise. On one hand, this finding might indicate that there remains some degree of inflammation that promotes temperature to stay high through the relatively avascular tissue in the still regenerating hooves. However, higher than normal hooves temperature is likely unrelated to an enduring inflammation since lameness and pain were found reduced significantly in ABM-MSCs-infused horses. Alternatively, the lack of full recovery of the vascular bed may jeopardize heat dissipation from the hooves. Although, as far as is known, such a function has not been attributed to the horse's hooves vascular network, it is well known that vascular beds may work as cooling devices in other parts of the mammalian body [for the Radiator Theory see Falk, 1990<sup>(31)</sup>]. In any event, long-time monitoring of hooves vascular bed and temperature in treated horses may help in evaluating this possibility.

Angiogenesis is a process by which blood vessels are newly formed budding off from extant precursor vessels<sup>(32-34)</sup>. In agreement with Angelone's results, it was obtained venographic evidence of ongoing angiogenesis from the coronary and heel's plexuses of ABM-MSCs-treated, laminitic horses. These data may be interpreted in three non-mutually excluding ways. First, they may show that damaged hooves' blood vessels retain their ability to produce endothelial cells, themselves capable to recreate functional vessels; so, ABM-MSCs infusion may unleash local vascular stem cells. Second, infused ABM-MSCs commit to the endothelial cell lineage thus propelling angiogenesis in hooves of the treated horses once seeded. Third, the infused ABM-MSCs may favor the recruitment of autologous, circulating stem cells that commit themselves to the endothelial lineage. Although current evidence supports that MSCs promote angiogenesis<sup>(34)</sup>, the other alternatives remain open to investigation. So, future cell lineage labeling studies would surely help in disentangle this conundrum. In either case, what seems to be clear is, under the experimental conditions used, that the coronary and heel's plexuses contain niches that facilitate angiogenesis to proceed given adequate conditions. This process seems to recapitulate the embryonic sequence since vasculogenesis in the embryonic hoof proceeds following a proximal to distal gradient<sup>(35)</sup>.

Another interesting finding in this work is that tissue restoration, up to the point the last biopsy was taken from ABM-MSCs-infused horses, was remarkable, having no evidence of vicious healing, nor scars of any sort, at least in the sampled site of all horses evaluated. Such an observation suggests that horse hooves may retain a biochemical ambient similar to that seen at ontogenetic stages. This possibility gains support from observation in the brain where the adult hypothalamus exhibits tremendous potential of plasticity due to the presence of poly-sialylated glycan molecules that greatly ease tissue remodeling<sup>(36,37)</sup>. Studies aimed at comparing the molecular composition of the hooves connective tissue at different ages may provide evidence to evaluate the merit of this presumption.

In a previous study<sup>(3)</sup> it was found that a mixture of aMSCs combined with PRP improves the clinical condition of horses afflicted by chronic laminitis. As they recognized, they could not determine whether the clinical improvement observed in the treated horses was due to aMSCs or PRP or responded to a synergistic effect of both, since they did not test the administration of either one alone. In this work, although stem cells are not of the same class, clearly the clinical improvement and tissue restoration can be better ascribed to the infused ABM-MSCs, since the infusion of the vehicle (i.e., culture media) had no noticeable effect on either of the parameters evaluated in the sham horse (future studies must increase the number of sham horses to strengthen these observations). What this study did not unveil, however, is how ABM-MSCs promote tissue regeneration since vascular reconstitution was only partial [see Angelone<sup>(3)</sup>, King<sup>(32)</sup>, Gu<sup>(38)</sup>, for theoretical considerations]. In this regard, ABM-MSCs might have migrated from the reconstituting vascular bed and colonize relatively avascular territories. Also, ABM-MSCs may produce and release soluble factors or exosomes<sup>(33,39-41)</sup>, that could invigorate local stem cells to proliferate, differentiate and reconstitute the damaged tissue. Lastly, ABM-MSCs may promote recruiting of autologous circulating stem cells and their invasion of hooves avascular regions. Lineage studies combined with additional biopsies taken in places of the hooves distant to the site of administration would help to evaluate these possibilities. They might also help in ruling out possible bias during biopsy taken since biopsies might have been obtained inadvertently from places where the vasculogenesis front was actively ongoing.

A final consideration with regard of the use of allogenic stem cells must be made. One might think that the possibility of inducing immunological reactions would increase by using allogeneic cells<sup>(42)</sup>. These results and the ones published by others<sup>(3,43,44)</sup>, support that allogeneic stem cell infusion is sufficiently safe since treated horses had no evidence of rejection up to the time point they were evaluated. In contrast, even though many consider the use of autologous stem cells to be safer, recent studies show that they may develop *de novo* mutations in mitochondrial DNA that produce immunogenic neoepitopes<sup>(45)</sup>, thus increasing the possibility of immunological rejection<sup>(46-49)</sup>. In addition, it has been shown that adipose-derived stem/stromal cells that recapitulate the expression of aging biomarkers show reduced stem cell plasticity<sup>(50)</sup>, thus precluding their potential use as an autologous source of therapeutic cells; this might also be the case for allogeneic cells.

## Conclusions and implications

In conclusion, ABM-MSCs infusions improved the clinical conditions and promote hooves histological restoration in laminitic horses. The procedure was innocuous, sex independent and effective at least for up to a period of 6 mo. Future studies must increase the sample size and the follow up time to really appreciate the long-term benefits of the

treatment and whether additional infusions of ABM-MSCs are needed. A less invasive method for administration must also be evaluated, although previous studies showed that administration through this via does not affect stem cells therapeutic efficiency and efficacy if dosage is correctly calculated. The effects of shoeing and trimming of the foot must also be evaluated. Finally, the use of ABM-MSCs to pain management is other topic that deserved investigation based on current results. In any event, the data support that the loss of mesenchymal stem cells is indeed the critical event leading to chronic laminitis. Hence, measures aimed at inducing immune tolerance against hooves' mesenchymal tissue may help in preventing such a loss. In this regard, the infusion of mesenchymal antigens obtained from laminitic hooves into the eye's anterior chamber may be a path to investigate in the coming years<sup>(51)</sup>.

### **Funding**

Alma Angélica García Lascuráin was a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM and received fellowship No.133213 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. Authors thanks National Autonomous University of Mexico (UNAM), project PAPIIT IN225316 and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), for the financial support of this investigation.

### **Acknowledgments**

Authors thank to MVZ Roberto Oropeza, MVZ, MSc Abraham Pineda Aranda, MVZ Roberto Juárez Cervantes and MVZ Jennifer A. Michel Mancilla for medical and zootechnical support. We are also indebted with MVZ Jorge Rodríguez Lezama for his technical support when conducting the venographic studies. Stem cell culturing and flow cytometry were instrumented by IBT Antonia Lizbeth Mireles Ruiz and MC Moisés López Dávila to whom we are grateful. Lastly, we are also thankful to MVZ MSc José Ramírez Lezama, Biol. Maribel Nieto Miranda and MVZ MC Araceli Lima Melo for the conceptual and technical input provided to obtain and analyze the histological samples. Laura Padierna Mota, Karyna Pérez Saldaña, Jaime Rodríguez Manuel from UNe Aplicaciones Biológicas, Laboratorios de Especialidades Inmunológicas.

### **Conflict of interes**

Authors acknowledge that there are no competing financial interests or interest of any other source, to disclose.

**Literature cited:**

1. Lecchi C, Dalla CE, Lebelt D, Ferrante V, Canali E, Cecilian F, *et al.* Circulating miR-23b-3p, miR-145-5p and miR-200b-3p are potential biomarkers to monitor acute pain associated with laminitis in horses. *Animal* 2018;12(2):366-375.
2. Pollit CC. Lamellar function at the cellular level. In: Belknap JK, Geor R, editors. *Equine laminitis*. Wiley, Blackwell, Iowa, USA; 2017:22-38.
3. Angelone M, Conti V, Biacca C, Battaglia B, Pecorari L, Piana F, *et al.* The contribution of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma to the treatment of chronic equine laminitis: A proof of concept. *Int J Molecular Sci* 2017;18(2122).
4. Driessen B, Bauquier SH, Zarucco L. Neuropathic pain management in chronic laminitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 2010;(26):315-337.
5. Faleiros RR, Belknap JK. Leukocytes and inflammatory signaling in laminitis: Leukocytes. In: Belknap JK, Geor R, editors. *Equine laminitis*. Iowa, USA: Wiley, Blackwell; 2017:91-101.
6. Carter R, Engiles J, Megee S, Senoo M, Galantino-Homer H. Decreased expression of p63, a regulator of epidermal stem cells, in the chronic laminitic equine hoof. *Equine Vet J* 2011;43(5):543-551.
7. Salem H, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: Current understanding and clinical status. *Stem Cells* 2010;28(3):585-596.
8. Keating A. Mesenchymal stromal cells: New directions. *Stem Cell*. Elsevier Inc. 2012;10(6):709-716.
9. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differentiation* 2014;21(2):216-225.
10. Yu H, Fischer G, Ebert AD, Wu H, Bai X, Hogan QH. Analgesia for neuropathic pain by dorsal root ganglion transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cell: initial results. *Molecular Pain* 2015;11(5).
11. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010;1(1):2.
12. Cassano J, Schnabel L, Betancourt A, Antczak D, Fortier L. Mesenchymal stem Cell therapy: Clinical progress and opportunities for advancement. *Current Pathol Reports* 2015;3(1):1-7.
13. Renzi S, Ricco S, Dotti S, Sesso L, Grolli S, Cornali M, *et al.* Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: A clinical report. *Res Vet Sci* 2013;(95):272-277.

14. Carrade DD, Borjesson DL. Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp Med* 2013;(63):207-217.
15. Kol A, Wood JA, Carrade HDD, Gillette JA, Bohannon-Worsley LK, Puchalski SM, *et al.* Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cells Res Ther* 2015;6:73.
16. Pezzanite LM, Fortier LA, Antczak DF, Cassano JM, Bronahan MM, Miller D, *et al.* Equine allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells elicit antibody responses *in vivo*. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(54).
17. Ardanaz N, Vázquez FJ, Romero A, Remacha AR, Barrachina L, Sanz A, *et al.* Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: Effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Vet Res* 2016;12(65).
18. Owens SD, Kol A, Walker NJ, Borjesson DL. Allogeneic mesenchymal stem cells treatment induces specific alloantibodies in horses. *Stem Cells Internat* 2016; doi: 10.1155/2016/5830103.
19. Brandao JS, Alvarenga ML, Pfeifer JPH, dos Santos VH, Fonseca-Alves CE, Rodrigues M, *et al.* Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in healthy equine superficial digital flexor tendon: A study of the local inflammatory response. *Res Vet Sci* 2018;118:423-430.
20. Douthit TL, Bormann JM, Bello NM. Assessing the association between hoof thermography and hoof Doppler ultrasonography for the diagnosis of lameness in horses. *J Equine Vet Sci* 2014;34(2):275-280.
21. Rucker A, Redden RF, Arthur EG, Reed SK, Hill BW, Dziuban EM, *et al.* How to perform the digital Venogram. In: *AAEP Proc (USA)*. 2006;52:526-530.
22. Gravena K, Sampaio R, Dias D, Canola P, Peiró J, de Lacerda-Neto J. Evaluation of the integrity of horse hoof dermal and epidermal tissues collected by dorsal transmural access. *J Equine Vet Sci* 2012;32(12):858-862.
23. Barberini DJ, Paiva-Freitas NP, Sartori-Magnoni M, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, *et al.* Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther* 2014;5(25).
24. De Schauwer C, Meyer E, Van de Walle GR, Van Soom A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: A plea for uniformity. *Theriogenology* 2011;75:1431-1443.



25. De Schauwer C, Piepers S, Van de Walle GR, Demeyere K, Hoogewijs MK, Govaere JL, *et al.* In search for cross-reactivity to immunophenotype equine mesenchymal stromal cells by multicolor flow cytometry. *Cytometry Part A*, 2012;81(4):312-323.
26. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Jorge LL, Conceição ML, *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2013;65(4):939-945.
27. Carvalho AM, Yamada ALM, Martins JRB, Maia L, Gloim MA, Deffune E, *et al.* Isolation and characterization of equine peripheral blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Pesq Vet Bras* 2013;33(9):1151-1154.
28. Michler JK, Hillmann A, Saykovic V, Mulling CKW. Horse hair follicles: A novel dermal stem cell source for equine regenerative medicine. *Cytometry Part A*, 2018;93(1):104-114.
29. Steelman SM, Chowdhary BP. Plasma proteomics shows an elevation of the anti-inflammatory protein APOA-IV in chronic equine laminitis. *Vet Res* 2012;8(179).
30. Steelman SM, Johnson D, Wagner B, Stokes AM, Chowdhary BP. Cellular and humoral immunity in chronic equine laminitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;153:217-226.
31. Falk D. Brain evolution in Homo: The “radiator” theory. *Behavioral Brain Sci* 1990;13:333-381.
32. King A, Balaji S, Keswani SP, Crombleholme TM. The role of stem cells in wound angiogenesis. *Adv Wound Care* 2014;10:614-625.
33. Schabbir A, Cox A, Rodríguez-Menocal L, Salgado M, Van Badiavas E. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis *in vitro*. *Stem Cells Develop* 2015;24(14):1635-1647.
34. Cortez-Toledo E, Rose M, Agu E, Dahlenburg H, Yao W, Nolta JA, *et al.* Enhancing retention of mesenchymal stem cells with pro-survival factors promotes angiogenesis in a mouse model of limb ischemia. *Stem Cells Develop* 2018;28:114-119. 2019 Jan 15;28(2):114-119. doi: 10.1089/scd.2018.0090.
35. Parks AH. Anatomy and function of the equine digit. In: Belknap JK, Geor R editors. *Equine laminitis*. USA: Wiley, Blackwell, Iowa; 2017:22-38.
36. Theodosis DT, Poulain DA, Oliek SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiology Rev* 2008;88:983-1008.
37. Bonfanti L, Theodosis DT. Polysialic acid and activity-dependent synapse remodeling. *Cell Adhesion Migration* 2009;3(1):43-50.

38. Gu W, Hong X, Potter C, Qu A, Xu Q. Mesenchymal stem cells and vascular regeneration. *Microcirculation* 2017;24:e12324.
39. Ching RC, Wiberg M, Kingham PJ. Schwann cell-like differentiated adipose stem cells promote neurite outgrowth via secreted exosomes and RNA transfer. *Stem Cell Res Ther* 2018;9:266.
40. Zhang JC, Zceng GF, Wu L, Ou-Yang LY, Li WX. Bone marrow mesenchymal stem cells overexpressing human basic fibroblast growth factor increase vasculogenesis in ischemic rats. *Brazilian J Medical Biol Res* 2014;47(10):886-894.
41. Bier A, Berenstein P, Kronfeld N, Morgoulis D, Ziv-Av A, Goldstein H, *et al.* Placenta-derived mesenchymal stromal cells and their exosomes exert therapeutic effects in Duchenne muscular dystrophy. *Biomaterials* 2018;174:67-78.
42. Kim SC, Adams AB. Pluripotent stem cells that evade the immune radar. *Nature Biotechnol* 2017;35(8):722-723.
43. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheumatism* 2007;56(4):1175-1186.
44. Kol A, Wood J, Carrade HD, Gillette J, Bohannon-Worsley L, Puchalski S, *et al.* Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther* 2015;6(73).
45. Deuse T, Hu X, Agbor-Enoh S, Koch M, Spitzer MH, Gravina A, *et al.* De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nature Biotechnology. Letters*. 2019.
46. Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras C. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Review Molecular Cell Biol* 2008;9:725-729.
47. Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet D. Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* 1991;349:329-331.
48. De Almeida PE, Ransohoff JD, Nahid A, Wu JC. Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives. *Circ Res* 2013;112:549-561.
49. Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades M, *et al.* Priming equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells with proinflammatory cytokines: Implications in immunomodulation-immunogenicity balance, cell viability and differentiation potential. *Stem Cells Dev* 2017;26(1).

50. Jung JS, Volk C, Marga C, Navarrete Santos A, Jung M, Rujescu D, *et al.* Adipose-derived stem/stromal cells recapitulate aging markers and show reduced stem cell plasticity affecting their adipogenic differentiation capacity. *Cellular Reprograming* 2019;21(4):187-199.
51. Martínez-Alcantar L, Talavera-Carrillo DK, Pineda-Salazar JU, Ávalos-Viveros M, Gutiérrez-Ospina G, Philips-Farfán BV, *et al.* Anterior chamber associated immune deviation to cytosolic neural antigens avoids self-reactivity after optic nerve injury and polarizes the retinal environment to an anti-inflammatory profile. *J Neuroimmunology* 2019;333(476964).