



Tratamiento de la laminitis crónica en equinos utilizando células troncales mesenquimales alogénicas de la médula ósea.



Alma A García-Lascuráin ^{a,b}

Gabriela Aranda-Contreras ^c

Margarita Gómez-Chavarín ^d

Ricardo Gómez ^e

Adriana Méndez-Bernal ^f

Gabriel Gutiérrez-Ospina ^g

María Masri ^{a*}

^a 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.

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

^c UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Hospital para Equinos, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.

^d UNAM. Facultad de Medicina, Departamento de Fisiología. México.

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

^f UNAM. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Patología. Ciudad de México, México.

^g UNAM. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Ciudad de México, México.

* Autor de correspondencia: masri@unam.mx

Resumen:

La laminitis crónica es una condición incapacitante que afecta el corion laminar de los cascos del caballo. Por lo general, se desarrolla como una lesión colateral de numerosas enfermedades sistémicas primarias. Se cree que el evento fisiopatológico crítico que hace que un casco sea vuelva laminítico es la pérdida de células madre mesenquimales. Esta pérdida perjudica en gran medida la capacidad del corion laminar para regenerarse. Aunque el trabajo previo proporciona credibilidad a esta noción, quedan cuestiones sin resolver que deben abordarse antes de aceptarla como un hecho bien fundado. Aquí, se reexaminó el principio central del modelo fisiopatológico de la laminitis mediante la infusión de células madre mesenquimales alogénicas derivadas de la médula ósea (CMM-AMO), a través de la vena palmar digital, en los cascos de los caballos afectados por laminitis crónica. Los caballos fueron monitoreados clínicamente durante 6 meses, evaluándolos mensualmente utilizando la escala de Obel-Glasgow de cojera modificada y la termografía de cascos. Se tomaron venogramas y biopsias laminares al principio y al final del período de estudio para reunir evidencia sobre la remodelación vascular y la regeneración del corion laminar. Los resultados mostraron que la infusión de CMM-AMO promueve la remodelación vascular y la regeneración del corion laminar, lo que respalda aún más que la pérdida de células madre es el evento crítico que conduce a la laminitis crónica. Este trabajo también demostró que la infusión de CMM-AMO es segura ya que los caballos tratados no desarrollaron manifestaciones clínicas negativas locales o sistémicas en sintonía con reacciones de rechazo, al menos durante el período de 6 meses en que se les dio seguimiento y bajo el esquema terapéutico propuesto.

Palabras clave: Caballos, Laminitis, CMM-AMO, CMMa, MPP, CMM, PRP, Plasma rico en plaquetas.

Recibido: 13/08/2020

Aceptado: 30/11/2020

Introducción

La laminitis crónica es una condición podal incapacitante en los caballos. Su prevalencia oscila entre el 7 y el 14 % en todo el mundo⁽¹⁾. La laminitis es el resultado colateral negativo de numerosas enfermedades primarias digestivas, respiratorias, urinarias, metabólicas, ortopédicas y reproductivas⁽²⁻⁴⁾. Faleiros *et al*⁽⁵⁾ y Leise *et al*⁽⁶⁾ han elaborado un modelo trifásico para comprender la progresión de la laminitis: la fase de desarrollo, la fase aguda y la fase crónica.

Se ha propuesto que el corion laminar en los cascos de los caballos afectados por laminitis crónica pierde sus capacidades para mantener procesos regenerativos⁽³⁾. Dado que las células madre mesenquimales son las encargadas de llevar a cabo esta tarea, una pieza

central del rompecabezas para entender la fisiopatología de la laminitis crónica es, por tanto, la pérdida de células madre mesenquimales durante el proceso inflamatorio⁽³⁾. Esta noción no es incongruente ya que las células madre mesenquimales mantienen bajo control estricto la homeostasis, la remodelación y reparación del corion laminar⁽⁷⁻⁸⁾, promueven la regeneración tisular mediante la secreción de factores de crecimiento⁽⁹⁻¹²⁾; y citoquinas antiinflamatorias^(11,13,14). También protegen contra el daño oxidativo y contra la lesión por hipoxia / reperfusión al preservar la integridad endotelial y promover la angiogénesis⁽³⁾.

En 2017, Angelone *et al*⁽³⁾ fueron pioneros en un trabajo experimental dirigido a evaluar si la pérdida de células madre mesenquimales era realmente una pieza fundamental del mecanismo fisiopatológico que conduce a la laminitis crónica. Sus resultados respondieron positivamente a su pregunta, solo hasta cierto punto. Desafortunadamente, no pudieron atribuir de manera irrefutable la mejoría clínica y la evidencia venográfica de la angiogénesis observada en los caballos tratados únicamente por las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo infundidas porque las células fueron confundidas con plasma rico en plaquetas. Además, a pesar de que la evidencia previa ha revelado que las células madre alogénicas no tienen efectos nocivos en la salud de los caballos, incluso si pueden desencadenar respuestas inmunes en el caballo tratado contra antígenos extraños⁽¹⁵⁻²¹⁾, ellos optaron por infundir primero células madre mesenquimales autólogas derivadas del tejido adiposo y luego alogénicas, confundiendo así la interpretación de sus resultados. Por último, a pesar de que los caballos tratados mejoraron significativamente cuando se evaluaron clínicamente y a pesar de la evidencia presentada que apoya la angiogénesis en curso en los cascos laminíticos infundidos, la regeneración citológica dentro del casco solo se puede inferir. El presente trabajo fue diseñado para superar algunos de los escollos técnicos de la evaluación experimental pionera conducida por Angelone, al tiempo que se evaluó el papel de las células madre mesenquimales en el proceso fisiopatológico que subyace a la laminitis. Para hacer esto con éxito, se infundieron células mesenquimales alogénicas derivadas de la médula ósea (CMM-AMO), suspendidas en medios de cultivo, en ambos cascos frontales de caballos crónicamente afectados por laminitis, se monitoreó el progreso clínico de los caballos infundidos a través de evaluaciones clínicas y venográficas. Además, el estudio incluyó biopsias de los cascos para evaluar directamente la regeneración del corion laminar y la termografía de cascos para realizar un seguimiento de la temperatura de los cascos. En general, los resultados mostraron que las infusiones de CMM-AMO: 1) restauran en gran medida la citoarquitectura del corion laminar, 2) regeneran segmentos del lecho vascular y 3) mejoran notoriamente la postura clínica de los caballos tratados, sin tener efectos nocivos locales ni sistémicos en la salud de los caballos al menos hasta el momento en que los caballos fueron monitoreados y bajo el protocolo de tratamiento ideado en esta investigación. Por lo tanto, estas observaciones respaldan que la pérdida de células madre mesenquimales juega un papel fundamental en la patogénesis de la laminitis crónica; su restitución bien puede revertir la condición. Como corolarios secundarios, los clínicos deben investigar medidas dirigidas a prevenir la pérdida de células madre mesenquimales mediante la inducción de la tolerancia inmunológica protectora de los cascos o mediante

el fomento de la autoinmunidad beneficiosa de los cascos en caballos que cursan con enfermedades primarias prolaminitis. Por último, vale la pena enfatizar la necesidad de investigar la posibilidad de usar células madre mesenquimales para controlar el dolor en los caballos.

Material y métodos

Animales

Para realizar este estudio se utilizaron caballos hembras (n= 5) y machos (n= 5) de diferentes razas, edades y diferentes actividades afectados por laminitis crónica (Cuadro 1), ninguno de los caballos estaba bajo ningún tratamiento actual. Todos los animales mostraban rotación de la falange distal, pero no eran hundimientos. El recuento de células sanguíneas (RCS) se extrajo de la vena yugular y se utilizó para evaluar el estado inflamatorio inicial. Todos los caballos se mantuvieron y trataron en sus correspondientes establos habituales. Los animales tuvieron libre acceso al agua y se alimentaron con heno de avena dos veces al día. Los formularios de consentimiento informado fueron firmados por los propietarios. Los protocolos de manejo y procedimiento clínico y experimental de los caballos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria (FMVZ-UNAM) (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”).

Cuadro 1: Caballos de diferentes razas, edades y de diferentes actividades afectados por laminitis crónica

No.	Raza	Sexo	Edad (años)	Actividad	Causa de la laminitis	Duración de la laminitis	Pronóstico inicial	Peso inicial	Peso final	Obel-Glasgow inicial	Obel-Glasgow final	Herraje	
1	Cuarto Milla	de	Yegua	7	Deporte mexicano	Cólico	13 meses	Pobre	480	408	4	1	Ortopédico
2	Appendix		Yegua	12	Servicio de policía	Aborto	+24 meses	Malo	430	450	13	4	Ninguno
3	Pura Sangre		Macho	8	Saltador	Dieta	1 mes	Pobre	450	465	2	1	Ortopédico
4	Cuarto Milla	de	Capón	3	Animal de compañía	Recorte	12 meses	Pobre	320	360	7	2	Ninguno
5	Cuarto Milla	de	Macho	14	Deporte mexicano	Cólico	24 meses	Malo	360	370	13	2	Ortopédico
6	Cuarto Milla	de	Yegua	19	Servicio de policía	Retención placentaria	+24 meses	Malo	460	470	12	4	Ninguno
7	Pura Sangre		Yegua	5	Carrera	Desconocida	12 meses	Malo	496	490	11	4	Ortopédico
8	Cuarto Milla	de	Capón	16	Deporte mexicano	Cambio de dieta	+24 meses	Malo	365	330	13	8	Estándar
9	Santa Gertrudis		Yegua	8	Servicio militar	Desplazamiento del colon	2 meses	Pobre	455	460	2	0	Ninguno
10	Pura Sangre		Macho	3	Carrera	Correr	4 meses	Pobre	400	470	4	0	Ortopédico

Evaluación de la cojera

Se realizó una evaluación ortopédica mediante la observación de las posturas estáticas y dinámicas de cada caballo. Se utilizó la puntuación de dolor de evaluación multifactorial modificada adaptada para caballos laminíticos que califica los signos de dolor y comportamiento alterado combinando, respectivamente, los criterios de Obel y Glasgow⁽⁴⁾. Cuanto más alta sea la puntuación (máximo 14), mayor será el dolor.

Evaluación de la temperatura de los cascos

La inflamación laminar conduce a incrementos en la temperatura de los cascos⁽²⁰⁾. La termografía infrarroja puede utilizarse para estimar el cambio de temperatura a través de la obtención de imágenes de los cascos. Se utilizó la cámara infrarroja FLIR XX5 (FlirTM, EE. UU.) para obtener imágenes en tiempo real de los cascos de la extremidad frontal de los caballos una vez al mes durante seis meses. La temperatura de la banda coronaria se registró *in situ* y se graficó individualmente. Se decidió utilizar la banda coronaria como referencia anatómica para medir la temperatura porque carece de la pared del casco. Esta característica hace que esta región sea adecuada para obtener lecturas de temperatura confiables; la anatomía de la pared del casco en caballos con laminitis crónica puede deformarse mucho. Las sesiones de obtención de imágenes se realizaron a la misma hora (\approx 8 AM), mientras se mantenían a los caballos parados en sus establos y antes de ser paseados a mano. Los cascos siempre se limpiaban antes de la toma de imágenes. Las vistas laterales y dorsales se tomaron a una distancia de 30 centímetros del casco. Las imágenes codificadas por colores se obtuvieron con base a una escala lineal calibrada construida en el programa de adquisición de la cámara.

Venografía

Los caballos se sedaron con clorhidrato de xilacina al 10 % inyectado a través de la vena yugular. El nervio digital palmar lateral y medial se bloqueó utilizando lidocaína al 2 % a nivel de los sesamoideos proximales; el área fue previamente afeitada y limpiada con una solución que contenía gluconato de clorhexidina al 20 %. Se colocó un torniquete con un vendaje Esmarch en el menudillo. Luego se perforó la vena digital lateral utilizando un catéter mariposa 23G y el medio de contraste Iopamidol (Scanlux, San Chemia, México) se inyectó a través de ella lentamente. Para asegurar una distribución adecuada del Iopamidol en todo el lecho vascular del dedo del caballo, el aspecto dorsal de la rodilla se flexionó dorsalmente y los talones se levantaron del suelo. Al final de la administración, los talones soportaron peso, se retiró la jeringa y el catéter se sujetó con unas pinzas Halsted. Se tomaron vistas latero-medial y dorso-palmar a 60 seg del medio de contraste⁽²¹⁾.

Biopsia laminar

El menudillo y la cuartilla se lavaron y secaron. Los caballos se sedaron y los nervios abaxiales laterales y mediales se bloquearon siguiendo las pautas proporcionadas anteriormente. Se colocó un torniquete en el menudillo usando un vendaje Esmarch para reducir el sangrado. La pared dorsal del casco se perforó con una piedra de pulir de 4.8 mm de diámetro (Dremel, Bosch, EE. UU.), a 2 cm de la banda coronaria. La cavidad realizada (9 mm de diámetro) atravesó los estratos externos y medios de la pared del casco hasta llegar a la línea blanca, un punto de referencia anatómico que indica proximidad al corion laminar. La solución salina se regó constantemente para evitar el sobrecalentamiento durante la perforación. Una vez en la línea blanca, se incidió el corion laminar con un bisturí armado con una cuchilla del No. 11, orientada perpendicularmente hacia la pared del casco. El bisturí se movió en el sentido de las manecillas del reloj siguiendo el perímetro de la cavidad hasta llegar a la tercera falange. Luego, con un tallador Frahm del No. 4, el tejido laminar se extrajo de la tercera falange⁽²²⁾. Se obtuvo una muestra laminar de forma cilíndrica, que medía aproximadamente 7 mm en la base y 7 mm de altura. La biopsia se fijó en paraformaldehído tamponado (4 %) durante 24 h, luego se sumergió en una solución tamponada de sacarosa (15 %) durante 24 h, y finalmente se transfirió a una solución tamponada de sacarosa al 30 % a 4 °C hasta su evaluación. El área quirúrgica se secó con gasas y se selló con metacrilato de metilo. El torniquete se retiró después de que el metacrilato de metilo se secó.

Histología

Las biopsias se incrustaron en Tissue-Tek (Neg-50™, Richard-Allan Scientific, EE. UU.), se congelaron en hielo seco y se cortaron longitudinalmente (30 µm de grosor) en un criostato (SLEE), a -25 °C. Las secciones en serie se montaron en portaobjetos con base de gelatina y se almacenaron a -4 °C hasta su uso. Se obtuvo un total de 15 portaobjetos por muestra. Se tomó un portaobjetos cada tres para teñirlo con violeta de cresilo, base de ácido peryódico de Schiff y tinción tricrómica de Masson. Los portaobjetos se cubrieron con con Cytoseal™ 60 (Richard-Allan Scientific) y se observaron a través de un microscopio Olympus BX51-WI. La integridad citológica del tejido y el grado de infiltración inflamatoria se estimaron cualitativamente, y los campos representativos de este material se fotomicrografiaron digitalmente, bajo microscopía de campo brillante, utilizando el software Stereo Investigator™ (10X).

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras del corion laminar obtenidas de un caballo sano y uno laminítico se fijaron en una solución tampón que contenía 4 % de paraformaldehído / 2.5 % de glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) durante 72 h. Después de tres lavados suaves con tampón fosfato salino (0.1M; pH 7.2), las muestras se fijaron posteriormente con tetróxido de osmio (1 %) durante 1 h, luego se deshidrataron e incrustaron en Epon 812. Se

polimerizaron a 60 °C durante 24 h. Las secciones semidelgadas (150 nm) se montaron en portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina, se eligió el área de interés y se montaron secciones ultradelgadas (70 nm) en rejillas de cobre, se contrastaron con acetato de uranilo (2 %) y citrato de plomo (50 %) (Electron Microscopy Sciences) y se observaron a través de un microscopio electrónico de transmisión Jeol 1010 (60kV). La integridad ultraestructural del tejido y el grado de infiltración inflamatoria se estimaron cualitativamente, y los campos representativos de este material se fotomicrografiaron digitalmente.

Muestreo de médula ósea y recolección, aislamiento y expansión de células madre mesenquimales

Se recolectaron muestras (15 ml) de médula ósea (MO) (utilizando jeringas de 20 ml que contenían 1,000 UI de heparina/ml de MO) mediante punción esternal de caballos sanos machos y hembras (3-8 años) de diferentes razas. Las muestras se almacenaron a 4 – 8 °C y se transfirieron en condiciones asépticas a la instalación de cultivo celular dentro de una hora desde de la recolección. La médula ósea se transfirió a tubos estériles llenos de Ficoll Hypaque en una proporción de 1:2. Las muestras se centrifugaron a 400 xg durante 30 min y la fracción mononuclear se aisló en un tubo estéril a 4 °C. La fracción se centrifugó a 300 xg durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron y sembraron, a una densidad de 5×10^4 células/cm², en matraces de 25 cm³ que contenían DMEM:F12 (1:1) suplementados con suero fetal bovino al 20 %, 500 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomina y 2.5 µg/ml de amphotericina B. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO² y los medios de cultivo se cambiaron cada tres días hasta alcanzar una confluencia del 80 %⁽²³⁾.

Subcultivo y escalamiento de células madre mesenquimales

Una vez alcanzada la confluencia del 80 %, las células se subcultivaron semanalmente de la siguiente manera: la monocapa se lavó con DPBS y las células se separaron mediante HBSS con 7.5 mg de tripsina porcina y 0.6 mg de EDTA. Las células se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/cm² en matraces de 75 cm³ (primer subcultivo) y luego en 175 cm³ (subcultivos posteriores) con DMEM F12 (1:1) suplementados con suero fetal bovino al 20 %.

Citometría de flujo

Las células madre mesenquimales alogénicas de la médula ósea se caracterizaron mediante citometría de flujo. Se utilizaron tres conjuntos de anticuerpos para inmunofenotiparlos. Las CMM-AMO utilizadas para la infusión fueron positivas para los marcadores de superficie CD73, CD90, CD105, CD28 y CD44 (CD28/CD44 específicos para MSC equino), negativas para CD45, CD34, CD14 y CD79. La citometría de flujo se realizó con base en protocolos previamente reportados⁽²⁴⁻²⁸⁾.

Administración de CMM-AMO

Los caballos se sedaron y prepararon para la administración de CMM-AMO como se describió anteriormente (ver sección venografía). Las CMM-AMO se diluyeron en solución salina fisiológica y se administraron ($10\text{-}30 \times 10^6$) en la vena digital palmar lateral (o medial) en condiciones estériles a través de un catéter mariposa de calibre 21, conectado a una jeringa de 20 ml, en el caballo de pie. El torniquete se retiró 20 min después de la administración de las células. El dedo se mantuvo vendado durante un día. Las CMM-AMO se inyectaron tres veces en intervalos de un mes.

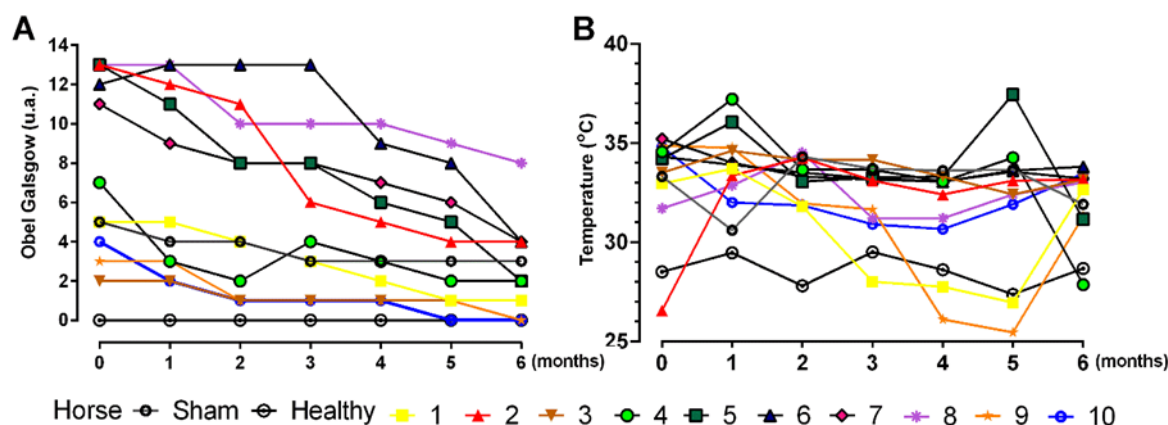
Resultados

Condición clínica de los caballos tratados con CMM-AMO

Los caballos con laminitis crónica tuvieron puntuaciones de Obel-Glasgow que oscilan entre 2 y 14 antes del inicio del tratamiento con CMM-AMO (Figura 1A). En contraste, el caballo sano no mostró cojera o dolor, ni incrementos de temperatura de los cascos en ningún momento durante el período evaluado. A medida que avanzaba el estudio, todos los caballos tratados con CMM-AMO mejoraron su condición clínica después del segundo o tercer mes de haber recibido infusiones venosas de CMM-AMO. Al final del período de seis meses, todos los caballos tratados con CMM-AMO disminuyeron sus puntuaciones de Obel-Glasgow y mejoraron significativamente su movilidad y condición clínica. En general, los caballos con la peor condición inicial fueron los que más mejoraron (Figura 1A). Todos los caballos tuvieron una mejora en la movilidad, calidad y forma del casco, también mejoraron su comportamiento y las facciones de sus caras (escala Grimace), teniendo una buena calidad de vida. Esta mejoría fue atribuible a la infusión de CMM-AMO, ya que el caballo de simulación tratado solo con el vehículo no mejoró durante el transcurso del tiempo experimental (Figura 1A).

En contraste, la temperatura de los cascos en caballos laminíticos osciló entre $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $35.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (promedio de $33.26\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.58$) antes de que comenzara el tratamiento con CMM-AMO. Como referencia, la temperatura en los cascos del caballo sano osciló entre $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (promedio $28.56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.79$). El tratamiento con CMM-AMO no tuvo un impacto importante en la temperatura de los cascos (Figura 1B). En unos caballos tratados, la temperatura del casco tendió a disminuir ligeramente ($1\text{ a }3\text{ }^{\circ}\text{C}$) después de las infusiones de CMM-AMO (promedio de $32.27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.78$). En otros, los cambios de temperatura fueron muy variables durante el transcurso del experimento. Sin embargo, en todos los casos, los caballos tratados con CMM-AMO y el caballo de simulación (promedio de $33.01\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.29$) nunca alcanzaron valores saludables estables de temperatura de los cascos.

Figura 1: Evolución clínica de los caballos después de haber sido tratados con células madre mesenquimales alogénicas de la médula ósea (CMM-AMO)



Evolución clínica (A) y la temperatura de los cascos (B) de los caballos tratados con CMM-AMO, el caballo sano y el caballo de simulación, según lo monitoreado por la escala de Obel-Glasgow y la termografía infrarroja.

Patrón vascular del lecho venoso posterior al tratamiento con CMM-AMO

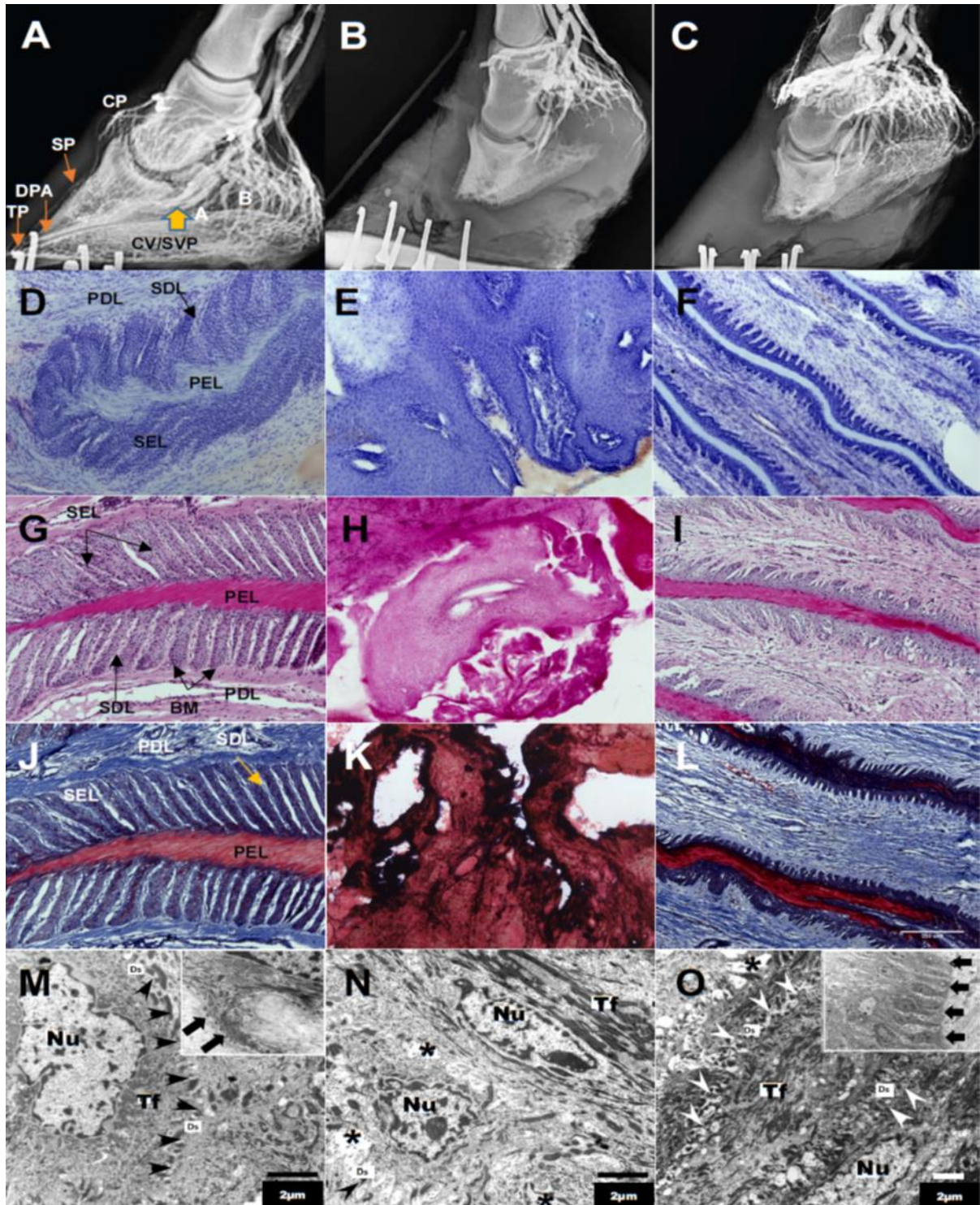
Los cascos del caballo están irrigados por un lecho vascular altamente anastomosado formado por el plexo coronario y las papilas, el plexo venoso sublaminar, las papilas terminales, los vasos circunflejos y los plexos venosos de la planta y el talón (Figura 2A). En caballos laminíticos, los rodales de dislocación crónica de la falange distal interrumpieron significativamente este patrón vascular ordenado. Como se ve en la Figura 2B, los cascos prácticamente se vuelven avasculares; todo el lecho vascular mostró defectos graves de llenado de medios de contraste, excepto los vasos madre en el plexo coronario y del talón, donde los vasos se veían irregulares y algo congestionados. En general, la gravedad del daño vascular se correlacionó con la gravedad de los síntomas (no se muestra). En contraste con los hallazgos venográficos descritos para el paisaje vascular en cascos laminíticos, las imágenes de los cascos obtenidas al final del sexto mes de haber comenzado el tratamiento con CMM-AMO revelaron, en todos los caballos, independientemente de la condición clínica inicial y el grado de daño vascular, indicios de recuperación vascular. Comúnmente, los vasos madre del plexo coronario y del talón se ensancharon y se observaron con frecuencia imágenes de brotes vasculares, al igual que vasos que atravesaban trayectorias algo "aberrantes" (Figura 2C). En otras palabras, un proceso de angiogénesis está claramente en camino. Sin embargo, ninguno de los caballos tratados mostró una recuperación completa del patrón vascular, a pesar de que su mejoría clínica era evidente. Por último, el caballo de simulación no mostró mejoría clínica, ni patrones venográficos de recuperación vascular (no mostrados).

Patrones vascular del casco e histológico del corion laminar de los caballos tratados con CMM-AMO

Los caballos infundidos con CMM-AMO, pero no el de simulación, mejoraron su condición clínica y los patrones vasculares de sus cascos al final del sexto mes de tratamiento. Para evaluar si esta recuperación podría estar asociada a la restauración del tejido de los cascos, se realizó una biopsia y se evaluó histológicamente el corion laminar de un caballo sano, simulado/laminítico y laminítico; el segundo y el tercer grupo fueron muestreados antes y al final del tratamiento, seis meses después de la primera biopsia tomada. Los resultados representativos se muestran en la Figura 2. En el casco del caballo sano (Figura 2D), se observaron laminillas epidérmicas y dérmicas primarias interdigitando regularmente. Las laminillas epidérmicas y dérmicas secundarias, por otro lado, corrían en direcciones opuestas, pero paralelas una al lado de la otra. Las laminillas secundarias mostraban extremos redondeados gracias a la cubierta de la célula basal que avanzaba continuamente hasta la punta. Los núcleos de las células basales epidérmicas se yuxtapusieron opuestamente a la membrana basal (no se muestra). Finalmente, la membrana basal formó una capa delgada y continua debajo del revestimiento de los epitelios (Figura 2G) y el colágeno se organizó regularmente en haces paralelos a través de la dermis (Figura 2J). En marcado contraste, la histología de los cascos en caballos con laminitis crónica mostró una pérdida virtual de la arquitectura laminar (Figura 2E), hiperplasia de células basales con numerosos perfiles celulares picnóticos, (Figura 2H), tejido conectivo abundante, así como infiltración perivascular de células mononucleares (no mostrada). No se observó membrana basal (Figura 2H) ni colágeno (Figura 2K). Finalmente, los cascos de los caballos infundidos con CMM-AMO, pero no el de simulación, recuperaron la disposición laminar, la integridad de la monocapa epitelial sobre una membrana basal regular y continua y la organización y presencia de colágeno (Figura 2F, I y L). No se detectó evidencia de infiltración perivascular mononuclear significativa.

Por último, se realizaron observaciones microscópicas electrónicas para evaluar más a fondo la integridad epitelial en los cascos de los caballos infundidos con CMM-AMO. En el caballo sano (Figura 2M), las células basales se unen entre sí por numerosos desmosomas. Sus núcleos eucromáticos mostraron formas irregulares caracterizadas por hendiduras. También presentaron una disposición citoplasmática conspicua de tonofilamentos. La lámina basal densa en electrones a la que estaban unidos era delgada, regular y continua. Los cascos laminíticos (Figura 2N), por su parte, mostraron escasos desmosomas, espacios intercelulares electrolúcidos abundantes. Las células basales tendieron a mostrar núcleos con grupos de cromatina. Los agregados de tonofilamento citoplasmáticos también fueron frecuentes, y no se observó evidencia de membrana basal. Los cascos en caballos infundidos con CMM-AMO (Figura 2O) mostraron una marcada reducción de los espacios intercelulares electrolúcidos. Los desmosomas se convierten en un hallazgo regular y los núcleos celulares vuelven a su forma regular y disposición de cromatina.

Figura 2: Patrones vascular del casco e histológico del corion laminar después de aplicado el tratamiento con CMM-AMO



A-C. Venografías representativas de cascos de caballos sanos (A), laminíticos (B) e infundidos con CMM-AMO (C). Observe la respuesta vascular en los cascos de los caballos infundidos con CMM-AMO. CP, Plexo Coronario; SP: Plexo Sublaminar; DPA: Ápice de la Falange Distal; TP: Plexo terminal; CV: Vasos circunflejos; A: Arco Terminal de los vasos digitales palmares; B: Plexo del talón; SVP: Plexo venoso plantar. D-L. Fotomicrografías representativas de secciones sagitales del corion laminar de un caballo sano (D, G, J), laminítico (E, H, K) e infundido con CMM-AMO (F, I, L) teñidos con violeta de cresilo (núcleos celulares; D-F), PAS (Membrana basal; G-I) o técnicas histoquímicas de Masson

(Colágeno; J-L). Observe la restauración del corion laminar en caballos infundidos con CMM-AMO. PEL: Laminillas Epidérmicas Primarias; PDL: Laminillas dérmicas Primarias; SEL: Laminillas Epidérmicas Secundarias; SDL: Laminillas dérmicas Secundarias; BM: Membrana basal. M-O. Micrografías electrónicas representativas que muestran características ultraestructurales de células basales en caballos sanos (M), laminíticos (N) e infundidos con CMM-AMO (O). Observe la recuperación de la disposición de cromatina y tonofilamentos, así como la de desmosomas en caballos infundidos con CMM-AMO. Nu: Núcleo; Tf: Tonofilamentos; Ds y puntas de flecha: Desmosomas; *: edema; Las flechas en los recuadros señalan la membrana basal. Consulte el texto para obtener una descripción detallada de la Figura 2.

Discusión

La laminitis crónica es una enfermedad inflamatoria que afecta los cascos del caballo. Angelone *et al*⁽³⁾ propusieron que la pérdida de células madre mesenquimales es el evento fundamental que subyace a la fisiopatología de la laminitis crónica. Aunque sus resultados respaldan su afirmación, no pudieron atribuir de forma irrefutable sus hallazgos clínicos y venográficos a las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo infundidas porque las células fueron coinfundidas con plasma rico en plaquetas. Además, confundieron la interpretación de sus resultados porque infundieron primero células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo alogénicas y luego autólogas en los caballos laminíticos. Por último, no proporcionaron pruebas directas de la regeneración del corion laminar en los caballos recuperados. El presente trabajo supera todos estos problemas técnicos al infundir solo CMM-AMO, suspendidas en medios de cultivo, en ambos cascos frontales de caballos afectados crónicamente por laminitis. De acuerdo con la predicción de Angelone, la infusión de CMM-AMO en la vena digital lateral de los cascos laminíticos mejoró significativamente las condiciones clínicas de todos los caballos tratados, al tiempo que restauró considerablemente las características citoarquitecturales del corion laminar de los cascos. Esto estuvo acompañado de una reducción de la infiltración inflamatoria perivascular de las células mononucleares, como también lo predijeron Angelone *et al*⁽³⁾ con base en sus resultados biológicos moleculares; ellos encontraron una mayor expresión de ARNm de citoquinas antiinflamatorias y proteínas antioxidantes. La especificidad de estos hallazgos está respaldada por el hecho de que el caballo de simulación, infundido solo con medios de cultivo, permaneció sintomático y sus cascos mostraron el deterioro histológico característico del corion laminar al final del tiempo experimental. A pesar de que los presentes resultados apoyan circunstancialmente que las CMM-AMO promueven la regeneración del tejido de los cascos al reducir, en parte, la inflamación local, en este caso, esta noción aún espera confirmación directa mediante la estimación de citoquinas proinflamatorias en el corion laminar de los caballos laminíticos tratados y no tratados con CMM-AMO. Hasta donde se sabe, hasta la fecha, no existe una forma confiable de realizar tales estimaciones^(29,30). En cualquier caso, como ya se ha comentado, estos resultados respaldan los reportados por Angelone *et al*⁽³⁾, quienes sugirieron que las células madre mesenquimales promoverían la regeneración del corion laminar al ejercer no solo acciones antiinflamatorias, sino también inhibiendo la degradación de la matriz extracelular mediada por MMP, amortiguando el daño de ROS y reclutando células endoteliales y

madre locales y circulantes. Ciertamente, la evidencia venográfica obtenida por esta investigación de caballos tratados también apoya el llamado de Angelone.

Un hallazgo clínicamente relevante fue que, a pesar de que los caballos infundidos con CMM-AMO mejoraron su condición clínica y restauraron en gran medida la citoarquitectura de los cascos, la temperatura de los cascos se mantuvo elevada en los caballos tratados. A primera vista, se podría pensar que estos hallazgos descartan el monitoreo de la temperatura como un procedimiento sensible para seguir el progreso del tratamiento. Sin embargo, el hecho de que la restauración vascular sea parcial en todos los caballos tratados al final del periodo experimental sugiere lo contrario. Por un lado, este hallazgo podría indicar que sigue habiendo algún grado de inflamación que promueve que la temperatura se mantenga alta a través del tejido relativamente avascular en los cascos aún en regeneración. Sin embargo, es probable que la temperatura de los cascos más alta de lo normal no esté relacionada con una inflamación duradera, ya que se encontró que la cojera y el dolor se redujeron significativamente en los caballos infundidos con CMM-AMO. Alternativamente, la falta de recuperación completa del lecho vascular puede poner en peligro la disipación de calor de los cascos. Aunque, hasta donde se sabe, tal función no se ha atribuido a la red vascular de los cascos del caballo, es bien sabido que los lechos vasculares pueden funcionar como dispositivos de enfriamiento en otras partes del cuerpo del mamífero [para la Teoría del Radiador ver Falk, 1990⁽³¹⁾]. En cualquier caso, el monitoreo a largo plazo del lecho vascular y temperatura de los cascos en los caballos tratados podría ayudar a evaluar esta posibilidad.

La angiogénesis es un proceso por el cual los vasos sanguíneos se forman nuevamente brotando de los vasos precursores existentes⁽³²⁻³⁴⁾. De acuerdo con los resultados de Angelone, se obtuvo evidencia venográfica de angiogénesis en curso de los plexos coronarios y del talón de caballos laminíticos tratados con CMM-AMO. Estos datos pueden interpretarse de tres maneras no excluyentes mutuamente. Primero, pueden mostrar que los vasos sanguíneos de los cascos dañados conservan su capacidad de producir células endoteliales, capaces de recrear vasos funcionales; por lo tanto, la infusión de CMM-AMO puede liberar células madre vasculares locales. En segundo lugar, las CMM-AMO infundidas se comprometen con el linaje de células endoteliales, impulsando así la angiogénesis en los cascos de los caballos tratados una vez sembradas. En tercer lugar, las CMM-AMO infundidas pueden favorecer el reclutamiento de células madre autólogas circulantes que se comprometen con el linaje endotelial. Aunque la evidencia actual apoya que las CMM promueven la angiogénesis⁽³⁴⁾, las otras alternativas siguen abiertas a la investigación. Por lo tanto, los futuros estudios de etiquetado de linaje celular seguramente ayudarían a desenredar este enigma. En cualquier caso, lo que parece estar claro es que, bajo las condiciones experimentales utilizadas, los plexos coronarios y del talón contienen nichos que facilitan el desarrollo de la angiogénesis dadas las condiciones adecuadas. Este proceso parece recapitular la secuencia embrionaria ya que la vasculogénesis en el casco embrionario procede siguiendo un gradiente proximal a distal⁽³⁵⁾.

Otro hallazgo interesante en este trabajo es que la restauración de tejidos, hasta el punto en que se tomó la última biopsia de caballos infundidos con CMM-AMO, fue notable, sin evidencia de curación viciosa, ni cicatrices de ningún tipo, al menos en el sitio muestreado de todos los caballos evaluados. Tal observación sugiere que los cascos de los caballos pueden mantener un ambiente bioquímico similar al observado en las etapas ontogenéticas. Esta posibilidad gana apoyo a partir de la observación en el cerebro, donde el hipotálamo adulto exhibe un tremendo potencial de plasticidad debido a la presencia de moléculas de glicano polisialiladas que facilitan la remodelación del tejido^(36,37). Los estudios dirigidos a comparar la composición molecular del tejido conectivo de los cascos a diferentes edades pueden proporcionar evidencia para evaluar el mérito de este supuesto.

En un estudio previo⁽³⁾ se encontró que una mezcla de CMMa combinada con PRP mejora la condición clínica de los caballos afectados por laminitis crónica. Como reconocieron, no pudieron determinar si la mejoría clínica observada en los caballos tratados se debió a CMMa o PRP o respondió a un efecto sinérgico de ambos, ya que no probaron la administración de ninguno de los dos por separado. En el presente trabajo, aunque las células madre no son de la misma clase, claramente la mejora clínica y la restauración tisular pueden atribuirse mejor a las CMM-AMO infundidas, ya que la infusión del vehículo (es decir, los medios de cultivo) no tuvo un efecto notable en ninguno de los parámetros evaluados en el caballo de simulación (los estudios futuros deben aumentar el número de caballos de simulación para fortalecer estas observaciones). Sin embargo, lo que nuestro estudio no reveló, es cómo las CMM-AMO promueven la regeneración tisular ya que la reconstitución vascular fue solo parcial [ver Angelone⁽³⁾, King⁽³²⁾, Gu⁽³⁸⁾, para consideraciones teóricas]. En este sentido, las CMM-AMO podrían haber migrado del lecho vascular reconstituyente y colonizar territorios relativamente avasculares. Además, las CMM-AMO pueden producir y liberar factores solubles o exosomas^(33,39-41), que podrían vigorizar las células madre locales para proliferar, diferenciar y restituir el tejido dañado. Por último, las CMM-AMO pueden promover el reclutamiento de células madre circulantes autólogas y su invasión de las regiones avasculares de los cascos. Los estudios de linaje combinados con biopsias adicionales tomadas en lugares de los cascos distantes al sitio de administración ayudarían a evaluar estas posibilidades. También podrían ayudar a descartar un posible sesgo durante la biopsia tomada, ya que las biopsias podrían haberse obtenido inadvertidamente de lugares donde el frente de la vasculogénesis estaba activamente en curso.

Se debe hacer una consideración final con respecto al uso de células madre alogénicas. Se podría pensar que la posibilidad de inducir reacciones inmunológicas aumentaría mediante el uso de células alogénicas⁽⁴²⁾. Los resultados en el presente estudio y los publicados por otros^(3,43,44), apoyan que la infusión de células madre alogénicas es lo suficientemente segura ya que los caballos tratados no presentaron evidencia de rechazo hasta el momento en que fueron evaluados. En contraste, aunque muchos consideran que el uso de células madre autólogas es más seguro, estudios recientes muestran que pueden desarrollar mutaciones *de novo* en el ADN mitocondrial que produce neoepítotos

inmunogénicos⁽⁴⁵⁾, aumentando así la posibilidad de rechazo inmunológico⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Además, se ha demostrado que las células madre/estromales derivadas del tejido adiposo que recapitulan la expresión de biomarcadores de envejecimiento muestran una plasticidad reducida de las células madre⁽⁵⁰⁾, lo que impide su uso potencial como fuente autóloga de células terapéuticas; este también podría ser el caso de las células alogénicas.

Conclusiones e implicaciones

En conclusión, las infusiones de CMM-AMO mejoraron las condiciones clínicas y promueven la restauración histológica de los cascos en caballos laminíticos. El procedimiento fue inocuo, independiente del sexo y efectivo al menos hasta por un período de 6 meses. Los estudios futuros deben aumentar el tamaño de la muestra y el tiempo de seguimiento para apreciar realmente los beneficios a largo plazo del tratamiento y si se necesitan infusiones adicionales de CMM-AMO. También se debe evaluar un método de administración menos invasivo, aunque estudios previos demostraron que la administración a través de esta vía no afecta a la eficiencia y eficacia terapéutica de las células madre si la dosis se calcula correctamente. También se deben evaluar los efectos del herrado y el recorte del casco. Finalmente, el uso de CMM-AMO para el manejo del dolor es otro tema que merece investigación con base en los resultados actuales. En cualquier caso, los datos aquí obtenidos respaldan que la pérdida de células madre mesenquimales es de hecho el evento crítico que conduce a la laminitis crónica. Por lo tanto, las medidas dirigidas a inducir tolerancia inmunológica contra el tejido mesenquimal de los cascos pueden ayudar a prevenir dicha pérdida. En este sentido, la infusión de antígenos mesenquimales obtenidos de los cascos laminíticos en la cámara anterior del ojo puede ser un camino para investigar en los próximos años⁽⁵¹⁾.

Financiación

Alma Angélica García Lascuráin fue estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM y recibió la beca No. 133213 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México. Los autores agradecen a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), proyecto PAPIIT IN225316 y a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por el apoyo financiero de esta investigación.

Agradecimientos

Los autores agradecen al MVZ Roberto Oropeza, MVZ, MSc Abraham Pineda Aranda, MVZ Roberto Juárez Cervantes y MVZ Jennifer A. Michel Mancilla por su apoyo médico y zootécnico. También estamos en deuda con el MVZ Jorge Rodríguez Lezama por su apoyo técnico en la realización de los estudios venográficos. El cultivo de células madre y la citometría de flujo fueron instrumentados por la IBT Antonia Lizbeth Mireles Ruiz

y el MC Moisés López Dávila a quienes agradecemos. Por último, también agradecemos al MVZ MSc José Ramírez Lezama, Biol. Maribel Nieto Miranda y MVZ MC Araceli Lima Melo por el aporte conceptual y técnico brindado para obtener y analizar las muestras histológicas. Laura Padierna Mota, Karyna Pérez Saldaña, Jaime Rodríguez Manuel de UNe Aplicaciones Biológicas, Laboratorios de Especialidades Inmunológicas.

Conflictos de intereses

Los autores reconocen que no existen intereses financieros en competencia o intereses de ninguna otra fuente, para divulgar.

Literatura citada:

1. Lecchi C, Dalla CE, Lebelt D, Ferrante V, Canali E, Ceciliani 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, Golim 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, Nolte 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: Willey, Blackwell, Iowa; 2017:22-38.
36. Theodosis DT, Poulain DA, Oliet 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).