

Nanogeles, uso potencial en endometritis crónicas y endometriosis en yeguasJavier Funes^{1,4*}, María Laura Soriano Pérez¹, María Molina², Fabrisio Alustiza^{1,3}

¹INTA, Marcos Juárez; ²Instituto de Investigaciones en Tecnologías Energéticas y Materiales Avanzados (IITEMA-UNRC); ³ Universidad Nacional de Rosario; ⁴ Maestría en Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

*javierfunes.ale@gmail.com

Resumen

La endometritis equina constituye una de las más frecuentes causas de enfermedad en la yegua y la principal de fallo reproductivo. Esta patología es ampliamente reconocida por clínicos, en yeguas susceptibles a padecerla, después del servicio o inseminación, siendo caracterizada como recurrente y persistente. Las terapias convencionales para su abordaje clínico incluyen, entre otras, la utilización de antibióticos en combinación con agentes que potencian su efecto, por ejemplo, compuestos que actúan sobre biofilms, con escasa evidencia científica que demuestre su inocuidad a nivel endometrial. La nanomedicina, brinda novedosas herramientas nanotecnológicas a problemas específicos suscitados en el campo de la biomedicina. Los nanogeles son compuestos poliméricos, ampliamente estudiados en aplicaciones médicas, debido a su biocompatibilidad, posibilidad de funcionalización, transporte de principios activos, hidrosolubilidad y capacidad de responder ante estímulos externos, entre otros. Por lo mencionado previamente, planteamos como objetivo del presente artículo, el análisis de potenciales usos de nanogeles en yeguas para el tratamiento de endometritis y endometriosis, utilizando bibliografía publicada y distinguiendo las características favorables de los mismos en esta aplicación. Destacamos, basándonos en la evidencia científica actual, que la utilización de nanogeles podría brindar ventajas sustanciales en el ámbito de la reproducción equina, asociado a la aproximación terapéutica de la endometritis, como también en posibles terapias regenerativas destinadas a tratar la endometriosis.

Palabras clave: endometritis, endometriosis, nanogel, moco

Abstract

Equine endometritis is one of the main causes of disease in the mare, and it is the most important cause of reproductive failure. It is widely recognized by clinicians in mares susceptible to suffer it, after breeding, being characterized as persistent and recurring.

The conventional clinical therapies include, among others, the use of antibiotics, in combination with agents that can act synergistically with the antimicrobial therapy, for instance, compounds that act on biofilms, with a lack of scientific evidence to demonstrate its safety in the endometrial epithelium. Nanomedicine provides novel nanotechnological tools to specific problems in the field of biomedicine. Nanogels are polymeric compounds, widely studied in medical applications, due to their water solubility, biocompatibility, functionalization capacity, bioactives transport, and ability to respond to external stimuli, among others. Based on the aforementioned, we propose as the objective of this article, to analyze the potential uses of nanogels in mares for the treatment of endometritis and endometriosis, taking into

NOTA TÉCNICA

Funes *et al.* Nanogeles, uso potencial [...] account published bibliography on their use, as well as distinguishing favorable characteristics for this application. We highlight, based on current scientific evidence, that the use of nanogels could provide substantial advantages in the field of equine reproduction, associated with the therapeutic approach to endometritis, such as regenerative therapies for endometriosis.

Keywords: endometritis, endometriosis, nanogel, mucus

Introducción

La endometritis constituye la principal causa de falla reproductiva en yeguas (Troedsson, 1999). Su cuadro de presentación clínica, persistente y recurrente, es ampliamente reconocido en los sistemas productivos equinos, caracterizado por la incapacidad de resolver el proceso inflamatorio endometrial agudo, ocasionado por el contacto del endometrio con semen y/o microorganismos que pudieran ingresar al momento del servicio o inseminación, en un plazo menor a 36-48 horas.

Esta condición se encuentra, entre otros factores, relacionada con la edad de la yegua, en particular en mayores a 18 años, las cuales representan en programas de cría comerciales del 10 al 20 % (Luis Losinno, comunicación personal).

Los causantes que determinan el desarrollo de la mencionada condición patológica, son multifactoriales, y no completamente dilucidadas hasta el momento. Esto produjo que hayan sido ampliamente abordadas por clínicos e investigadores durante más de 40 años generando cientos de publicaciones, por esta razón, basándonos en la patogenia actualmente reconocida (Canisso, Segabinazzi y Fedorka, 2020), solo abordaremos las causas que involucren una potencial aproximación terapéutica utilizando nanotecnología, y en particular nanogeles.

El objetivo de este artículo, es el de desarrollar algunos conceptos relacionados con los potenciales beneficios de la nanotecnología, en particular nanogeles, aplicada al área específica de la reproducción equina, abordando tópicos de interés productivo como la endometritis crónica y endometriosis. También, dar a conocer la línea de investigación del grupo de trabajo, con un proyecto doctoral en desarrollo bajo esta temática, con el propósito de establecer vínculos académicos que faciliten la realización de estudios multidisciplinarios y multicéntricos, en aspectos técnicos y económicos.

Nanomedicina

La aplicación de la nanotecnología en la medicina, denominada nanomedicina, involucra sistemas de transporte de fármacos, diagnóstico por imágenes, agentes de detección de condiciones patológicas y su tratamiento, que en su conjunto constituyen el campo de la teranóstica (combinación de diagnóstico y terapéutica), entre otras múltiples aplicaciones (Molina *et al.*, 2015).

La primer nanomedicina aprobada de uso en humanos, denominada comercialmente, Doxil®, fue en el año 1995 (Barenholz, 2012). El mismo consta de un API (por sus siglas en inglés *Active Pharmaceutical Ingredient*), doxorubicina (quimioterápico), encapsulado en liposomas (estructuras nanométricas lipídicas), el cual fue diseñado para tratamiento de pacientes con cáncer. Debido a su tamaño nanométrico, la formulación aprovecha un mecanismo denominado efecto EPR (por sus siglas en inglés *Enhanced Permeability and*

NOTA TÉCNICA

Funes *et al.* Nanogeles, uso potencial [...] *Retention*), que le confiere la capacidad de atravesar los capilares tumorales. En la mencionada condición los mismos presentan una mayor permeabilidad que los normales (situación similar se observa en los procesos inflamatorios), y permiten su acumulación en el interior del tumor, liberando en este momento el API. Esta alternativa terapéutica permite disminuir la dosis del API administrado, minimizando de manera considerable los efectos adversos en el organismo.

Este escenario brindado por la nanomedicina, cambia por completo los conocimientos tradicionales de la farmacología donde la cantidad de fármaco suministrado se encuentra correlacionado de manera positiva con la concentración en el interior de un determinado tejido.

Las nanoestructuras naturales o sintéticas, presentan al menos una de sus dimensiones, dentro del rango de 1 a 100 nanómetros (nm) (un nanómetro = la millonésima parte de un milímetro). A modo de referencia, podemos considerar el tamaño de bacterias, entre ellas estreptococos, de aproximadamente 1500 nm, *Escherichia coli* 5000 nm, o de virus como el de Influenza de 120 nm. En esta escala de la materia aparecen propiedades que determinan novedosos patrones de interacción con los sistemas corporales, diferentes a los observados en la macroescala.

Nanogeles

Los nanogeles pertenecen al grupo de nanomateriales poliméricos, formados por redes poliméricas que en combinación con un agente entrecruzante forman estructuras tridimensionales esféricas. Se caracterizan por su gran flexibilidad, alta capacidad de carga de agua, variable solubilidad que puede depender de un estímulo externo, biocompatibilidad, y posibilidad de ser funcionalizados para distintos propósitos. Por lo citado, mencionaremos algunos de sus potenciales que justifican su uso en el campo biomédico:

Elevada superficie de exposición: le brinda la capacidad a estas estructuras de responder rápidamente a estímulos externos, como así también interactuar a nivel superficial con grandes concentraciones de compuestos que le confieren distintas propiedades, entre ellos, polipéptidos, glúcidos y poliéteres, siendo uno de sus principales representantes el quitosano, manosa y polietilenglicol (PEG), respectivamente.

Ausencia de fuerzas gravitatorias con predominio de las electromagnéticas: les permite lograr superiores niveles de distribución en los sistemas corporales aplicados y distintos patrones de interacción con los componentes del mismo. Por ejemplo, nanogeles catiónicos interactúan con la carga negativa de la mucina presente en las superficies mucosas, o con la superficie de células eucariotas.

Capacidad de difundir a través de barreras biológicas: las distintas interacciones del nanogel con la superficie celular pueden determinar procesos de endocitosis o de transcitosis, como también favorecer los movimientos paracelulares. Diferentes investigadores han demostrado la capacidad de estas estructuras de atravesar limitantes físicas:

Piel: la posibilidad de atravesar el estrato corneo de explantos de piel humana e interactuar con sus componentes, es posible con la utilización de determinados nanogeles (Giulbudagian *et al.*, 2016).

Barrera hematoencefálica: diferentes nanogeles demostraron su capacidad de cruzar esta barrera, transportando un API en su interior.

Sistema Nervioso Central (SNC), por el nervio trigémino u olfatorio en aplicaciones nasales (Picone *et al.*, 2017): es una estrategia de administración novedosa, lograda con determinados nanogeles, para el acceso al SNC, vía nerviosa ascendente. Esta ruta presenta la ventaja de evitar las adversidades asociadas a la aplicación sistémica, entre ellas, la limitada difusión a través de la barrera hematoencefálica.

Capacidad de transportar un determinado API, protegiéndolo en distintas condiciones como el pH estomacal o la acción enzimática de procesos inflamatorios.

Capacidad de liberar el API bajo determinados estímulos externos: estos nanogeles, denominados “inteligentes”, son sintetizados con el objetivo de responder a cambios de temperatura, pH, potencial redox, fuerza iónica, entre otros. Los termosensibles (Figura 1), al estar constituidos por polímeros que responden a modificaciones en la temperatura, tienen la capacidad de hincharse cuando la misma está por debajo de su temperatura de transición de fase (T_f) (incorporando agua), y colapsar al encontrarse en medios por encima de su T_f . La T_f es variable dependiendo del polímero utilizado en su síntesis, y puede variar desde 6 °C a 99 °C. Para el caso de los de N- isopropilacrilamida (PNIPAM), su T_f se encuentra cercana a 32 °C, por ende, se colapsan al entrar en contacto con homeotermos, liberando así un posible API hidrosoluble

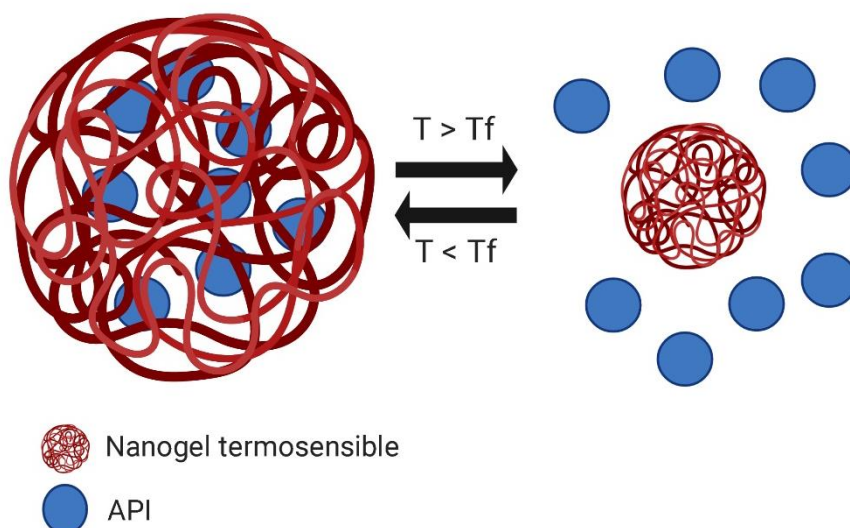


Figura 1. Representación esquemática de nanogel termosensible. Nanogel termosensible en su estado hinchado con el fármaco incorporado en su interior (izquierda), por debajo de su temperatura de transición de fase (T_f) y colapsado por encima de su T_f liberando el API (derecha). El gráfico indica con sus flechas en ambas direcciones la reversibilidad entre sus estados a medida que se modifica la temperatura del medio en el que se encuentran. API: *Active Pharmaceutica Ingredient*.

Aplicaciones biomédicas de los nanogeles

La aplicación biomédica más promisoriosa de los nanogeles es la administración a través de las mucosas. Esta vía permite desarrollar tratamientos locales, evitando los posibles efectos adversos asociados a la ruta sistémica, en órganos tales como el sistema gastrointestinal, urinario, ocular, auditivo, respiratorio, reproductivo.

El moco que recubre estas superficies es un gel visco-elástico compuesto por proteínas, sales, carbohidratos, anticuerpos, bacterias y restos celulares (Ensign, Cone, y Hanes, 2012). La principal glucoproteína que lo compone es la mucina, la cual se dispone formando redes atravesadas por poros acuosos con un tamaño entre 20 a 800 nm, determinando que partículas hidrosolubles en este rango de dimensiones pueden ser mucopenetrantes.

Existen diversas estrategias destinadas a añadirle a los nanogeles la capacidad de interactuar con la superficie mucosa (Figura 2), entre ellas la posibilidad que brindan de ser funcionalizados, con el objetivo de lograr mecanismos de mucoadhesión o mucopenetración.

La funcionalización de los nanogeles con moléculas como ácido poliacrílico, quitosano, pectinas, celulosa o alginato, le confieren el potencial de interactuar con la mucina, proveyéndoles el fenómeno de mucoadhesión. Esta estrategia es interesante para lograr sistemas de liberación prolongada, transportando distintos API (antibióticos, péptidos antimicrobianos, inmunomoduladores, antígenos, entre otros).

El objetivo de mucha-penetración se logra mediante estrategias pasivas o activas. La estrategia activa involucra la carga del nanogel con el mucolítico acetilcisteína (ACS) que rompe los enlaces disulfuro del moco. Para el caso de los mecanismos pasivos, se pueden funcionalizar con facilitadores hidrofílicos, como el polietilenglicol (PEG), o realizando una determinada síntesis que determine la presencia de cargas electromagnéticas superficiales.

La funcionalización con PEG, permite al nanogel difundir con mayor facilidad a través de los poros acuosos presentes en el moco. Para el caso de los sintetizados con cargas electromagnéticas superficiales, como los ligeramente negativos, la mucopenetración, ocurre por la repulsión con la carga negativa presente en la superficie mucosa (otorgada por la mucina), así mismo, la combinación de igual proporción entre cargas positivas y negativas (denominados imitadores de virus), también consigue lograr el efecto mencionado (Cuggino *et al.*, 2019).

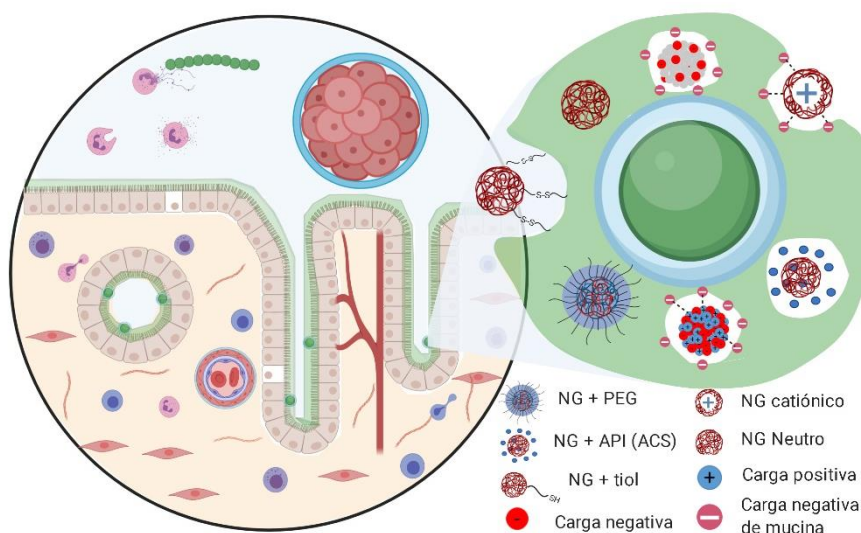


Figura 2. Diferentes estrategias para lograr las propiedades de muco-adhesión y muco-penetración en aplicaciones mucosas de nanogeles. Representación esquemática del lumen uterino, epitelio y estrato compacto endometrial (izquierda), con la imagen ampliada (derecha) representando un estreptococo “*dormant*”, rodeado por distintos nanogeles, interactuando de diferentes maneras con el moco.

Endometritis en la yegua

La disrupción del *clearence* mucociliar juega un considerable rol en procesos patológicos como la endometritis, producto de las distintas condiciones que determinan la acumulación de fluido en el útero. La capacidad del sistema inmune innato se ve comprometida debido a la degradación del complemento y la disminución en la opsonización de bacterias (Causey, 2007). La utilización de nanogeles puede ofrecer una interesante aproximación terapéutica ante esta condición patológica, de las siguientes maneras:

Brindando mecanismos de mucoadhesión o mucopenetración, para lograr mayores tiempos de permanencia y mejores niveles de distribución endometrial de los API.

Protegiendo los API, por encapsulación, en el ambiente inflamatorio propiciado por la endometritis, evitando su posible degradación en el lumen uterino.

Liberando los API a nivel del epitelio o glándulas endometriales gracias a los mecanismos de liberación controlada mencionados.

Se ha reportado que el 90 % de los agentes infecciosos causantes de endometritis presentan el potencial de formar biofilms (Canisso, Segabinazzi y Fedorka, 2020). Estos se consolidan en una forma de resistencia bacteriana, son utilizados como sustento para su desarrollo y medio de comunicación, formando así verdaderas comunidades microbianas.

Los procesos de intercambio de diversos materiales entre los microorganismos que los integran pueden favorecer incluso re-arreglos de material genético. Además, la formación de esta matriz compleja en la que las bacterias se encuentran inmersas, genera una barrera física que contribuye a la evasión por parte de las mismas al sistema inmune (Frible *et al.*, 2018) y al contacto con antibióticos.

Las bacterias incluidas en biofilms presentan además la capacidad de bajar su ritmo metabólico, y es otra de las causas que contribuyen a la disminución del efecto antimicrobiano de los antibióticos, ya que tienen como modo de acción la de interrumpir parte de este proceso (Ferris *et al.*, 2017), siendo más eficaces cuando la bacteria se encuentra en una fase reproductiva activa.

La presencia de biofilms genera que muchas terapias convencionales que involucran el uso de antibióticos no resulten efectivas al momento de resolver la endometritis infecciosa. Esta consecuencia determina que el proceso se torne recurrente, por más que la bacteria posea sensibilidad *in vitro* al antibiótico utilizado.

Ensayos *in vitro*, en donde estimulan la formación de biofilms, evidencian un gran aumento de la resistencia antibiótica (Nascimento Júnior *et al.*, 2018), por ello, para el tratamiento de la endometritis bacteriana, es recomendado, la utilización de antibióticos en combinación con ACS, DMSO o tris-EDTA (Katila, 2019), que tienen la capacidad de romper los biofilms, o que actúan facilitando la difusión del antibiótico.

Estos agentes son ampliamente utilizados en la práctica clínica, por más que exista escasa evidencia científica que demuestre su inocuidad. Tal es el caso, de la ACS a la que se le ha sugerido recientemente un potencial efecto nocivo a nivel endometrial (Caissie *et al.*, 2020).

NOTA TÉCNICA

Funes *et al.*

Nanogeles, uso potencial [...]

La utilización de nanogeles trae aparejado una serie de potenciales beneficios en la terapéutica contra bacterias productoras de biofilms:

Nanogeles de quitosano presentan capacidad antimicrobiana, actuando contra bacterias, las cuales fueron estimuladas a formar biofilms, de manera eficiente (Chávez de Paz *et al.*, 2011).

La utilización de nanogeles “inteligentes” que liberan los API en situaciones de bajo potencial rédox, situación observada en biofilms (Ferris, 2017), podría resultar una estrategia terapéutica que determine la liberación del API solo en el sitio de acción.

La posibilidad de transportar productos antimicrobianos como antibióticos y péptidos, entre ellos, lactoferrina (Fedorka *et al.*, 2018), agentes inmunomoduladores (Yu-Qing *et al.*, 2019), y otras biomoléculas de interés, mejorando la difusión de las mismas a través de las barreras físicas impuestas por los biofilms.

La bacteria *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus*, es documentada por ser una de los principales agentes causantes de endometritis infecciosas, tiene la capacidad de alojarse en la profundidad de los pliegues endometriales y dentro de las glándulas (además del potencial de formar biofilms). Al alcanzar esta ubicación desarrolla un estadio inactivo (“*dormant*”) con la particularidad de reactivarse bajo ciertas circunstancias como el servicio/inseminación o la instauración intrauterina de bActivate®, producto comercial utilizado para su diagnóstico y tratamiento (Petersen *et al.*, 2018).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de antimicrobianos, necesaria para actuar contra *S. zooepidemicus* en su estadio inactivo se incrementa considerablemente (Petersen *et al.*, 2015). En un estudio realizado en vacas, la aplicación intramamaria de nanogeles con tilmicosina permitió disminuir a la mitad la cantidad del antimicrobiano utilizado, comparado con la administración por la misma vía del principio activo solo, destinado al tratamiento de mastitis ocasionadas por *Staphylococcus aureus*, patógeno intracelular facultativo. Los autores consideraron que esta mejoría se debe al hecho de lograr una mayor distribución del nanogel dentro de la glándula mamaria y al favorecer la incorporación del antibiótico en el compartimento intracelular (Zhou *et al.*, 2019).

La combinación de nanogeles mucopenetrantes que permitan alcanzar las profundidades de los pliegues endometriales equinos, transportando antimicrobianos eficientes para *S. zooepidemicus* y liberándolos de manera controlada en este sitio, podrían resultar ventajosos debido a su probada capacidad de reducir la CIM, citada anteriormente.

La utilización de herramientas brindadas por la nanotecnología complementando a las terapéuticas convencionales actuales, se vuelven relevantes ante problemas productivos específicos como el incremento de cepas bacterianas multiresistentes, y en nuevos escenarios planteados por los estudios de secuenciación masiva (Heil *et al.*, 2018), con la determinación del microbiota presente en el útero de la yegua.

Este escenario actual, se contrapone al uso frecuente y muchas veces no racional de antibióticos, que contribuyen a la aparición de resistencia antimicrobiana, o la potencial disbiosis endometrial con el establecimiento de endometritis de naturaleza infecciosa.

Nanogeles y medicina regenerativa

Otro uso potencial de la nanotecnología es en el campo de la medicina regenerativa. Es un área en auge, ampliamente estudiada y utilizada en regeneración ósea, trastornos vesicales, problemas cardíacos y de la vasculatura sanguínea (Grimaudo, Concheiro A y Alvarez-Lorenzo, 2019), en equinos se encuentra principalmente asociado a reparación de injurias musculo-esqueléticas. Se basa en la utilización de células madres, que por la ocurrencia de un determinado estímulo, tienen la capacidad de diferenciarse en los grupos celulares que originalmente conformaban el tejido. Esto le brinda, la posibilidad de devolver al órgano su función que fue afectada en el desarrollo de procesos crónicos con deposición de tejido fibroso (afuncional), tumores, o cuadros agudos como fracturas o tendinitis.

En el útero de la yegua, el desarrollo de endometritis crónicas puede conducir a una fibrosis uterina severa. El reemplazo del tejido uterino normal por fibras cicatrizales, determina en su estadio final la incapacidad de lograr una gestación a término o generar cuadros clínicos asociados que dificulten este hecho (endometritis recurrente, insuficiencia placentaria, gestación prolongada, aborto, muerte neonatal, potrillos dismaduros).

Se ha demostrado que la instilación intrauterina de células madres en úteros saludables de yeguas tiene la capacidad de modular la respuesta inflamatoria a nivel endometrial pero no de migrar e incluirse dentro del endometrio (Rink *et al.*, 2018).

La utilización de andamiajes (*scaffolds*) son herramientas muy utilizadas en medicina regenerativa, que brindan una estructura sobre la cual las células madres pueden proliferar y diferenciarse, evitando la remoción por parte de los mecanismos de *clearance* del organismo.

La matriz extracelular (MEC) obtenida con métodos de descelularización uterina sirvió como *scaffolds* para mejorar la fertilidad de ratones con daños uterinos (Miyazaki y Maruyama, 2014). En ovejas se evaluó la posibilidad de obtener MEC con distintos procedimientos de descelularización uterina y la capacidad de reepitelización de la misma con células madres *in vitro* (Tiemann *et al.*, 2020).

La utilización de nanogeles en medicina regenerativa, podría modificar la estructura de *scaffolds* producto de su unión con los mismos, así también transportar promotores de crecimiento y diferenciación (Grimaudo, Concheiro y Alvarez-Lorenzo C, 2019). Surgiendo como herramientas a explorar en el campo de la infertilidad equina, atribuida a endometriosis.

Antecedentes del uso de nanogeles en equinos

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en esta temática, hemos sintetizado y caracterizado nanogeles termosensibles de PNIPAM, comprobamos la capacidad de transporte y liberación de un API por los mismos, y finalmente se demostró su ausencia de citotoxicidad al ser expuestos a glóbulos rojos equinos y una línea celular dérmica equina (EDerm), a diferentes concentraciones y tiempos de exposición.

Estos ensayos formaron parte de los requerimientos solicitados, por los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) previo a su aplicación *in vivo*.

La ausencia de trabajos de investigación, que hagan foco en la utilización de nanogeles aplicados en reproducción equina, se presenta como un área auspiciosa a explorar, y es el motivo por el cual en el presente artículo se hace referencia al uso potencial de los mismos en el ámbito reproductivo de la yegua, presentando un posible campo de acción, hasta el momento especulativo, y es lo que motiva a nuestro grupo de trabajo a publicar y trabajar en la temática.

Conclusiones

La posibilidad de proteger los API mediante encapsulación, en medios hostiles inflamatorios, sumado al potencial de lograr mayor tiempo de permanencia mucosa y mejores niveles de distribución, alcanzando la profundidad de los pliegues o glándulas endometriales, podría traer un beneficio sustancial al momento de abordar la compleja situación terapéutica de la endometritis persistente y recurrente pos servicio en la yegua, producto de la utilización de nanogeles mucoadhesivos y/o mucopenetrantes.

En correlación al posible beneficioso desempeño de estas nanoestructuras a nivel intrauterino, se le añade la capacidad de los mismos de actuar contra bacterias productoras de biofilms y transportar principios activos como antibióticos, péptidos antimicrobianos, inmunomoduladores, liberándolos bajo mecanismos de liberación controlada en el sitio requerido.

El uso de nanogeles en terapias regenerativas endometriales es un campo auspicioso a explorar en situaciones de infertilidad producidas por fibrosis uterina.

De acuerdo con lo mencionado, planteamos la utilización de la yegua en ensayos, terapéuticos en endometritis y regenerativos en los procesos de endometriosis, teniendo en cuenta la evidencia del uso de la nanotecnología en diferentes campos biológicos.

Exhaustivos ensayos de nano-toxicidad deben ser realizados antes de alguna aplicación comercial, como así también potenciales herramientas para su escalado que evidencien la homogeneidad entre lotes producidos.

Conflicto de intereses

Los autores no tienen conflicto de intereses.

Bibliografía

Barenholz Y. (2012). The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Control. Release.* doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.

Caissie M. et al (2020). The effects of treatment with N-acetyl cysteine on clinical signs in Persistent Breeding-Induced Endometritis susceptible mares. *J. Equine Vet. Sci.* doi:10.1016/j.jevs.2020.103142.

Canisso I, Segabinazzi L, Fedorka C. (2020). Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - A Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *J. Mol. Sci.* doi:10.3390/ijms21041432.

NOTA TÉCNICA

- Funes *et al.* Nanogeles, uso potencial [...]
Causey R. (2007). Mucus and the mare: How little we know. *J. Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.04.011.
- Cuggino J. et al (2019). Crossing biological barriers with nanogels to improve drug delivery performance. *J. Control Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2019.06.005.
- Chávez de Paz L. et al (2011). Antimicrobial Effect of Chitosan Nanoparticles on *Streptococcus mutans* Biofilms. *J. Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.02941-10.
- Ensign L, Cone R, Hanes J. (2012). Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: the gastrointestinal mucus barriers. *J. Adv Drug Deliv Rev.* doi:10.1016/j.addr.2011.12.009.
- Fedorka C. et al (2018). The anti-inflammatory effect of exogenous lactoferrin on breeding-induced endometritis in susceptible mares when administered post-breeding in susceptible mares. *J. Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2018.03.017.
- Ferris R. et al (2017). Model of Chronic Equine Endometritis Involving a *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *J. Infect Immun.* doi:10.1128/IAI.00332-17.
- Ferris R. (2017). Current understanding of bacterial biofilms and latent infections: A clinical perspective. *Rev Bras Reprod Anim.* Recuperado de www.cbra.org.br.
- Frable S. et al (2018). Gene Characterization of Biofilm-forming *Escherichia coli* Equine Reproductive Tract Isolates. *J. Equine Vet Sci.* doi:10.1016/j.jevs.2018.05.161.
- Giulbudagian M. et al (2016). Correlation between the chemical composition of thermoresponsive nanogels and their interaction with the skin barrier. *J. Control Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2016.10.022
- Grimaudo M, Concheiro A, Alvarez-Lorenzo C. (2019). Nanogels for regenerative medicine. *J. Control Release*. doi:10.1016/j.jconrel.2019.09.015.
- Heil B. et al (2018). Metagenetic Characterization of the Resident Equine Uterine Microbiome Using Multiple Techniques. *J. Equine Vet Sci.* doi:10.1016/j.jevs.2018.05.156.
- Katila T. (2019). Update on endometritis therapy. *J. Pferdeheilkunde*. doi:10.21836/PEM20160107.
- Miyazaki K, Maruyama T. (2014). Biomaterials Partial regeneration and reconstruction of the rat uterus through recellularization of a decellularized uterine matrix. *J. Biomaterials*. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.06.052.
- Molina M. et al (2015). Stimuli-responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *J. Chem Soc Rev.* doi: 10.1039/C5CS00199D.
- Nascimento Júnior J. et al (2018). Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry and Biofilm Formation of Bacteria Isolated From Mare Uterus. *J. Equine Vet Sci.* doi:10.1016/j.jevs.2018.05.166.
- Petersen M. et al (2015). Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in mares with subclinical endometritis. *J. Vet. Mic.* doi:10.1016/j.vetmic.2015.06.006.

NOTA TÉCNICA

Funes *et al.*

Nanogeles, uso potencial [...]

Petersen M. et al (2018). High Prevalence of Subclinical Endometritis in Problem Mares—Effect of Activation and Treatment on Fertility. *J. Equine Vet Sci.* doi:10.1016/j.jevs.2018.05.162.

Picone P. et al(2017). Nose-to-brain delivery of insulin enhanced by a nanogel carrier. *J. Control Release.* doi:10.1016/j.jconrel.2017.11.040.

Rink B. et al (2018). The Fate of Autologous Endometrial Mesenchymal Stromal Cells After Application in the Healthy Equine Uterus. *J. Equine Vet Sci.* doi:10.1089/scd.2018.0056.

Tiemann T. et al (2020). Towards uterus tissue engineering : a comparative study of sheep uterus decellularisation. *J. Molecular Human Reproduction.* doi:10.1093/molehr/gaaa009

Troedsson M. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *J. Theriogenology.* doi:10.1016/S0093-691X(99)00143-0.

Yu-Qing X. et al (2019). Redox-responsive interleukin-2 nanogel specifically and safely promotes the proliferation and memory precursor differentiation of tumor-reactive T-cells. *J. Biomater. Sci.* doi:10.1039/C8BM01556B.

Zhou K. et al (2019). Enhanced Treatment Effects of Tilmicosin Against *Staphylococcus aureus* Cow Mastitis by Self-Assembly Sodium Alginate-Chitosan Nanogel. *J. Pharmaceutics.* doi:10.3390/pharmaceutics11100524.