UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

REMODELACIÓN ENDOMETRIAL EN ÉQUIDOS (YEGUA, BURRA Y MULA): CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, MOLECULAR Y DIAGNÓSTICA

Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons: https://creativecommons.org/licenses/?lang=es

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license: https://creativecommons.org/licenses/?lang=en

UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

UAB
SERVEI DE REPRODUCCIÓ EQUINA
Universitat Autónoma de Barcelona

REMODELACIÓN ENDOMETRIAL EN ÉQUIDOS (YEGUA, BURRA Y MULA): CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, MOLECULAR Y DIAGNÓSTICA

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso

Bajo la dirección de:

Dr. Jordi Miró Roig — co-director y tutor

Dr. Jaime Catalán Bahamondes — co-director

Para optar al título de Doctor con Mención Internacional en el programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

Departament de Medicina i Cirurgia Animal
Universitat Autònoma de Barcelona

Bellaterra, 2026

Universitat Autònoma de Barcelona

Jordi Miró Roig, Catedrático del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona, y **Jaime Catalán Bahamondes**, Investigador Posdoctoral del Departamento de Biología de la Universidad de Girona,

CERTIFICAN

Que la Tesis titulada "**REMODELACIÓN ENDOMETRIAL EN ÉQUIDOS (YEGUA, BURRA Y MULA): CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA, MOLECULAR Y DIAGNÓSTICA**
" presentada por **Miguel Gutiérrez Reinoso** para optar al grado de Doctor en Medicina y Sanidad Animales por la Universidad Autónoma de Barcelona se ha realizado bajo su dirección y, considerándola terminada y cumpliendo los requisitos para poder optar a la Mención Internacional, autorizan su presentación para ser juzgada por la Comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), a 10 de junio de 2026.

Dr. Jordi Miró Roig

Dr. Jaime Catalán Bahamondes

Universidad de Concepción
Postgrado Campus Chillán

C E R T I F I C A D O

Chillán, 17 de diciembre del 2025.

Mediante el presente documento, se certifica que el Sr. **Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso** con CI.0502236623, pasaporte A8111602, NIU 1501423, y estudiante del Doctorado en Medicina y Sanidad Animales de la Universidad Autónoma de Barcelona, realizó una estancia en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Ciencias Pecuarias de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Concepción-Chile, entre el 03 de septiembre de 2025 al 17 de diciembre de 2025.

Durante su estancia, el estudiante recibió entrenamiento en el trabajo rutinario del laboratorio, y participó en el montaje de técnicas analíticas avanzadas, relacionadas con su formación y avance de objetivos planteados en su tesis doctoral. En lo específico, participó en el desarrollo de los siguientes trabajos experimentales, ambos vinculados al estudio del endometrio mular histomorfométrico y evaluación molecular de endometrio en mulas:

- Caracterización histomorfométrica del endometrio de la mula.

- Evaluación multimodal del endometrio mular mediante histopatología, inmunohistoquímica, microscopía SHG y expresión génica.

Se extiende el presente certificado a solicitud del interesado, para los fines académicos que estime conveniente.

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN POSTGRADO CAMPUS CHILLÁN

Fidel Ovidio Castro Reboredo, PhD.
Profesor Titular. Director de Postgrado
Departamento de Ciencia Animal
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción
Campus Chillán
Avenida Vicente Méndez 595, Chillán CHILE
+56 (042) 22088
www.udec.cl

Los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral fueron realizados gracias a la financiación proporcionada por la Universidad Autónoma de Barcelona, España; Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador; Universidad de Concepción, Chile.

Dedico este trabajo a mis tres hermosas
acompañantes incondicionales:
Mikela, Avelina, y Mayte.
A mi madre María, Padre Miguel †
A mis hermanos Vladimir y Andrea

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores Dr. Jordi Miró Roig y Dr. Jaime Catalán Bahamondes por haberme acogido en su grupo de investigación; por toda su guía y apoyo recibido durante todo el proceso de formación doctoral.

A mi familia entera, por creer en mí siempre, por estar en el momento indicado, por apoyarme.

A mis amigos, profesores, compañeros con quienes compartí momentos inolvidables.

A amigos especiales: Manuel García, Pedro Aponte, Fernando Saravia, Yat Wong, Daniela Rojas.

A la Universidad Autónoma de Barcelona, al Departamento de Medicina y Cirugía de Animales y al programa de doctorado en Medicina i Sanitat Animals por la extraordinaria acogida y guía.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador.

A la Universidad de Concepción, Chile.

Al Dr. Fidel O. Castro, por su predisposición de ayuda constante.

INDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS **XI**

ABREVIATURAS Y/O ACRÓNIMOS **XVI**

RESUMEN **1**

RESUM **4**

ABSTRACT **6**

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN **10**

LA YEGUA, LA BURRA Y LA MULA **11**

1. MARCO TAXONÓMICO, EVOLUTIVO Y REPRODUCTIVO DE LA YEGUA, LA BURRA Y LA MULA **11**

Marco taxonómico y evolutivo de la yegua, la burra y la mula **11**

Domesticación y diferenciación histórica de la yegua y la burra **11**

Relevancia zoológica, sanitaria y reproductiva de la yegua, la burra y la mula **12**

Consideraciones reproductivas comparativas y la singularidad biológica de la mula. **13**

Relevancia de este marco para el estudio del endometrio en yeguas, burras y mulas. **13**

2. **LA INTEGRIDAD ENDOMETRIAL COMO DETERMINANTE CENTRAL DEL ÉXITO REPRODUCTIVO EN ÉQUIDOS** **14**

3. **EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL ENDOMETRIO EQUINO Y LAS BASES DE LA REMODELACIÓN FIBRÓTICA** **18**

El paradigma clásico de la yegua: inflamación, fibrosis y valor pronóstico de la biopsia endometrial 18

4. INFLAMACIÓN, COMPOSICIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y VÍAS ESPECÍFICAS DE CADA ESPECIE EN LA FIBROSIS ENDOMETRIAL **22**

5. EL ENDOMETRIO DE LA BURRA COMO MODELO COMPARATIVO PARA COMPRENDER LA BIOLOGÍA UTERINA HÍBRIDA **25**

6. LA MULA COMO MODELO REPRODUCTIVO BIOLÓGICAMENTE SINGULAR Y CLÍNICAMENTE RELEVANTE **26**

7. HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS COMPLEMENTARIAS Y LA NECESIDAD DE UNA INTERPRETACIÓN MULTIMODAL DE LAS BIOPSIAS ENDOMETRIALES **28**

8. LAGUNAS DE CONOCIMIENTO **30**

9. JUSTIFICACIÓN **30**

CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **33**

Hipótesis **35**

Objetivos **35**

CAPÍTULO III: COMPENDIO DE ARTÍCULOS **38**

Collagen and Eosinophils in Jenny"s Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification? ***41***

Histomorphometric characterization of the endometrium in mules (Equus mulus): An approach to endometritis/endometrosis **53**

Histopathological, Immunohistochemical, and Molecular Characterization of Endometrial Remodeling in Mules (Equus mulus) Compared with Mares (Equus caballus) **67**

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN **114**

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES **135**

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFÍA **139**

ABREVIATURAS Y/O ACRÓNIMOS

KD	Kenney–Doig
I	Categoría I
IIA	Categoría IIA
IIB	Categoría IIB
III	Categoría III
H-E	Hematoxilina-eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
IF	Inmunofluorescencia
SHG	Second harmonic generation
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
MEC	Matriz extracelular
COL I	Colágeno tipo I
COL III	Colágeno tipo III
IL-33	Interleucina 33
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
TNF-α	Tumor necrosis factor alpha
TGF-β	Transforming growth factor beta
TGF-β1	Transforming growth factor beta 1
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
ESR1	Estrogen receptor 1
ESR2	Estrogen receptor 2
PGR	Progesterone receptor
PR	Progesterone receptor
CK	Cytokeratin
VIM	Vimentin
α-SMA	Alpha-smooth muscle actin
MMP	Matrix metalloproteinase
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
NETs	Neutrophil extracellular traps
PGE2	Prostaglandin E2

RESUMEN

RESUM

ABSTRACT

RESUMEN

Estudios previos en yeguas han demostrado que la integridad endometrial es uno de los principales determinantes del éxito reproductivo en équidos, ya que los cambios inflamatorios, degenerativos y fibróticos pueden comprometer la competencia uterina y reducir la fertilidad. Por lo tanto, la evaluación histopatológica, en particular mediante el sistema de clasificación de Kenney-Doig, se ha convertido en una herramienta diagnóstica fundamental en la patología reproductiva equina. Sin embargo, la mayoría de los criterios diagnósticos se han desarrollado en yeguas, mientras que el endometrio de los asnos y, especialmente, de las mulas, sigue estando poco caracterizado. Esta limitación es particularmente relevante porque la mula, como híbrido interespecífico derivado de *Equus caballus* y *Equus asinus*, no puede reproducir ni el modelo clásico de la yegua ni el patrón de remodelación endometrial de los asnos. Aunque tradicionalmente se considera que las mulas son reproductivamente estériles debido a una gametogénesis deficiente, su útero puede mantener la gestación tras la transferencia embrionaria en condiciones endocrinas y de manejo adecuadas. En consecuencia, la mula representa un modelo biológicamente singular para comprender cómo la hibridación puede influir en la arquitectura uterina, la regulación inflamatoria, la remodelación de la matriz extracelular y la interpretación diagnóstica.

En este contexto, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue caracterizar la remodelación endometrial en équidos, empezando por la burra para luego poner especial énfasis en la mula, mediante un enfoque histológico, histomorfométrico, inmunohistoquímico, molecular y diagnóstico integrado, así como determinar si el endometrio de la mula debía interpretarse como una simple variación del modelo de la yegua, una condición intermedia entre la yegua y la burra o un fenotipo híbrido distinto con características estructurales y moleculares propias.

Con este propósito, se diseñaron tres estudios complementarios. En el primer estudio, se evaluó el endometrio de burras para determinar si la infiltración eosinofílica, la expresión de *IL33* y la distribución de los colágenos tipo I y III diferían según la clasificación endometrial. Este estudio proporcionó una referencia esencial en équidos para interpretar los patrones inmunitarios y fibróticos específicos de la especie. En el segundo estudio, se caracterizó cuantitativamente el

endometrio de las mulas mediante análisis histomorfométrico, con énfasis en la arquitectura endometrial, la organización glandular0, las características del estroma y el perfil transcripcional de mediadores inflamatorios y fibróticos seleccionados. Este estudio buscó definir el fenotipo uterino de la mula y evaluar la aplicabilidad de los criterios diagnósticos clásicos desarrollados originalmente para las yeguas. En el tercer estudio, se examinó la remodelación endometrial en mulas mediante un enfoque diagnóstico multimodal que combinó histopatología convencional, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de expresión génica y microscopía de generación de segundo armónico, con el fin de comparar el perfil estructural y molecular del endometrio de la mula con el descrito en yeguas y burras.

Los resultados presentados en esta Tesis Doctoral indican que el endometrio de la burra presenta características histopatológicas e inmunobiológicas específicas de la especie, incluyendo una relación característica entre la infiltración eosinofílica, la expresión de *IL33* y la distribución del colágeno. La persistencia de colágeno tipo III en el estrato compacto y el patrón diferencial de eosinofilia sugieren una trayectoria de remodelación distinta de la descrita en la yegua y proporcionan una referencia biológica esencial para interpretar el endometrio híbrido. Estos hallazgos evidencian que la remodelación endometrial difiere entre especies de équidos y establecen el contexto comparativo necesario para interpretar el fenotipo uterino de la mula. En las mulas, el endometrio conservó la organización general del útero equino, pero mostró un fenotipo híbrido distintivo. Este fenotipo se caracterizó por una arquitectura con rasgos relacionados con la mula, ausencia de eosinofilia basal prominente, activación estromal y fibroblástica moderada, preservación relativa de marcadores epiteliales y hormonales, reducción de la activación proinflamatoria y profibrótica, y remodelación heterogénea del colágeno detectada mediante microscopía de generación de segundo armónico. Estos hallazgos sugieren que la remodelación endometrial en la mula no reproduce completamente el modelo clásico de endometrosis progresiva descrito en las yeguas, ni simplemente refleja el patrón de la mula.

En conclusión, esta tesis doctoral demuestra que el endometrio representa una condición biológica distintiva dentro de los équidos (yegua, burra o mula). Su perfil histológico, inmunológico y molecular no debe interpretarse como una variación menor del modelo de yegua, sino como la expresión de un fenotipo tisular específico. La integración de la histopatología convencional con

herramientas moleculares y de imagen de colágeno complementarias permite una interpretación más precisa de la integridad endometrial. Por lo tanto, los hallazgos de esta tesis respaldan la necesidad de marcos diagnósticos multimodales y adaptados a cada especie para evaluar la remodelación endometrial en équidos y proporcionan una base comparativa para futuros estudios sobre la resiliencia uterina, la regulación de la fibrosis y el manejo reproductivo.

RESUM

Estudis previs a eugues han demostrat que la integritat endometrial és un dels principals determinants de l'èxit reproductiu en èquids, ja que els canvis inflamatoris, degeneratius i fibròtics poden comprometre la competència uterina i reduir la fertilitat. Per tant, l'avaluació histopatològica, en particular mitjançant el sistema de classificació de Kenney-Doig, ha esdevingut una eina diagnòstica fonamental en la patologia reproductiva equina. Tot i això, la majoria dels criteris diagnòstics s'han desenvolupat en eugues, mentre que l'endometri dels ases i, especialment, de les mules, continua estant poc caracteritzat. Aquesta limitació és particularment rellevant perquè la mula, com a híbrid interespecífic derivat d'Equus caballus i Equus asinus, no pot reproduir ni el model clàssic de l'euga ni el patró de remodelació endometrial dels ases. Encara que tradicionalment es considera que les mules són reproductivament estèrils degut a una gametogènesi deficient, el seu úter pot mantenir la gestació després de la transferència embrionària en condicions endocrines i de maneig adequades. Per tant, la mula representa un model biològicament singular per comprendre com la hibridació pot influir en l'arquitectura uterina, la regulació inflamatòria, la remodelació de la matriu extracel·lular i la interpretació diagnòstica.

En aquest context, l'objectiu d'aquesta Tesi Doctoral va ser caracteritzar la remodelació endometrial en èquids, començant per la burra per després posar especial èmfasi a la mula, mitjançant un enfocament histològic, histomorfomètric, immunohistoquímic, molecular i diagnòstic integrat, així com determinar si l'endometri de la modela de la mula condició intermèdia entre l'euga i la burra o un fenotip híbrid diferent amb característiques estructurals i moleculars pròpies.

Amb aquest propòsit, es van dissenyar tres estudis complementaris. Al primer estudi, es va avaluar l'endometri de burres per determinar si la infiltración eosinofílica, l'expressió d' *IL33* i la distribució dels col·làgens tipus I i III diferien segons la classificació endometrial. Aquest estudi va proporcionar una referència essencial a èquids per interpretar els patrons immunitaris i fibròtics específics de l'espècie. Al segon estudi, es va caracteritzar quantitativament l'endometri de les mules mitjançant anàlisi histomorfomètric, amb èmfasi en l'arquitectura endometrial, l'organització glandular0, les característiques de l'estroma i el perfil transcripcional de mediadors inflamatoris i fibròtics seleccionats. Aquest estudi va buscar definir el fenotip uterí de la mula i avaluar l'aplicabilitat dels criteris diagnòstics clàssics desenvolupats originalment per a les eugues. En el tercer estudi, es va

examinar la remodelació endometrial en mules mitjançant un enfocament diagnòstic multimodal que va combinar histopatologia convencional, immunohistoquímica, immunofluorescència, anàlisi d'expressió gènica i microscòpia de generació de segon harmònic, per tal de comparar el perfil estructural i molecular de l'endometri de la endometria de l'endometri de la endometria de la endometria.

Els resultats presentats en aquesta Tesi Doctoral indiquen que l'endometri de la burra presenta característiques histopatològiques i immunobiològiques específiques de l'espècie, incloent una relació característica entre la infiltració eosinofílica, l'expressió d'I *L33* i la distribució del collagen trajectòria de remodelació diferent de la descrita a l'euga i proporcionen una referència biològica essencial per interpretar l'endometri híbrid. Aquestes troballes evidencien que la remodelació endometrial difereix entre espècies d'èquids i estableixen el context comparatiu necessari per interpretar el fenotip uterí de la mula. A les mules, l'endometri va conservar l'organització general de l'úter equí, però va mostrar un fenotip híbrid distintiu. Aquest fenotip es va caracteritzar per una arquitectura amb trets relacionats amb la mula, absència d'eosinofília basal prominent, activació estromal i fibroblàstica moderada, preservació relativa de marcadors epitelials i hormonals, reducció de l'activació proinflamatòria i profibròtica, i remodelació heterogènia del col·lagenar detectada. Aquestes troballes suggereixen que la remodelació endometrial a la mula no reprodueix completament el model clàssic d'endometrosi progressiva descrit a les eugues, ni simplement reflecteix el patró de la mula.

En conclusió, aquesta tesi doctoral demostra que l'endometri representa una condició biològica distintiva dins dels èquids (egua, burra o mula). El seu perfil histològic, immunològic i molecular no s'ha d'interpretar com una menor variació del model d'euga, sinó com l'expressió d'un fenotip tissular específic. La integració de la histopatologia convencional amb eines moleculars i d'imatge de col·lagen complementàries permet una interpretació més precisa de la integritat endometrial. Per tant, les troballes d'aquesta tesi donen suport a la necessitat de marcs diagnòstics multimodals i adaptats a cada espècie per avaluar la remodelació endometrial en èquids i proporcionen una base comparativa per a futurs estudis sobre la resiliència uterina, la regulació de la fibrosi i el maneig reproductiu.

ABSTRACT

Previous studies in mares have demonstrated that endometrial integrity is a major determinant of reproductive success in equids, as inflammatory, degenerative, and fibrotic changes can compromise uterine competence and reduce fertility. Therefore, histopathological evaluation, particularly using the Kenney-Doig classification system, has become a fundamental diagnostic tool in equine reproductive pathology. However, most diagnostic criteria have been developed in mares, while the endometrium of donkeys and, especially, mules remains poorly characterized. This limitation is particularly relevant because the mule, as an interspecific hybrid derived from Equus caballus and Equus asinus, cannot replicate either the classic mare model or the donkey endometrial remodeling pattern. Although mules are traditionally considered reproductively sterile due to impaired gametogenesis, their uterus can maintain pregnancy after embryo transfer under appropriate endocrine and management conditions. Consequently, the mule represents a biologically unique model for understanding how hybridization can influence uterine architecture, inflammatory regulation, extracellular matrix remodeling, and diagnostic interpretation.

In this context, the objective of this doctoral thesis was to characterize endometrial remodeling in equids, starting with the donkey and then focusing on the mule, using an integrated histological, histomorphometric, immunohistochemical, molecular, and diagnostic approach. The aim was also to determine whether the mule endometrium should be interpreted as a simple variation of the mare model, an intermediate condition between the mare and the donkey, or a distinct hybrid phenotype with its own structural and molecular characteristics.

To this end, three complementary studies were designed. In the first study, the endometrium of donkeys was evaluated to determine whether eosinophilic infiltration, *IL33* expression, and the distribution of type I and III collagens differed according to endometrial classification. This study provided an essential equid reference for interpreting species-specific immune and fibrotic patterns.

In the second study, the endometrium of mules was quantitatively characterized using histomorphometric analysis, with emphasis on endometrial architecture, glandular organization, stromal characteristics, and the transcriptional profile of selected inflammatory and fibrotic mediators. This study aimed to define the uterine phenotype of the mule and evaluate the applicability of classic diagnostic criteria originally developed for mares. In the third study, endometrial remodeling in mules was examined using a multimodal diagnostic approach that combined conventional histopathology, immunohistochemistry, immunofluorescence, gene expression analysis, and second-harmonic generation microscopy to compare the structural and molecular profile of the mule endometrium with that described in mares and donkeys.

The results presented in this doctoral thesis indicate that the donkey endometrium exhibits species-specific histopathological and immunobiological characteristics, including a characteristic relationship between eosinophilic infiltration, *IL33* expression, and collagen distribution. The persistence of type III collagen in the compact layer and the differential pattern of eosinophilia suggest a remodeling pathway distinct from that described in mares and provide an essential biological reference for interpreting the hybrid endometrium. These findings demonstrate that endometrial remodeling differs among equid species and establish the comparative context necessary for interpreting the uterine phenotype of the mule. In mules, the endometrium retained the general organization of the equine uterus but exhibited a distinctive hybrid phenotype. This phenotype was characterized by an architecture with mule-related features, absence of prominent basal eosinophilia, moderate stromal and fibroblastic activation, relative preservation of epithelial and hormonal markers, reduced pro-inflammatory and pro-fibrotic activation, and heterogeneous collagen remodeling detected by second-harmonic generation microscopy. These findings suggest that endometrial remodeling in the mule does not fully reproduce the classic model of progressive endometriosis described in mares, nor does it simply reflect the mule pattern.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1. MARCO TAXONÓMICO, EVOLUTIVO Y REPRODUCTIVO DE LA YEGUA, LA BURRA Y LA MULA

Marco taxonómico y evolutivo de la yegua, la burra y la mula

La yegua doméstica pertenece a la familia *Equidae* y al género *Equus*, y en la literatura veterinaria y reproductiva se la conoce convencionalmente como *Equus caballus*, es decir, la hembra doméstica representante del linaje del caballo moderno (Orlando, 2015; Librado et al., 2016). La burra doméstica también pertenece a *Equidae* y *Equus*, y se la denomina convencionalmente *Equus asinus* dentro del linaje asino moderno (Orlando, 2015; Todd et al., 2022). Dentro de este mismo marco sistemático, la mula se conoce comúnmente en la literatura veterinaria como *Equus mulus*, término utilizado para el híbrido interespecífico derivado de *Equus caballus* y *Equus asinus*; sin embargo, no se trata de una especie biológica en sentido estricto, sino más bien de un híbrido con identidad funcional y morfológica propia (Canisso et al., 2019; Adavoudi & Pilot, 2022). El hecho de que la yegua y la burra pertenezcan al mismo género explica la posibilidad de hibridación, pero no elimina las diferencias genómicas, cromosómicas, fisiológicas y reproductivas que separan ambos linajes y dan forma a la biología particular de la mula (Orlando et al., 2013; Orlando, 2015; Runemark et al., 2025). Desde una perspectiva evolutiva, los équidos comparten una historia ancestral común dentro de un único género existente, *Equus*, pero los linajes del caballo y los asinos siguieron trayectorias evolutivas distintas, un contexto que ayuda a explicar por qué la hibridación puede generar fenotipos no aditivos en lugar de un simple punto medio anatómico o funcional entre las hembras parentales (Orlando et al., 2013; Orlando, 2015; Adavoudi & Pilot, 2022).

Domesticación y diferenciación histórica de la yegua y la burra

La domesticación de la yegua y la burra siguió trayectorias temporales y geográficas diferentes, aunque ambas se asociaron profundamente con el desarrollo de las sociedades humanas (Librado et

al., 2021; Todd et al., 2022). La evidencia genómica indica que la ascendencia de los caballos domésticos modernos se consolidó en las estepas euroasiáticas occidentales, particularmente en la región baja del Volga-Don, desde donde los linajes equinos se expandieron rápidamente por Eurasia mediante una intensa dispersión mediada por el ser humano humanas (Librado et al., 2021; Librado et al., 2024). Por el contrario, la burra doméstica tiene un origen predominantemente africano, y los estudios genómicos respaldan su domesticación en África, seguida de una posterior dispersión por África y Eurasia, asociada a su función como animal de transporte y carga en entornos áridos y semiáridos (Todd et al., 2022). Estas distintas vías de domesticación no solo moldearon la variación fenotípica externa, sino que también contribuyeron a la divergencia de perfiles adaptativos, conductuales y reproductivos entre la yegua y la burra (Canisso et al., 2019; Todd et al., 2022). Dentro de este contexto histórico y biológico, la mula surgió como un híbrido producido deliberadamente, valorado por la combinación de resistencia, robustez, longevidad y capacidad de trabajo asociadas a sus linajes parentales (Canisso et al., 2019; Adavoudi & Pilot, 2022).

Relevancia zoológica, sanitaria y reproductiva de la yegua, la burra y la mula

La yegua sigue teniendo una gran importancia económica y biomédica debido a su papel en los sistemas de producción equina, la reproducción asistida y la generación de conocimiento sobre la fisiología uterina, el reconocimiento materno de la gestación y la patología endometrial (Allen, 2005; Klein, 2016; Schöniger & Schoon, 2020). La burra, a su vez, ha adquirido una renovada relevancia científica y productiva en las últimas décadas debido a su importancia en los programas de conservación, la producción de leche, los sistemas extensivos, las economías rurales y las biotecnologías reproductivas, lo que ha estimulado una reevaluación de la fisiología reproductiva de los asnos como una entidad biológica en sí misma, en lugar de como una extensión simplificada del modelo de la yegua (Canisso et al., 2019). La mula ya no se considera únicamente un animal de trabajo o de transporte; se reconoce cada vez más su potencial uso en programas de reproducción, particularmente como receptora de embriones, y su valor como modelo biológico para investigar cómo la hibridación afecta órganos y funciones específicas (Camillo et al., 2003; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). De hecho, estudios han demostrado que las mulas pueden mantener gestaciones después de la transferencia de embriones y que el útero de la mula puede sustentar el desarrollo temprano del conceptus bajo condiciones fisiológicas y de manejo adecuadas, lo que refuerza su

relevancia clínica dentro de la reproducción equina comparada (Camillo et al., 2003; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). Por lo tanto, la importancia actual de la yegua, la burra y la mula radica no solo en sus diferentes usos productivos, sino también en el valor comparativo que ofrecen para comprender cómo la historia evolutiva, la domesticación y la hibridación modulan la función reproductiva femenina dentro del género *Equus* (Canisso et al., 2019; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

Consideraciones reproductivas comparativas y la singularidad biológica de la mula.

Desde el punto de vista reproductivo, la yegua es el modelo mejor caracterizado entre los équidos domésticos, debido a la definición clásica de su ciclo, la fisiología uterina, el reconocimiento materno de la gestación y el desarrollo histórico de las técnicas de transferencia embrionaria y evaluación endometrial (Allen, 2005; Klein, 2016; Morris et al., 2020). La burra comparte características ováricas y uterinas generales con la yegua, pero presenta diferencias anatómicas, endocrinas y de manejo suficientemente consistentes como para desaconsejar la extrapolación directa entre ambas hembras (Canisso et al., 2019; Gambini et al., 2025). La mula ocupa una posición biológica singular dentro de este continuo comparativo porque, si bien la mayoría de las hembras son infértiles debido a alteraciones meióticas asociadas con la hibridación, muchas aún muestran actividad cíclica, ovulación y un entorno uterino capaz de sustentar la gestación cuando se utilizan transferencia de embriones o protocolos hormonales apropiados (Canisso et al., 2019; Camargo et al., 2020; Gambini et al., 2025). Los informes de fertilidad natural en mulas son excepcionalmente raros y deben considerarse extraordinarios en lugar de representativos de la fertilidad híbrida normal; sin embargo, su existencia confirma que la biología de la mula no puede reducirse a la noción de esterilidad reproductiva absoluta (Ryder et al., 1985; Rong et al., 1988; Canisso et al., 2019). Este escenario obliga a interpretar a la mula como un híbrido reproductivamente atípico cuyo valor científico reside precisamente en revelar cómo la combinación de dos linajes parentales divergentes puede reconfigurar la organización y la función de los tejidos reproductivos femeninos (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

Relevancia de este marco para el estudio del endometrio en yeguas, burras y mulas.

La relevancia de este marco taxonómico, evolutivo y reproductivo para esta tesis doctoral centrada en el endometrio radica en que la mayoría de los criterios diagnósticos e interpretativos histopatológicos

se han desarrollado históricamente en la yegua, mientras que la evidencia específica para la burra y, especialmente, para la mula, sigue siendo mucho más limitada (Kenney, 1978; Snider et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). En la yegua, el endometrio se ha estudiado ampliamente como determinante de la fertilidad, la inflamación uterina y la fibrosis, y su evaluación histológica ha respaldado el pronóstico reproductivo durante décadas (Kenney, 1978; Snider et al., 2011). Sin embargo, la evidencia creciente indica que la burra no reproduce con exactitud la biología endometrial de la yegua (Radar-Chafirovitch et al., 2025), y que la mula, como híbrido, posee una morfología uterina y una fisiología tisular que aún no se han caracterizado completamente. Por lo tanto, un enfoque comparativo que incluya simultáneamente a la yegua, la burra y la mula no solo es relevante, sino necesario, para evitar interpretaciones reduccionistas y construir un marco biológico más preciso para la inflamación, la organización tisular y la remodelación endometrial en équidos hembra del género *Equus* (Runemark et al., 2025).

2. LA INTEGRIDAD ENDOMETRIAL COMO DETERMINANTE CENTRAL DEL ÉXITO REPRODUCTIVO EN ÉQUIDOS

El endometrio es un tejido altamente dinámico que regula la receptividad uterina, la comunicación entre el embrión y la madre, los eventos relacionados con la implantación y el mantenimiento de la gestación temprana en équidos (Klein, 2016). En la yegua, este tejido ha sido objeto de numerosos estudios, ya que alteraciones sutiles en la continuidad epitelial, la secreción glandular, la organización del estroma, el soporte vascular y el equilibrio inmunitario pueden comprometer la fertilidad mucho antes de que una enfermedad uterina grave se manifieste clínicamente (Kenney & Doig, 1986; Kenney, 1978; Schöniger & Schoon, 2020). En este sentido, la competencia endometrial no debe reducirse a la simple ausencia de inflamación o fibrosis, sino que debe entenderse como la preservación de un entorno tisular capaz de albergar un conceptus semialogénico, manteniendo la respuesta endocrina, la plasticidad estructural y la funcionalidad secretora a lo largo del ciclo estral y el inicio de la gestación (Klein, 2016; Schöniger & Schoon, 2020). Por esta razón, el endometrio se ha considerado durante mucho tiempo uno de los tejidos reproductivos más informativos para evaluar la salud uterina y predecir la fertilidad en équidos (Kenney & Doig, 1986; Kenney, 1978; Snider et al., 2011).

Esta comprensión integral de la competencia endometrial ha cobrado aún mayor relevancia a medida que la biología reproductiva equina ha evolucionado desde la morfología descriptiva hacia la función tisular integrada (Ferreira-Dias et al., 2024). Los conceptos actuales sobre la aptitud uterina en la yegua, burra o mula enfatizan las interacciones coordinadas entre el epitelio luminal, el epitelio glandular, el compartimento estromal, la matriz extracelular, el soporte vascular-linfático y las poblaciones de células inmunitarias uterinas (de Castro et al., 2024; Ulaangerel et al., 2025). Estas interacciones son esenciales para la movilidad del conceptus, la fijación del embrión y el proceso, aún poco comprendido, pero biológicamente crucial, del reconocimiento materno de la gestación en equidos (Klein, 2016; Swegen, 2021; de Castro et al., 2024). En consecuencia, estudios transcriptómicos e integradores recientes han reforzado la idea de que el endometrio equino debe interpretarse como una interfaz biológica reactiva en lugar de un andamiaje pasivo para la gestación (de Castro et al., 2024; Ulaangerel et al., 2025). Desde esta perspectiva, un útero morfológicamente aceptable aún puede estar funcionalmente comprometido si se altera la señalización inflamatoria, endocrina o de la matriz extracelular, mientras que los tejidos que muestran solo lesiones estructurales leves pueden conservar componentes importantes de la competencia reproductiva (Schöniger & Schoon, 2020; Ferreira-Dias et al., 2024).

Entre los trastornos uterinos que afectan la fertilidad en équidos, la endometritis y la endometrosis siguen siendo los más relevantes desde el punto de vista clínico (Morris et al., 2020; Ferreira-Dias et al., 2024). La endometritis se ha definido tradicionalmente como un trastorno inflamatorio de la mucosa uterina, mientras que la endometrosis se ha considerado una afección degenerativa crónica caracterizada por fibrosis periglandular y estromal, distorsión arquitectónica y deterioro funcional progresivo (Hoffmann et al., 2009a; Katila & Ferreira-Dias, 2022). En las yeguas, ambos trastornos están estrechamente relacionados con la subfertilidad, la infertilidad y pérdidas económicas sustanciales en los sistemas de cría (Morris et al., 2020; Woodward & Troedsson, 2013). Sin embargo, la clara distinción conceptual que se estableció entre estas entidades se ha vuelto cada vez más difícil de sostener, ya que la evidencia contemporánea indica que la lesión inflamatoria persistente, la depuración uterina defectuosa, la reparación desregulada y la remodelación de la matriz extracelular pueden contribuir a la evolución de las lesiones fibróticas crónicas (Aresu et al., 2012; Rebordão et al., 2014; Canisso et al., 2019; Katila & Ferreira-Dias, 2022; Ferreira-Dias et al., 2024). Por lo tanto,

el endometrio debe interpretarse no solo a través de categorías diagnósticas estáticas, sino también a través de los procesos biológicos que conectan la inflamación, la reparación, la desregulación endocrina y la remodelación tisular a largo plazo (Morris et al., 2020; Ferreira-Dias et al., 2024).

Desde una perspectiva clínica, esto explica por qué la biopsia endometrial ha sido durante décadas la piedra angular de la evaluación reproductiva en yeguas (Kenney & Doig, 1986; Van Camp, 1988; Snider et al., 2011). El valor perdurable del sistema Kenney-Doig radica en su capacidad para relacionar las lesiones histológicas con el pronóstico reproductivo, en particular la probabilidad de llevar un potro a término (Kenney & Doig, 1986). En su formulación original y uso posterior, los endometrios de categoría I se asocian con la mayor expectativa reproductiva, mientras que las categorías IIB y III indican probabilidades progresivamente menores de mantenimiento de la gestación y parto, ya que reflejan el daño acumulativo a los compartimentos epitelial, glandular y estromal (Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Incluso hoy en día, la biopsia sigue siendo el método basado en un solo tejido más informativo para estimar el estado uterino en équidos cuando se interpreta junto con el historial reproductivo y los hallazgos clínicos (Snider et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Al mismo tiempo, varios estudios han demostrado que la distribución de las lesiones puede ser heterogénea dentro del mismo útero y que tanto la aplicación como la repetibilidad de la escala de Kenney-Doig están sujetas a variabilidad biológica y relacionada con el observador, especialmente en yeguas mayores y en el rango IIB (Waelchli & Winder, 1989; Lehmann et al., 2011; Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024). Estas observaciones justifican la incorporación de marcadores histológicos y moleculares complementarios capaces de distinguir lesiones activas de quiescentes y tejidos estructuralmente estables de transicionales (Martínez-Bartolomé et al., 2024).

Un avance importante en este campo ha sido el reconocimiento de que la fibrosis endometrial no es una cicatriz estática, sino un proceso regulado activamente que involucra la activación del estroma, el recambio de la matriz extracelular, la disfunción endocrina y la señalización mediada por el sistema inmunitario (Walter et al., 2001; Hoffmann et al., 2009b; Rebordão et al., 2014). Los estudios moleculares han demostrado que la transcripción de *ESR1, ESR2 y PGR* disminuye con el aumento de la gravedad de la fibrosis endometrial equina y que esta desregulación está vinculada a las vías asociadas con NF-κB, conectando así la degeneración estructural con la respuesta alterada a los

esteroides y la señalización inflamatoria (Jasiński et al., 2022). Las citocinas proinflamatorias también pueden modular la síntesis de colágeno, las metalopeptidasas de la matriz y la remodelación fibrótica en el endometrio equino (Aresu et al., 2012; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Centeno et al., 2024). Paralelamente, los esteroides ováricos modifican directamente la expresión génica asociada a la matriz extracelular y la deposición de colágeno inducida por TGF-β1 en los fibroblastos endometriales equinos, lo que refuerza la idea de que la progresión fibrótica depende tanto del entorno endocrino como de las señales inflamatorias locales (Amaral et al., 2025). Evidencia adicional sugiere que la endometriosis avanzada puede extenderse más allá del endometrio, afectando la transcripción miometrial y las interacciones de las células inmunitarias a nivel uterino, mientras que los marcadores de colágeno circulantes y tisulares, como el colágeno tipo III, podrían contribuir a la identificación de la actividad fibrótica (Alpoim-Moreira et al., 2022; Drzewiecka et al., 2025; Wójtowicz et al., 2025).

Un segundo avance conceptual importante ha sido el reconocimiento de que el paradigma basado en la yegua no puede extrapolarse automáticamente a todos los équidos (Canisso et al., 2019). El asno ofrece el ejemplo más claro de esta limitación. Estudios comparativos y patológicos indican que las burras difieren de las yeguas en fisiología reproductiva, respuestas inflamatorias uterinas, arquitectura tisular y ritmo de adaptación uterina post reproducción (Canisso et al., 2019; Quartuccio et al., 2020; Wu et al., 2024; Vallejo-Soto et al., 2026). Más recientemente, Radar-Chafirovitch et al. (2025) caracterizaron el panorama de células inmunes residentes del endometrio de burra y confirmaron que las burras poseen un perfil inmunológico uterino que no es simplemente un reflejo del patrón de la yegua . Estos hallazgos son biológicamente relevantes porque los eosinófilos y las vías relacionadas con IL-33 se reconocen cada vez más como mediadores de la inflamación crónica, la remodelación y la fibrosis en varios tejidos, incluidos los entornos mucosos y reproductivos (Rothenberg & Hogan, 2006; Akuthota & Weller, 2012; Liew, 2012; Mchedlidze et al., 2013; Gao et al., 2015; Masterson et al., 2015; Kotsiou et al., 2018; Chan et al., 2019; Kurimoto et al., 2021; Miller et al., 2021; Carmine et al., 2022; Sheng et al., 2025). Por lo tanto, el concepto de “integridad endometrial” debe interpretarse dentro de un contexto específico de la especie: una característica que se consideraría patológica en la yegua puede representar una condición constitutiva, regulada o biológicamente diferente en la burra (Radar-Chafirovitch et al., 2025; Vallejo-Soto et al., 2026).

Esta perspectiva que tiene en cuenta la especie cobra aún más importancia al considerar híbridos de

équidos como la mula. Si bien tradicionalmente se ha considerado que las mulas son estériles, su capacidad documentada para mantener el embarazo después de la transferencia de embriones demuestra que el útero de la mula puede sustentar el desarrollo del conceptus en condiciones endocrinas apropiadas (Davies et al., 1985; Allen & Short, 1997; Fennessy, 1997; Camillo et al., 2003; Bottrel et al., 2017; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). Los escasos informes sobre mulas hembras fértiles y los análisis citogenéticos ilustran aún más que la biología híbrida en los équidos no puede reducirse a un simple callejón sin salida reproductivo, sino que debe interpretarse dentro del marco más amplio de la hibridación interespecífica, la interacción genómica y la expresión fenotípica variable (Benirschke et al., 1962; Rong et al., 1985; Ryder et al., 1985; Rong et al., 1988; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025). Desde una perspectiva comparativa, la mula no es, por lo tanto, una simple curiosidad reproductiva, sino un modelo híbrido biológicamente informativo en el que la arquitectura del tejido materno, la señalización inflamatoria y la dinámica de la matriz extracelular pueden reorganizarse de maneras que difieren de ambas especies parentales (Canisso et al., 2019; Gabryś et al., 2021; Gambini et al., 2025). En consecuencia, la integridad endometrial en los équidos debe abordarse ahora como un concepto comparativo y con conciencia de la especie. En la yegua, sigue siendo el determinante central del pronóstico de fertilidad; en la burra, revela trayectorias inflamatorias y fibróticas alternativas; y en la mula, abre una ventana biológica única para comprender cómo la hibridación puede modular la resiliencia uterina, la remodelación tisular y la competencia reproductiva (Canisso et al., 2019).

3. EVALUACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL ENDOMETRIO EQUINO Y LAS BASES DE LA REMODELACIÓN FIBRÓTICA

El paradigma clásico de la yegua: inflamación, fibrosis y valor pronóstico de la biopsia endometrial

El examen histológico de biopsias endometriales incluidas en parafina sigue siendo el método de referencia para evaluar el estado uterino en équidos (Van Camp, 1988; Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011). En la yegua, la biopsia endometrial se estableció históricamente como una herramienta pronóstica porque integra, en una sola sección histológica, la respuesta inflamatoria, el estado

glandular, el grado de fibrosis y la organización del estroma (Kenney, 1978; Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011). El valor perdurable del sistema de Kenney & Doig radica en su capacidad para correlacionar las lesiones histológicas con el pronóstico reproductivo, en particular la probabilidad de mantener la gestación y llevar un potro a término (Kenney & Doig, 1986). En su formulación original y posterior aplicación, los endometrios de categoría I se asocian con el mayor potencial reproductivo, mientras que las categorías IIB y III reflejan un deterioro progresivo de los compartimentos epitelial, glandular y estromal, acompañado de menores probabilidades de gestación exitosa (Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Incluso hoy en día, la biopsia sigue siendo el método tisular más informativo para estimar el estado uterino cuando se interpreta junto con el historial reproductivo y los hallazgos clínicos (Snider et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020).

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que este sistema no está exento de limitaciones biológicas y de interpretación. La aplicación del sistema Kenney-Doig muestra variabilidad entre observadores y una considerable heterogeneidad morfológica y pronóstica, particularmente dentro de la categoría IIB (Waelchli & Winder, 1989; Lehmann et al., 2011; Westendorf et al., 2022a) (Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024). Además, la distribución de las lesiones puede ser heterogénea dentro del mismo útero, lo que implica que una sola biopsia puede subestimar o sobreestimar el estado general del endometrio (Waelchli & Winder, 1989; Martínez-Bartolomé et al., 2024). Estas observaciones son particularmente relevantes porque, si la heterogeneidad diagnóstica ya existe dentro de la especie para la que se diseñó originalmente el sistema, su extrapolación a híbridos como la mula requiere necesariamente una interpretación crítica y adaptativa (Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024). En consecuencia, las limitaciones inherentes del paradigma clásico justifican la incorporación de marcadores histológicos y moleculares complementarios capaces de distinguir las lesiones activas de las quiescentes y los tejidos estructuralmente estables de aquellos que experimentan una remodelación progresiva (Martínez-Bartolomé et al., 2024).

Desde una perspectiva histopatológica contemporánea, la endometrosis en la yegua ya no se interpreta como una acumulación pasiva de tejido cicatricial, sino como un proceso degenerativo-fibrótico crónico y dinámico que involucra fibroblastos, miofibroblastos, glándulas endometriales, células inmunitarias y componentes de la matriz extracelular (Walter et al., 2001; Hoffmann et al., 2009a;

Schöniger & Schoon, 2020). Estas lesiones representan manifestaciones histológicas de una remodelación tisular activa caracterizada por una alteración progresiva de las interacciones epitelio-estromales, una secreción glandular modificada y una reorganización funcional de la matriz extracelular (Walter et al., 2001; Hoffmann et al., 2009; Lehmann et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). Por lo tanto, la transición de un endometrio estructuralmente funcional a un tejido crónicamente degenerado depende del efecto acumulativo de los mecanismos de reparación que se han desregulado y vueltos inadaptados IIB (Lehmann et al., 2011; Katila & Ferreira-Dias, 2022). Esta reinterpretación conceptual de la endometrosis como remodelación biológicamente activa, en lugar de fibrosis estática terminal, constituye uno de los avances más importantes en la patología reproductiva equina contemporánea (Katila & Ferreira-Dias, 2022).

Esta perspectiva morfofuncional se ha visto reforzada por estudios moleculares que vinculan la fibrosis endometrial con alteraciones en los receptores hormonales, las proteínas secretoras glandulares, las metaloproteinasas y las vías de señalización profibróticas dependientes de TGF-β (Aresu et al., 2012) (Rebordão et al., 2014; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Jasiński et al., 2022; Zhang et al., 2023; Wong et al., 2024; Ferreira-Dias et al., 2024). Además, la expresión reducida de *ESR1*, *ESR2* y *PGR* se ha asociado con un aumento de la fibrosis endometrial y la activación de vías inflamatorias relacionadas con NF-κB, lo que vincula directamente la degeneración estructural con la alteración de la señalización endocrina e inmunitaria (Jasiński et al., 2022). Paralelamente, las citocinas proinflamatorias pueden modular la síntesis de colágeno, la actividad de las metaloproteinasas y el comportamiento de los fibroblastos, lo que ayuda a explicar cómo las agresiones inflamatorias aparentemente leves pueden evolucionar hacia alteraciones estructurales permanentes (Aresu et al., 2012; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Centeno et al., 2024). Esta evidencia confirma que el estroma endometrial no es un receptor pasivo de la lesión tisular, sino un participante activo en la propagación y perpetuación de la remodelación fibrótica (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019).

Otro componente central de este paradigma es la secuencia de remodelación de la matriz extracelular y, en particular, la organización del colágeno fibrilar (Junqueira et al., 1979; Zdrojkowski et al., 2024). En condiciones fisiológicas, el endometrio equino experimenta variaciones estromales y epiteliales cíclicas asociadas con diferencias regionales en el grosor, la densidad glandular y la actividad secretora

(Hanada et al., 2012; Herrera et al., 2018; Silva et al., 2019; Vallejo-Soto et al., 2026). Sin embargo, a medida que la fibrosis progresa, la arquitectura tisular se reorganiza alrededor de glándulas quísticas o anidadas, y se desarrolla un predominio progresivo del colágeno tipo I sobre el colágeno tipo III, particularmente dentro de las regiones periglandulares y subepiteliales (Junqueira et al., 1979; Walter et al., 2001; Rebordão et al., 2014; Centeno et al., 2024; Junqueira et al., 1979; Zdrojkowski et al., 2024). Desde un punto de vista biológico, esta transición refleja el cambio de una matriz extracelular compatible con la reparación temprana hacia una matriz madura y rígida característica de la fibrosis establecida (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Centeno et al., 2024; Junqueira et al., 1979; Zdrojkowski et al., 2024). Estudios recientes también han demostrado que el equilibrio entre la deposición y la degradación del colágeno depende de la regulación de las colagenasas y sus inhibidores, lo que refuerza el concepto de que la remodelación de la matriz extracelular es un proceso dinámico y estrictamente regulado (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Centeno et al., 2024). En consecuencia, la importancia histológica de la fibrosis depende no solo de la cantidad de colágeno presente, sino también de su tipo, topografía y estado de recambio (Zdrojkowski et al., 2024).

Otro avance conceptual importante ha sido el reconocimiento de que la inflamación y la fibrosis no representan procesos independientes dentro del endometrio equino (LeBlanc et al., 1994; Christoffersen et al., 2012; Woodward & Troedsson, 2013; Elshalofy et al., 2022). La susceptibilidad a la endometritis persistente inducida por la reproducción, los mecanismos de eliminación uterina alterados, la acumulación de neutrófilos y la activación sostenida de programas transcriptómicos inflamatorios pueden contribuir al establecimiento progresivo de la endometrosis (Christoffersen et al., 2012; Woodward & Troedsson, 2013; Elshalofy et al., 2022). Mecánicamente, esta transición de inflamación a fibrosis implica interacciones coordinadas entre mediadores solubles, células inmunitarias y vías de remodelación de la matriz extracelular (Katila & Ferreira-Dias, 2022). En particular, las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) han atraído una atención creciente porque, si bien constituyen parte del sistema de defensa antimicrobiana fisiológico, también pueden inducir la deposición de colágeno y promover la fibrogénesis cuando se mantienen persistentemente dentro del tejido uterino (Rebordão et al., 2018; Rebordão et al., 2019). Estudios experimentales han demostrado que los componentes derivados de NET inducen la formación de colágeno en el endometrio equino in vitro y que las alteraciones en las vías antifibróticas dependientes de la prostaglandina E2 pueden potenciar este fenómeno (Rebordão et al., 2018; Rebordão et al., 2019). Por lo tanto, la vía hacia la

infertilidad en la yegua implica una interacción compleja entre la edad, la exposición reproductiva, la inmunidad endometrial, la regulación endocrina y los mecanismos locales de remodelación tisular (Katila & Ferreira-Dias, 2022; Ferreira-Dias et al., 2024).

En conjunto, el paradigma clásico de la yegua constituye el marco interpretativo fundamental para comprender las enfermedades endometriales en équidos. Sin embargo, este modelo no debe extrapolarse automáticamente a otras especies de équidos ni imponerse acríticamente a tejidos híbridos como el endometrio de la mula (Canisso et al., 2019; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025). Por el contrario, la creciente evidencia comparativa indica que las trayectorias inflamatorias, fibróticas y de remodelación tisular pueden diferir sustancialmente entre especies e híbridos, lo que respalda la necesidad de una interpretación histopatológica comparativa, multimodal y que tenga en cuenta las características de cada especie (Ferreira-Dias et al., 2024).

4. INFLAMACIÓN, COMPOSICIÓN DE CÉLULAS INMUNITARIAS Y VÍAS ESPECÍFICAS DE CADA ESPECIE EN LA FIBROSIS ENDOMETRIAL

La fibrosis endometrial no se desarrolla de forma aislada (Woodward & Troedsson, 2013; Morris et al., 2020). En la yegua, surge dentro de un contexto inmunobiológico condicionado por la exposición repetida al semen, microorganismos, lesiones tisulares y señalización de reparación (Woodward & Troedsson, 2013). La respuesta inflamatoria posterior a la monta es fisiológicamente necesaria para seleccionar espermatozoides y eliminar contaminantes y restos celulares del útero, pero debería resolverse rápidamente en animales reproductivamente sanos (LeBlanc et al., 1994). Cuando esta resolución falla o se retrasa, la yegua se vuelve susceptible a la endometritis persistente inducida por la monta, lo que compromete la fertilidad y puede contribuir a la remodelación degenerativa posterior (Christoffersen et al., 2012; Woodward & Troedsson, 2013). Esta secuencia ha sido crucial para replantear la enfermedad endometrial como un continuo de inflamación y reparación desreguladas, en lugar de un conjunto de lesiones inconexas (Morris et al., 2020).

Estudios experimentales y clínicos han reforzado la idea de que la persistencia inflamatoria es un

determinante clave de la progresión patológica (Christoffersen et al., 2012; Elshalofy et al., 2022). En yeguas susceptibles, la liberación de citocinas, el reclutamiento de neutrófilos y la alteración del aclaramiento uterino son más persistentes que en yeguas resistentes (Christoffersen et al., 2012). Este entorno inflamatorio persistente expone las células estromales y las estructuras glandulares a mediadores capaces de alterar el recambio de la matriz extracelular y la función tisular (Elshalofy et al., 2022). La importancia de esta fase inflamatoria queda patente en estudios que demuestran que los perfiles de quimiocinas y citocinas difieren notablemente entre yeguas sanas y yeguas con endometritis aguda o crónica, y que se pueden detectar diferencias transcriptómicas incluso en yeguas subfértiles sin enfermedad clínica manifiesta (Lection et al., 2024; Teixeira-Soares et al., 2025). Por lo tanto, el componente inflamatorio de la enfermedad endometrial no solo es visible histológicamente, sino que también es medible molecularmente y aporta información biológica (Lection et al., 2024; Teixeira-Soares et al., 2025).

A nivel mecanístico, la transición de la inflamación a la fibrosis parece implicar la interacción coordinada tanto de mediadores solubles como de efectores celulares (Katila & Ferreira-Dias, 2022). En la yegua, la inflamación endometrial se caracteriza por la migración hacia la luz uterina de una gran cantidad de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Las trampas extracelulares de neutrófilos (NET) han suscitado especial interés porque, si bien son esenciales para la defensa antimicrobiana, si se mantienen en el tiempo, pueden estimular, paradójicamente, la formación de colágeno y la fibrogénesis cuando fallan los mecanismos de eliminación (Rebordão et al., 2018; Rebordão et al., 2019). Estudios experimentales han demostrado que los componentes de las NET inducen la deposición de colágeno en el endometrio de yegua *in vitro* y que la alteración de la vía antifibrótica de la prostaglandina E2 puede favorecer este efecto (Rebordão et al., 2018; Rebordão et al., 2019). Estos hallazgos son particularmente significativos porque conectan la inmunidad innata con la remodelación del estroma y sugieren que la fibrosis puede surgir no solo de una infección, sino también de una inflamación desregulada en un tejido previamente susceptible (Ferreira-Dias et al., 2024).

Este vínculo inflamatorio-fibrótico también está respaldado por trabajos más amplios sobre citocinas y remodelación de la matriz (Aresu et al., 2012; Nothnick & Alali, 2016; Killisch et al., 2017). Las citocinas proinflamatorias pueden modular la expresión de metaloproteinasas, el recambio de colágeno y el comportamiento de los fibroblastos en el endometrio equino, lo que ayuda a explicar por qué las

agresiones inflamatorias aparentemente leves pueden tener consecuencias estructurales a largo plazo (Aresu et al., 2012; Nothnick & Alali, 2016; Killisch et al., 2017). Por lo tanto, el estroma endometrial no es un receptor pasivo de la lesión, sino un participante activo en la propagación de la misma (Nothnick & Alali, 2016; Killisch et al., 2017). Los estudios *in vitro* sugieren además que las células estromales responden de manera diferente según la fase del ciclo, lo que indica que el entorno ovárico modula el resultado inflamatorio y posiblemente la transición a la fibrosis (Zhang et al., 2023; Wong et al., 2024). Esta observación es especialmente relevante al considerar la comparación entre especies, porque las diferencias en la ciclicidad endocrina y el tono inmunitario pueden alterar sustancialmente las trayectorias de remodelación (Ferreira-Dias et al., 2024).

Sin embargo, la inmunopatología del endometrio no es idéntica en todos los équidos. Uno de los ejemplos más claros de divergencia entre especies proviene del asno, donde la infiltración eosinofílica conspicua del endometrio parece ser un hallazgo común y posiblemente constitutivo (Quartuccio et al., 2020; Radar-Chafirovitch et al., 2025). A diferencia de las yeguas, en las que los eosinófilos son generalmente escasos y a menudo se interpretan dentro de un contexto patológico, las burras frecuentemente muestran endometrios ricos en eosinófilos incluso en ausencia de lesiones graves (González et al., 2015; Grimm et al., 2017; Wu et al., 2024; Vallejo-Soto et al., 2026). Esta notable diferencia indica que la arquitectura inflamatoria del útero asino puede estar organizada según una base inmunológica distinta (Radar-Chafirovitch et al., 2025). Esta base de referencia cuestiona cualquier suposición automática de que los patrones celulares definidos como anormales en la yegua necesariamente tengan el mismo significado en el burra (Quartuccio et al., 2020).

La plausibilidad biológica de que la inflamación rica en eosinófilos contribuya a la regulación fibrótica se ve reforzada por estudios realizados más allá del útero equino. Actualmente, se reconoce a los eosinófilos como células efectoras y reguladoras multifuncionales involucradas en la homeostasis tisular, la inflamación crónica, la remodelación y la fibrosis en múltiples órganos (Rothenberg & Hogan, 2006; Akuthota & Weller, 2012). La IL-33, en particular, ha surgido como una citocina clave que vincula el estrés epitelial o estromal con el reclutamiento de eosinófilos, la activación inmunitaria de tipo 2 y la progresión fibrótica en tejidos como la piel, el hígado, el intestino y las lesiones endometrósicas (Liew, 2012; Masterson et al., 2015; Chan et al., 2019; Kurimoto et al., 2021; Miller et al., 2021; Carmine et al., 2022). Estos hallazgos más amplios son de gran relevancia, ya que

proporcionan un marco mecanicista para interpretar la relación entre la infiltración eosinofílica, la expresión de *IL33* y la distribución del colágeno dentro del endometrio asino.

5. EL ENDOMETRIO DE LA BURRA COMO MODELO COMPARATIVO PARA COMPRENDER LA BIOLOGÍA UTERINA HÍBRIDA

El endometrio de la burra constituye un modelo comparativo particularmente informativo, ya que demuestra que la remodelación uterina en los équidos no puede interpretarse exclusivamente a través del paradigma de la yegua (González et al., 2015; Canisso et al., 2019; Wu et al., 2024; Vallejo-Soto et al., 2026). Si bien la yegua sigue siendo la especie más estudiada en patología reproductiva equina, los estudios en la burra han demostrado que la arquitectura básica del endometrio puede coexistir con patrones inflamatorios y fibróticos marcadamente diferentes (Radar-Chafirovitch et al., 2025). Esto es especialmente importante para la presente tesis, ya que la mula hereda un linaje parental del asno, lo que hace que el útero asino sea indispensable para identificar qué rasgos híbridos reflejan un sesgo parental y cuáles representan características híbridas genuinamente emergentes (Canisso et al., 2019; Radar-Chafirovitch et al., 2025). La fibrosis en la burra no parece seguir la secuencia equina clásica, y la eosinofilia podría no ser simplemente un reflejo de una condición patológica, sino más bien un contexto inmunitario específico de la especie dentro del cual se regula la remodelación endometrial (Radar-Chafirovitch et al., 2025). En consecuencia, el endometrio de la burra no debe considerarse una simple variante del modelo equino; por el contrario, representa un microambiente uterino biológicamente distinto (Radar-Chafirovitch et al., 2025).

La fibrosis en la burra no reproduce la secuencia equina clásica y la eosinofilia podría no representar simplemente una patología, sino más bien un contexto inmunitario específico de la especie dentro del cual se regula la remodelación (Radar-Chafirovitch et al., 2025). En consecuencia, el endometrio del asno no puede reducirse a una variante del equino; constituye un entorno uterino biológicamente distinto.

Estas peculiaridades del asno no son meras curiosidades diagnósticas. Implican que los signos histológicos interpretados como degeneración progresiva en la yegua pueden tener un significado biológico diferente en la burra, particularmente cuando intervienen la topología del colágeno y los infiltrados ricos en eosinófilos. La composición de las células inmunitarias residentes puede modular cómo se resuelve o perpetúa la inflamación (Quartuccio et al., 2020; Radar-Chafirovitch et al., 2025). Consecuentemente, existe la necesidad de un marco triangular: la yegua como modelo clásico, la burra como modelo parental asino y la mula como sistema híbrido cuya biología no puede inferirse de ninguno de los progenitores por separado (Quartuccio et al., 2020; Radar-Chafirovitch et al., 2025).

Este enfoque comparativo permite establecer si las características observadas en el endometrio de la mula corresponden a rasgos intermedios entre sus especies parentales, muestran una mayor proximidad hacia alguno de los progenitores o representan propiedade3s emergentes derivadas de la hibridación (Canisso et al., 2019). Sin la inclusión del endometrio de la burra como referencia biológica, la mula correría el riesgo de ser interpretada únicamente como una yegua atípica o como una variante insuficientemente caracterizada de la patología endometrial equina (Allen & Short, 1997; (Fennessy, 1997; Canisso et al., 2019). En cambio, al reconocer que la burra posee una dinámica reproductiva, inmunitaria y fibrótica propia, el endométrio de la mula puede ser entendido como un tejido híbrido genuino, cuya organización morfológica y regulación funcional requieren una evaluación comparativa específica, y no una simple extrapolación desde el modelo equino convencional (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

6. LA MULA COMO MODELO REPRODUCTIVO BIOLÓGICAMENTE SINGULAR Y CLÍNICAMENTE RELEVANTE

La mula, tradicionalmente definida como la descendencia estéril de una yegua y un burro, ocupa una posición única en la biología de los équidos (Canisso et al., 2019). Es ampliamente valorada por su resistencia, robustez y versatilidad funcional, pero desde el punto de vista reproductivo se la ha considerado durante mucho tiempo un modelo biológico sin futuro (Rong et al., 1985; Ryder et al., 1985; Rong et al., 1988). Sin embargo, un pequeño pero convincente conjunto de evidencias ha

demostrado que las mulas pueden ovular, presentar ciclos estrales, servir como receptoras de embriones y, en raras ocasiones, incluso lograr el embarazo (Canisso et al., 2019). Este conjunto de investigaciones ha transformado a la mula, de una anomalía reproductiva a un modelo híbrido biológicamente relevante para el estudio de la función uterina, la compatibilidad embrio-materna y las consecuencias de la herencia interespecífica en los tejidos reproductivos (Canisso et al., 2019).

La importancia de la mula en la biotecnología reproductiva se ha hecho cada vez más evidente a través de estudios de transferencia embrionaria. Se han transferido con éxito embriones de caballo a mulas receptoras, y se han documentado gestaciones de burro en mula y de mula en mula con nacimientos vivos (Davies et al., 1985; Camillo et al., 2003; Bottrel et al., 2017; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). Estos hallazgos demuestran que, si bien la gametogénesis en mulas está severamente restringida, el entorno uterino puede sustentar la gestación cuando se le proporciona un embrión competente y un ambiente endocrino apropiado (Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). Este punto es fundamental para el planteamiento de la presente tesis: la competencia uterina y la fertilidad no son intercambiables. Un híbrido estéril aún puede poseer un útero funcional, y el estudio de dicho útero puede revelar cómo la hibridación moldea la estructura tisular, la respuesta endocrina y la regulación inflamatoria (Canisso et al., 2019; Camargo et al., 2020).

Desde una perspectiva comparativa, la biología híbrida proporciona una sólida base teórica para esperar que el endometrio de la mula difiera del de cualquiera de las especies parentales (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025). Las revisiones sobre la hibridación en mamíferos enfatizan que los fenotipos híbridos pueden presentar rasgos intermedios, rasgos transgresivos que exceden el rango parental o combinaciones de características parentales específicas de tejido y contexto (Adavoudi & Pilot, 2022). La hibridación también puede alterar los patrones de expresión génica de maneras que no son predecibles a partir de la morfología sola (Runemark et al., 2025). En los tejidos reproductivos, donde las interacciones endocrinas, inmunitarias y estromales están estrictamente reguladas, tales cambios pueden ser especialmente trascendentales (Runemark et al., 2025). Por lo tanto, no se debe asumir que el útero de la mula sea un simple punto intermedio entre la yegua y el burro, sino más bien considerarlo como un tejido híbrido cuyo fenotipo puede combinar el sesgo parental con propiedades reguladoras emergentes (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

Clínicamente, la mula también es relevante porque proporciona un modelo natural para examinar la resiliencia uterina en un contexto de endocrinología reproductiva alterada (Canisso et al., 2019; Camargo et al., 2020). En comparación con las yeguas, las mulas pueden presentar diferencias en la expresión del ciclo, el historial reproductivo, la paridad y la exposición gestacional a lo largo de la vida (Canisso et al., 2019). Es probable que estos factores influyan en el ritmo de la remodelación endometrial y puedan ayudar a explicar por qué las etapas fibróticas terminales graves son poco comunes en la serie actual de mulas. En consecuencia, la mula ofrece la oportunidad de estudiar cómo se desarrolla la remodelación tisular cuando el útero presenta una estructura equina, pero su función está determinada por una fisiología híbrida. Esto tiene una relevancia traslacional directa para la patología comparada y el manejo reproductivo en équidos (Gambini et al., 2025).

A pesar de su importancia, el endometrio de la mula permaneció prácticamente inexplorado hasta los estudios incluidos en este compendio (Allen, 2005; Canisso et al., 2019). No existían descripciones histológicas, ni datos estereológicos cuantitativos, ni un marco histológico-molecular integrado para interpretar las lesiones endometriales en este híbrido. Esta falta de conocimiento resulta especialmente llamativa dado el uso práctico de las mulas en programas de transferencia embrionaria y el valor conceptual de la mula como experimento natural en biología de tejidos híbridos (Canisso et al., 2019).En este contexto, la presente tesis se plantea no únicamente como un estudio descriptivo, sino como un esfuerzo por construir un marco comparativo capaz de explicar cómo la hibridación afecta la remodelación uterina, la inflamación y la interpretación diagnóstica (Allen, 2005).

7. HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS COMPLEMENTARIAS Y LA NECESIDAD DE UNA INTERPRETACIÓN MULTIMODAL DE LAS BIOPSIAS ENDOMETRIALES

Existe una cuestión diagnóstica fundamental de la patología uterina de la yegua: ¿es suficiente la histología convencional para capturar el estado biológicamente relevante del endometrio? La evidencia creciente sugiere que la respuesta es negativa (Ferreira-Dias et al., 2024). Si bien la evaluación con hematoxilina-eosina y la clasificación de Kenney-Doig siguen siendo indispensables, múltiples estudios han demostrado que la inmunohistoquímica, el perfil de receptores de esteroides y los

métodos específicos de la matriz revelan dimensiones de la actividad de la enfermedad que no son completamente visibles en las secciones de rutina (Hoffmann et al., 2009b; Rojas et al., 2020). Estas herramientas complementarias han adquirido especial importancia en la endometrosis, donde patrones morfológicos similares pueden diferir notablemente en la activación de fibroblastos, la integridad epitelial, la respuesta endocrina y la madurez del colágeno (Rojas et al., 2020; Centeno et al., 2024; Ferreira-Dias et al., 2024).

Entre estas herramientas, marcadores como la vimentina y la citoqueratina resultan especialmente informativos, ya que identifican la activación mesenquimal y la preservación epitelial, respectivamente (Rojas et al., 2020). En biopsias de yeguas, el aumento de la señalización mesenquimal estromal y periglandular, junto con cambios en los marcadores epiteliales, se ha interpretado como evidencia de remodelación tisular activa (Hoffmann et al., 2009b; (Rojas et al., 2020). Los receptores de esteroides añaden otra capa crucial, ya que la competencia funcional del endometrio depende no solo de la morfología, sino también de la capacidad de las células para responder adecuadamente a las señales ováricas (Hoffmann et al., 2009b; Jasiński et al., 2022). Cuando la expresión de los receptores se reduce o se redistribuye, el tejido puede verse comprometido funcionalmente incluso si el daño histológico parece moderado (Jasiński et al., 2022. Estos conceptos son directamente relevantes para la mula, donde un útero aparentemente conservado puede diferir profundamente del de la yegua en su respuesta a la inflamación y al control hormonal.

La microscopía de generación de segundo armónico (SHG) amplía aún más esta lógica al permitir la visualización sin marcadores de la organización del colágeno fibrilar (Campagnola, 2011; Cox, 2011) (Chen et al., 2012). La SHG no solo muestra si hay colágeno presente, sino que también proporciona acceso a la disposición, densidad y estados de remodelación de las fibras que pueden preceder a la fibrosis histológica manifiesta (Chen et al., 2012; Nejim et al., 2022). En estudios de tejido cicatricial, tumores y órganos fibróticos, la SHG ha demostrado ser altamente sensible a los cambios supramoleculares del colágeno (Strupler et al., 2007; Mostaço-Guidolin et al., 2013). Por lo tanto, su aplicación al endometrio equino es conceptualmente poderosa, especialmente en un tejido híbrido donde la cronología de la fibrosis puede diferir de la de la yegua (Campagnola, 2011; Cox, 2011). Combinada con la tinción convencional, la SHG puede ayudar a distinguir la remodelación heterogénea temprana de la fibrosis avanzada consolidada, lo que permite refinar la interpretación

diagnóstica (Mostaço-Guidolin et al., 2013; Nejim et al., 2022).

8. LAGUNAS DE CONOCIMIENTO

A pesar de décadas de investigación sobre la patología endometrial en la yegua, persisten importantes lagunas de conocimiento especialmente en lo que respecta a otros équidos, como los burros y, en particular, los híbridos mulares (Ferreira-Dias et al., 2024; Schöniger & Schoon, 2020). Los marcos diagnósticos, las categorías histológicas y gran parte de la literatura sobre los mecanismos se desarrollaron en la yegua y posteriormente se generalizaron, a menudo de forma implícita, a la burra y mula (Schöniger & Schoon, 2020).

Una segunda laguna se refiere a la metodología. El método clásico de biopsia sigue siendo esencial, pero su poder predictivo y explicativo disminuye al aplicarse a tejidos cuya biología difiere del modelo de validación original (Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b). Este problema se agrava en las categorías de lesiones intermedias y en especies para las que no existe una escala histológica específica (Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b). La reciente propuesta de sistemas de puntuación histológica complementarios en yeguas subraya la idea de que la interpretación endometrial está evolucionando (Martínez-Bartolomé et al., 2024). Por lo tanto, en los híbridos, la necesidad de estrategias diagnósticas integradoras no es opcional, sino fundamental (Ferreira-Dias et al., 2024). La histología debe vincularse con el inmunofenotipo, la topología de la matriz, los marcadores endocrinos y la expresión génica para interpretar con precisión la competencia uterina y la progresión de la enfermedad (Ferreira-Dias et al., 2024).

En un panorama de biología reproductiva comparada cada vez más interesado en la diversidad de especies, el diagnóstico molecular y la patología de precisión, la mula emerge como un modelo natural excepcionalmente informativo (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025); para responder a una pregunta que no podría resolverse únicamente con la yegua (Allen & Short, 1997; Fennessy, 1997; Canisso et al., 2019; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025; Gambini et al., 2025).

9. JUSTIFICACIÓN

La integridad endometrial es un determinante fundamental del éxito reproductivo en équidos, ya que condiciona la receptividad uterina, la supervivencia embrionaria, la interacción entre el conceptus y la madre, y el mantenimiento de la gestación temprana (Klein, 2016; Ferreira-Dias et al., 2024). En yeguas, la biopsia endometrial se ha considerado tradicionalmente una de las herramientas más informativas para evaluar el pronóstico reproductivo, particularmente en el contexto de la endometritis y la endometrosis (Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011). Sin embargo, el marco conceptual y diagnóstico que se utiliza actualmente en la reproducción equina se ha construido casi en su totalidad a partir de estudios en yeguas, y su transferencia directa a otros équidos no ha sido suficientemente validada (Schöniger & Schoon, 2020; Ferreira-Dias et al., 2024). Esta limitación es especialmente relevante en burras y mulas, cuya biología reproductiva, fisiología uterina, respuestas inflamatorias y patrones de remodelación tisular no pueden considerarse idénticos a los descritos en yeguas (Canisso et al., 2019; Radar-Chafirovitch et al., 2025).

La burra constituye un modelo comparativo esencial, ya que es una de las especies parentales de la mula y porque la evidencia disponible indica que la reproducción asina difiere de la reproducción equina en varios aspectos, incluyendo las respuestas inflamatorias uterinas, la organización histológica y el manejo reproductivo (Canisso et al., 2019), pero el conocimiento existente es aún escaso. Paralelamente, la mula representa un modelo biológicamente singular como híbrido interespecífico en el que la organización estructural, la distribución de las células inmunitarias, la activación del estroma, la remodelación de la matriz extracelular y la progresión fibrótica no reflejan simplemente una condición intermedia entre la yegua y la burra (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025). Por el contrario, la hibridación puede generar un fenotipo endometrial distinto con su propia lógica morfológica y molecular (Adavoudi & Pilot, 2022). Comprender este fenotipo es relevante no solo desde una perspectiva comparativa y evolutiva, sino también desde un punto de vista clínico y reproductivo aplicado, ya que las mulas pueden funcionar como receptoras de embriones y, por lo tanto, requieren una evaluación uterina precisa (Camillo et al., 2003; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022).

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Se plantea que la remodelación endometrial en los équidos presenta patrones inflamatorios, fibróticos y estructurales específicos de cada especie, identificables mediante la evaluación integrada de parámetros histopatológicos, histomorfométricos, inmunohistoquímicos, moleculares y de organización del colágeno. Asimismo, que el endometrio de la mula exhibe características distintivas derivadas de su condición híbrida, que se manifiestan en un perfil estructural y molecular diferenciado respecto al de yeguas y burras, lo que podría limitar la aplicabilidad de los sistemas diagnósticos convencionales y requerir un enfoque multidimensional para su adecuada caracterización.

OBJETIVOS

Para comprobar las hipótesis planteadas en esta Tesis Doctoral, se establecieron los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Caracterizar e interpretar comparativamente la remodelación endometrial en burras y mulas mediante enfoques histopatológicos, histomorfométricos, inmunohistoquímicos, moleculares y de imagen de colágeno, con el fin de determinar si el endometrio de la mula representa una entidad biológica híbrida distinta y establecer un marco más preciso para el diagnóstico de alteraciones endometriales en équidos

Objetivo específico 1.

Caracterizar en el endometrio de la burra la relación entre la infiltración eosinofílica, la expresión de *IL33* y la distribución tisular de los colágenos tipo I y III a lo largo de las categorías histopatológicas, con el fin de identificar rasgos inflamatorios y fibróticos especies-específicos que sirvan como referencia comparativa para la interpretación del endometrio híbrido.

Objetivo específico 2.

Caracterizar cuantitativamente la organización histomorfométrica del endometrio de la mula y determinar el perfil de transcripción de mediadores inflamatorios y fibróticos clave, con el propósito de definir su fenotipo uterino, establecer su relación comparativa con yeguas y burras, y evaluar la

aplicabilidad diagnóstica del sistema de Kenney–Doig en esta especie híbrida.

Objetivo específico 3.

Evaluar la remodelación endometrial en las mulas mediante un enfoque diagnóstico integrado que combina histopatología, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia, análisis de expresión génica y microscopía de segundo armónico, a fin de comparar su perfil estructural y molecular con el descrito en yeguas y burras, y determinar si la integridad endometrial del híbrido puede ser definida con mayor precisión más allá de la histología convencional.

CAPÍTULO III

COMPENDIO DE ARTÍCULOS

Collagen and Eosinophils in Jenny"s Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification?

Jordi Miró1; Miguel Gutiérrez-Reinoso; Joana Aguiar da Silva; Carina Fernandes; Maria Rosa Rebordão; Graça Alexandre-Pires; Jaime Catalán; Graça Ferreira-Dias

Frontiers in Veterinary Science

Septiembre 2020

doi: 10.3389/fvets.2020.00631

frontiers in Veterinary Science

ORIGINAL RESEARCH
published: 10 September 2020
doi: 10.3389/fvets.2020.00631

Collagen and Eosinophils in Jenny's Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification?

Jordi Miró[1], Miguel Gutiérrez-Reinoso[1], Joana Aguiar da Silva[2], Carina Fernandes[2], Maria Rosa Rebordão[2,3], Graça Alexandre-Pires[2], Jaime Catalán[1] and Graça Ferreira-Dias[2]*

[1] Equine Reproduction Service, Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain, [2] Faculdade de Medicina Veterinária, CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal, [3] Coimbra College of Agriculture, Polytechnic Institute of Coimbra, Coimbra, Portugal

Collagen fibers and inflammatory cells are the basis for jenny endometrium Kenney and Doig's classification developed for the mare. The infiltration of a large number of eosinophils in the jenny endometrium is intriguing. Eosinophil and fibroblast produced IL33, which has been related to fibrosis development and chronicity. This work on the endometrium consisted of (i) quantification of collagen type I (COL1A2), type III (COL3A1), and IL33 transcripts; (ii) histological localization and quantification of COL1 and COL3 proteins; and (iii) eosinophil and neutrophil count and correlation with collagen area and IL33 transcripts. Localization of COL protein in the jenny endometrium was also compared to the mare endometrium. As fibrosis increased, eosinophil and neutrophil count decreased ($P < 0.05$). A 5-fold increase in IL33 transcripts was noted from categories IIA to III. There was a tendency toward a positive correlation between eosinophil count and IL33 transcripts in category IIA endometrium ($P = 0.055$). Neither transcripts of COL1A2 nor COL3A1 nor the areas of COL1 or COL3 differed with endometrial categories. Unlike for the mare, and regardless of the jenny endometrium classification, COL3 was always found to different extents in the stratum compactum, while COL1 was mainly present in deep stroma. As fibrosis progressed in the mare, an extensive increase in COL1 fibers was notorious under the surface epithelium. Correlations between neutrophil count and COL1 and COL3 areas were observed in the jenny endometrium, although no correlation was found for eosinophil count. Neutrophil count positive correlation with the COL1 area and negative correlation with the COL3 area in endometria with mild lesions suggest that neutrophils in the jenny endometrium may be involved in fibrogenesis. In addition, when eosinophilia subsides, the endometrium reacts with fibrosis establishment, which could be stimulated by the pro-fibrotic cytokine IL33, whose release might then be ascribed to fibroblasts. Further studies are needed to analyze the effect of the presence of COL3 next to the surface epithelium in the stratum compactum, or around the endometrial glands on jenny's endometrial function and fertility.

Keywords: donkey, endometrium, collagen, fibrosis, endometrosis, eosinophils, IL-33

OPEN ACCESS

Edited by:
Amy Katherine McLean, University of California, Davis, United States

Reviewed by:
Marco Antonio Alvarenga, São Paulo State University, Brazil
Miguel Quaresma, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Portugal

****Correspondence:***
Jordi Miró
jordi.miro@uab.cat

Specialty section:
This article was submitted to Comparative and Clinical Medicine, a section of the journal Frontiers in Veterinary Science

Received: *01 May 2020*
Accepted: *03 August 2020*
Published: *10 September 2020*

Citation:
Miró J, Gutiérrez-Reinoso M, Silva JAd, Fernandes C, Rebordão MR, Alexandre-Pires G, Catalán J and Ferreira-Dias G (2020) Collagen and Eosinophils in Jenny's Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification? Front. Vet. Sci. 7:631. doi: 10.3389/fvets.2020.00631

INTRODUCTION

In jenny's endometrium, the infiltration of eosinophils and the presence of fibrosis to different extents might influence endometrial function and gestation in a dissimilar fashion to the mare. The frequent infiltration of a large number of eosinophils in jenny's endometrium, unlike for the mare, appears to be a physiological feature of the jenny endometrium (1). The eosinophils appear to regulate tissue homeostasis and contribute for inflammatory reactions in tissue remodeling and innate immunity (2). In general, eosinophils are considered as the major effector cells in type two inflammatory diseases, including asthma, helminthic infection, and allergy (2). In fact, eosinophils result from the differentiation of CD117+ progenitor cells, directly stimulated by interleukin 33 (IL33) (3). In airway inflammation, IL33 besides exacerbating eosinophil infiltration in an autocrine and paracrine manner also attracts macrophages, lymphocytes, IL-13, and TGF-β1 (3). A relationship between eosinophil infiltration and the expression of IL33 has also been referred in chronicity and development of fibrosis in liver, skin, and intestine (4–6).

In the mare endometrium, the excessive deposition of collagen in the extracellular matrix, predominantly around the endometrial glands and stroma, which is associated with a chronic degenerative condition, destruction of tissue architecture, and impairment of endometrial function, is named endometriosis (7, 8). In tissue repair, collagen type III (COL3) is the first one to be expressed, being replaced by collagen type I (COL1) in later stages of fibrogenesis (9). Nevertheless, in the mare endometrium at the transcript level, age appeared not to influence COL1 or COL3 mRNA (10). In contrast, quantification of the areas in the endometrium occupied by COL1 and COL3, stained with histochemical picrosirius red staining and visualized by polarized light microscopy (11, 12), showed an increase in COL1 in the tissues with severe endometriosis, in comparison to healthy endometria or with mild fibrotic changes, where COL3 was the most predominant type (10). A previous morphometric analysis of periglandular fibrosis in equine endometria using picrosirius red also referred a predominance of COL1 in severe endometriosis (13).

The main purpose of this work was to contribute to the understanding of the inflammatory processes and fibrosis in jenny's endometrium, classified according to Kenney and Doig's mare grading system (14). Therefore, the main goals of the present study consisted of (i) quantification of transcripts of collagen type I (COL1A2), type III (COL3A1), and IL33 in the endometrium; (ii) localization and quantification of COL1 and COL3 protein in histological sections; and (iii) assessment of eosinophil and neutrophil count and their correlation with collagen and IL33 transcripts. In addition, localization of the COL protein in jenny's endometrium was compared to mare endometrium histological sections.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Sample Collection

A total of 80 Catalonian jennies, between 3 and 22 years of age, were divided in eight jenny groups, which were brought together for 75 days (April 1st/June 15th, 2017) with ten Catalan jackasses, aged 5–9 years and of proven fertility, for natural breeding. Jennies were assigned to different groups according to selection criteria. All animals were included in the Catalonian donkey Studbook and under a selection program. One month after jackass removal, a pregnancy diagnosis was done by transrectal ultrasonography using a MyLab™ Gamma (Esaote, Genova, Italy) device.

All animals were owned by a commercial donkey farm, FUIVES (Berga, Barcelona, Spain). Donkeys were kept in paddocks and fed grain forage, straw, hay, and water *ad libitum*.

A total of 29 jennies did not get pregnant (63.75% fertility rate), and 23 of them were included in the present study. Six jennies were discarded for different reasons: three of them presented cervical stenosis, one died, one showed a severe skin disease, and the other one had never foaled before. Endometrial biopsies were obtained during estrous from 23 non-pregnant jennies through the cervix, with an alligator jaw biopsy punch (Kevorkian's uterine biopsy forceps, Hauptner and Herberholz, Solingen, Germany), at estrus. All 23 jennies used in this study had foaled at least once before. Each biopsy was divided into two pieces. One portion was immediately immersed in buffered formaldehyde, for paraffin blocks, and further processed for histological examination. The other piece of the endometrium was placed in cryotubes with RNAlater® (AM7020; Ambion, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) and kept at −80°C, for gene transcription studies, by real-time PCR.

Histopathological Analysis

For histopathological analysis, 5-μm-thick sections of formaldehyde-fixed endometrium were stained with hematoxylin (05-06014E; Bio-Optica) and eosin (HT1103128; Sigma-Aldrich). Every jenny endometrial biopsy was evaluated by light microscopy (Leica DM500) regarding the histopathology of endometrial glands, presence of inflammatory cells (neutrophils, eosinophils), and fibrosis in the stroma. Neutrophil and eosinophil count was performed at random in 10 fields/biopsy, at the magnification of × 400. Due to the inexistence of a classification method for jenny's endometrium, the Kenney and Doig (14) grading system for the mare endometrium was used. Thus, a healthy endometrium was considered as category I; an endometrium with mild fibrotic lesions and inflammation as category IIA; when these lesions become moderate as category IIB; or when they are severe as category III (14).

Real-Time PCR for COL1A2, COL3A1, and IL33

Quantification of COL1A2, COL3A1, and IL33 transcripts was accomplished by reverse transcriptase, followed by real-time polymerase chain reaction (qPCR), as previously described (15). Briefly, after endometrial total RNA extraction with TRI Reagent® (T9424; Sigma) according to the manufacturer's instructions, a NanoDrop system (ND200C; Fisher Scientific, Hampton, PA, USA) was used for RNA quantification. Visualization of 28S and 18S rRNA bands on a 1.5% agarose gel confirmed RNA quality. Reverse transcription was performed using M-MLV Reverse Transcriptase (M170B, Promega®) from

TABLE 1 | Primer sequences used in real-time PCR analysis.

Gene (Accession number)	Sequence 5′-3′	Amplicon (base pairs)
COL1A2 (NM_001323780.1)	Forward: CAAGGGCATTAGGGGACACA Reverse: ACCCACACTTCCATCGCTTC	196
COL3A1 (XM_014852914.1)	Forward: CAAAGGAGAGCCAGGAGCAC Reverse: CTCCAGGCGAACCATCTTTG	98
GAPDH (XM_014834961.1)	Forward: CACCCACTCTTCCACCTTCG Reverse: CTTGCTGGGTGATTGGTGGT	173
IL33 (XM_014860749.1)	Forward: CCCCAGCAAAGATGAACAGC Reverse: TGGTACATGCCTTCTGGTGGT	179

COL1A2—Equus asinus collagen type I alpha 2 chain; COL3A1—Equus asinus collagen, type III, alpha 1; GAPDH—Equus asinus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IL33—Equus asinus interleukin 33.

1 μg of total RNA in a 20-μL reaction volume using an oligo (dT) primer (C1101, Promega®).

Real-time PCR was used for the assessment of mRNA transcription of COL1A2, COL3A1, and IL-33. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was chosen as the reference gene [<2-fold changes between different biological conditions; (16)] from four potential validated genes (ribosomal protein L32, succinate dehydrogenase A complex, subunit A, flavoprotein, and beta-2-microglobulin). Internet-based program Primer-3 (17) and Primer Premier softwares (Premier Biosoft Interpairs, Palo Alto, CA, USA) were used to design the primers listed in **Table 1**.

Target and reference gene amplification was performed on StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, California, USA) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), after primer concentration optimization. Polymerase chain reaction (PCR) products were run on a 2.5% agarose gel to confirm specificity. Results were evaluated using Real-time PCR Miner 4.0 software. For gene quantification, the average efficiency of each gene (E) and the average cyclic threshold (CT) of each sample were used, in the formula $r_0 = [1/(1 + E)\ CT]$ (18). Relative expression values were calculated by normalizing the expression level of the target genes against that of the reference gene.

Picrosirius Red Staining

In order to assess the extent and localization of COL1 and COL3 in jenny's endometrium, a histological section, other than the one stained with hematoxylin and eosin for histopathological evaluation, was stained with Picrosirius Red Stain (ab#150681, Abcam plc, Cambridge, UK), following the manufacturer's instructions. Thus, a picrosirius red solution was placed onto deparaffinized endometrium sections and incubated for 1 h. Afterward, slides were rinsed with acetic acid solution and absolute alcohol. The slides were observed with an upright widefield microscope (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) at 200× magnification (20×/0.75NA objective) under polarized light, and ten random images from each stained endometrium section were acquired with a camera (TIS 2MP

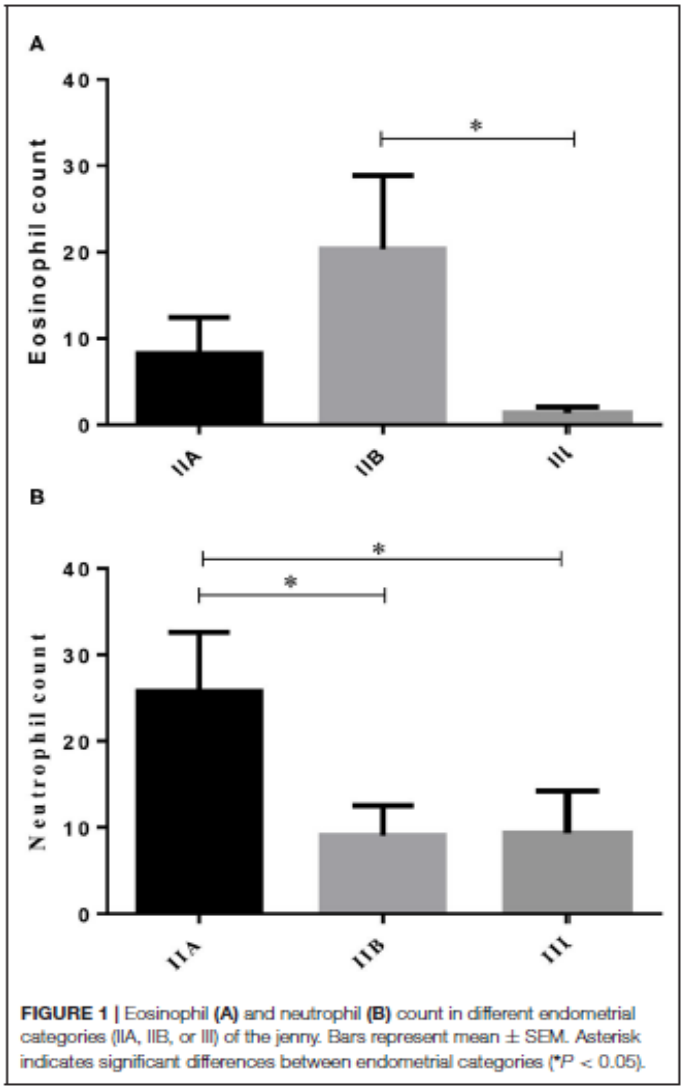


FIGURE 1 | Eosinophil **(A)** and neutrophil **(B)** count in different endometrial categories (IIA, IIB, or III) of the jenny. Bars represent mean ± SEM. Asterisk indicates significant differences between endometrial categories (*$P < 0.05$).

RGB), with a pixel size of 0.441 μm/pixel (12). Collagen type one fibers appeared in red, while COL3 fibers stained green. A qualitative evaluation of the endometrium sections was performed to enable the identification of the areas where each type of collagen was present. Moreover, a quantitative analysis was performed with ImageJ program (Version 1.52a, National Institutes of Health, USA).

In order to better understand if the localization of collagen fibers, namely, COL1 and COL3, in jenny's endometrium was specific to this species and could be the possible explanation for their longevity in reproduction as compared to the mare, endometrial histological sections from mares, graded according to Kenney and Doig (14), were also stained with PSR and observed for a qualitative assessment.

Statistical Analysis

Data regarding the area in the endometrial biopsy occupied by COL1 or COL3, and jenny's age in relation to endometrial

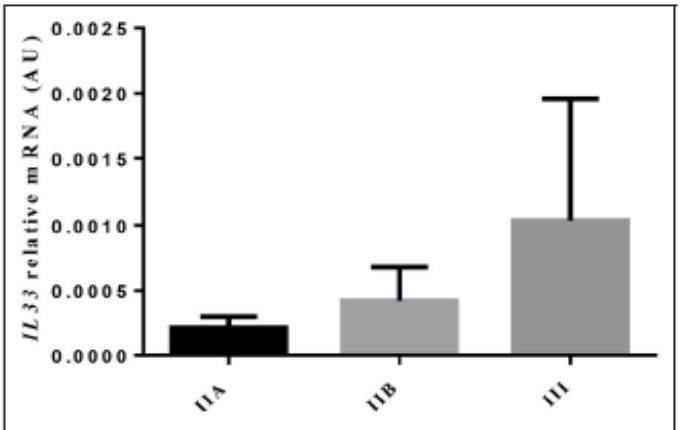


FIGURE 2 | Relative IL33 mRNA levels in different endometrial categories (IIA, IIB, or III) of the jenny. Bars represent mean ± SEM.

category were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test. In order to compare the number of eosinophils or neutrophils with IL33, COL1, or COL3 transcripts between endometrial categories, a Kruskal–Wallis analysis followed by Dunn's multiple-comparison test was used. Spearman rank correlation analysis between eosinophil or neutrophil count and IL33 mRNA levels and area occupied by COL1 or COL3 within each endometrial category was also performed. The software GraphPad Prism, Version 6.0, San Diego, CA, USA, was used to analyze these data. Significance was defined with the value of $P < 0.05$. Unless otherwise specified, the presented results are expressed as mean ± SEM.

RESULTS

Histological Classification

From the 23 endometrial biopsies obtained from the jennies, six endometria were graded as category IIA (12.5 ± 3.9 years old), 11 as category IIB (13.8 ± 4.2 y), and six as category III (13.6 ± 2.2 y), according to Kenney and Doig's mare endometrial classification (14). No age differences were found among endometrial categories ($P > 0.05$). As fibrosis increased, from categories IIB to III, a significant 14-fold decrease in the number of eosinophils was depicted (**Figure 1A**; $P < 0.05$). Regarding neutrophil count, there was a fall from the category IIA endometrium to category IIB, and from categories IIA to III. No correlation was found between age and any of the studied factors (PMN, eosinophils, COL1, COL3, COL1, COL3, and IL33 transcripts) (**Figure 1B**; $P > 0.05$).

Real-Time PCR

The transcripts of IL-33, a cytokine involved in eosinophilia and in chronicity and development of fibrosis (6), showed no difference, as endometrial fibrosis advanced, from jenny's endometria with little collagen fibers, such as category IIA, to category III endometria, where fibrosis is visibly established

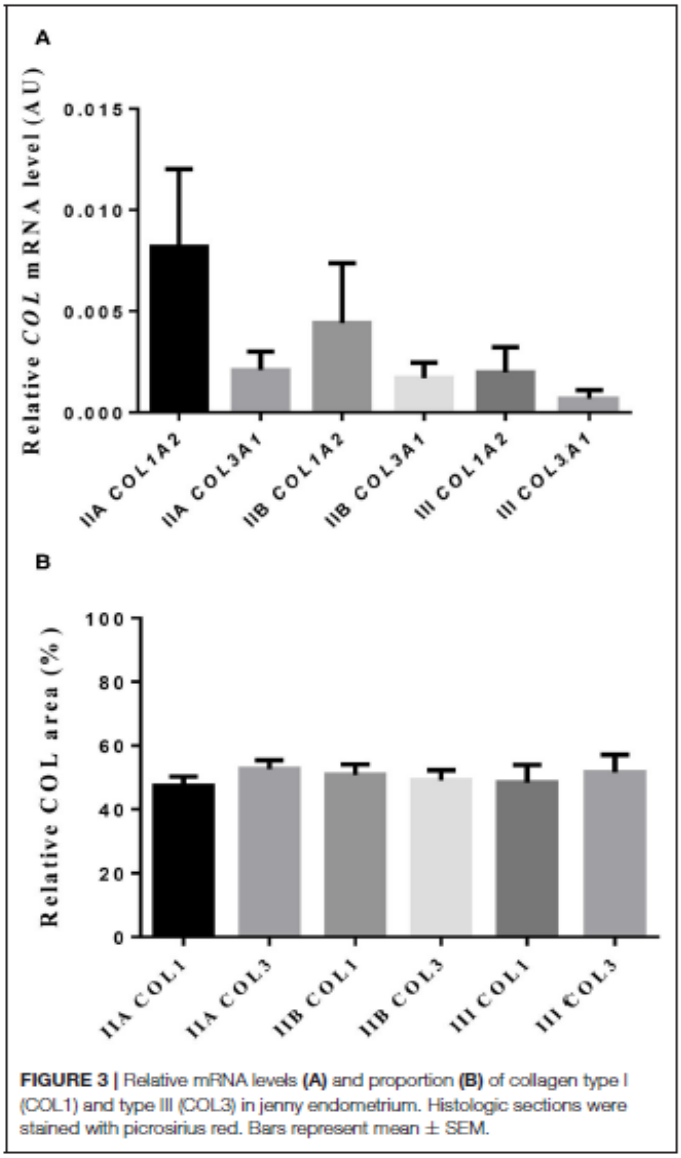


FIGURE 3 | Relative mRNA levels **(A)** and proportion **(B)** of collagen type I (COL1) and type III (COL3) in jenny endometrium. Histologic sections were stained with picrosirius red. Bars represent mean ± SEM.

(data not shown). Nevertheless, a 4.9-fold increase in IL33 mRNA levels was noted from category IIA to category III endometrium, even though not significant (**Figure 2**). When all endometrial categories were considered, no correlation was found between eosinophil count and IL33 transcripts (data not shown). However, there was a tendency toward a positive correlation between eosinophil count and IL33 transcripts in category IIA endometrium ($\rho = 0.7714$; $P = 0.055$), mainly due to the effect of a single sample (one out of six) that clearly tipped the line toward significance (data not shown).

Neither transcripts of COL1A2 nor COL3A1 differed between jenny's endometrial categories (**Figure 3A**). However, a 4-fold drop in COL1A2 and a 3-fold fall in COL3A1 in the mRNA levels between category IIA and category III were noted.

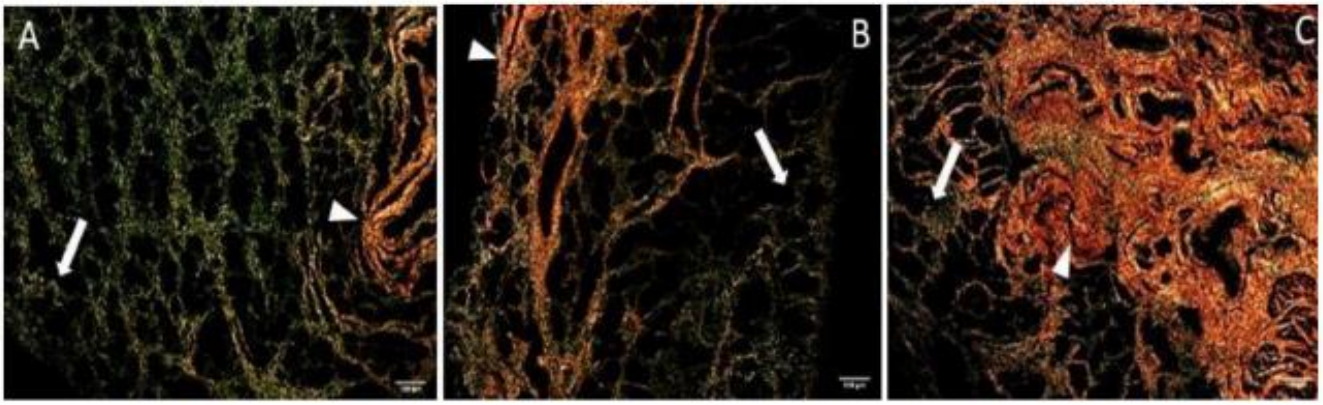


FIGURE 4 | Jenny endometrium sections stained with picrosirius red and observed under polarized light microscopy. Collagen type I (COL1) stains red (arrow head), while collagen type III (COL3) stains green (white arrow). **(A)** Category IIA endometrium—a larger extent of COL3 is present in the stratum compactum under the surface epithelium and periglandular. Some COL1 fibers are present in the deeper stroma. **(B)** Category IIB endometrium—COL3 fibers are depicted under the basement membrane in the stratum compactum and periglandular, but COL3 fibers are also intertwined with some COL1 fibers. **(C)** Category III endometrium—COL3 fibers are still found under the basement membrane and periglandular, but more COL1 is present in the deep stroma, surrounding endometrial glands.

Picrosirius Red Staining

The quantitative assessment of the different types of COL in the jenny endometrium has shown no differences in the area occupied by either COL1 or COL3 (**Figure 3B**). When considering the qualitative evaluation of collagen fibers in jenny's category IIA endometrium, green-stained COL3 was mostly found under the basement membrane and in the stroma, surrounding endometrial glands. However, COL1 fibers, which stained red, were sparse and mainly present in the deeper stroma (**Figure 4**, **Table 2**). In category IIB donkey endometrium, the location of COL3 fibers was also under the basement membrane in the stratum compactum and periglandular, but COL3 fibers were also intertwined with some COL1 fibers. In the stroma, both COL types were found. When fibrosis was strongly established, such as in category III endometrium, COL3 fibers were still found under the basement membrane and periglandular, but more COL1 was seen in the deep stroma, surrounding endometrial glands, lymphatic lacunae, and blood vessels, in comparison to the other Kenney and Doig's endometrial categories (**Figure 4**, **Table 2**). When these data were matched to mare's endometrial localization of COL fibers, visible differences were found between species. In mare endometria graded as category I (not found in the jennies in the present study), COL3 fibers were seen under the basement membrane and in the stratum compactum. As endometriosis progressed, an increase in COL1 fibers was notorious under the basement membrane, which was not seen in the jenny. Actually, in some category III endometria, only COL1 fibers were present (**Figure 5**, **Table 3**).

The correlation between eosinophil or neutrophil count and the area occupied by COL1 or COL3 was also evaluated. Although no correlation was found for eosinophil count (data not shown), correlations between neutrophil count and both COL1 and COL3 areas were observed. Positive correlations were seen for the endometrial area occupied by COL1 when all endometrial categories were considered ($\rho = 0.520$; $P = 0.01$; **Figure 6A**) and for category IIB ($\rho = 0.6770$; $P = 0.03$; **Figure 6B**) but not significantly in category III (**Figure 6C**). Between neutrophil count and COL3 area, a negative correlation was detected when all endometrial categories were considered ($\rho = -0.4716$; $P = 0.03$; **Figure 6D**) and in category IIB ($\rho = -0.6102$; $P = 0.03$; **Figure 6E**). A tendency toward a negative correlation between neutrophil count and COL3 area was also noticed in category III endometrium ($\rho = -0.7537$; $P = 0.07$; **Figure 6F**).

TABLE 2 | Qualitative evaluation of the presence of collagen type I (COL1) and collagen type III (COL3) in jenny endometrium, stained with picrosirius red.

	II A	II B	III
Under basement membrane	COL3	COL3	COL3
Periglandular	COL3	COL3/COL1	COL3/COL1
Stroma	COL3	COL3/COL1	COL1 ↑
Deep stroma	COL1	COL1	COL1 ↑
Around lymphatic			COL1
Around blood vessels			COL1

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study that has evaluated IL33 expression in donkey endometrium and related its transcript levels with eosinophil count and collagen transcripts and deposition. Since IL33 is a critical regulator of a number of processes including inflammation, vascularization, and fibrosis (19, 20), its role on the progression of endometrial inflammation and fibrosis in the jenny is worth evaluating. In fact, IL33 can exacerbate inflammation in collagen-induced arthritis, and in allergic processes (21, 22). Based on studies on peritoneal fluid, serum, or samples from endometriotic lesions in women, it has been suggested that IL33 might play an important role toward inflammation present in advanced-stage endometriosis

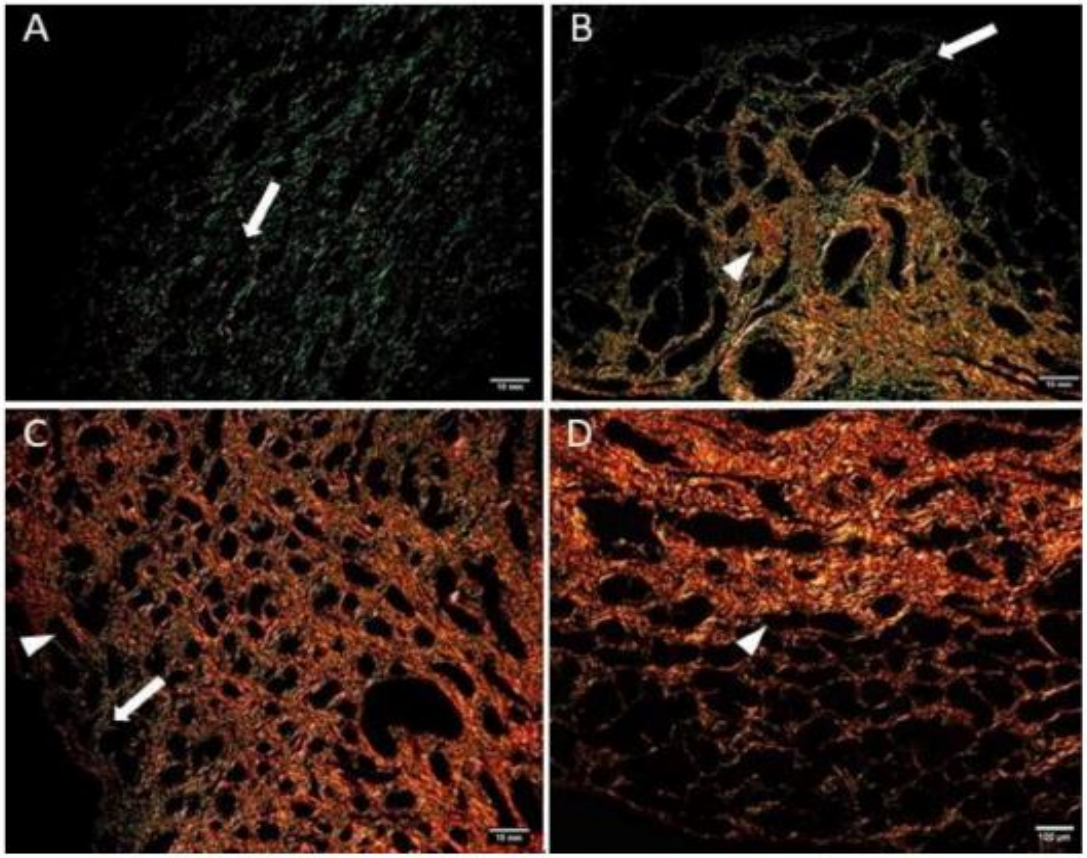


FIGURE 5 | Mare endometrium sections stained with picrosirius red and observed under polarized light microscopy. Collagen type I (COL1) stains red (arrowhead), while collagen type III (COL3) stains green (white arrow). **(A)** Category I endometrium—a larger extent of COL3 is present in the stratum compactum under the surface epithelium and periglandular. **(B)** Category IIA endometrium—COL3 fibers are depicted under the basement membrane in the stratum compactum and periglandular, but COL3 fibers are also intertwined with some COL1 fibers. **(C)** Category IIB endometrium—COL3 fibers are sparsely found under the basement membrane, while COL1 is predominant and present in the deep stroma, surrounding endometrial glands. **(D)** Category III endometrium—COL1 is found almost exclusively in the stratum compactum, periglandular, and under the basement membrane.

TABLE 3 | Qualitative evaluation of the presence of collagen type I (COL1) and collagen type III (COL3) in mare endometrium, stained with picrosirius red.

	II A	II B	III
Under basement membrane	COL3	COL3/COL1	COL1
Periglandular	COL3	COL3/COL1	COL3/COL1
Stroma	COL3	COL3/COL1	COL1 ↑
Deep stroma	COL1	COL1	COL1 ↑
Around lymphatic vessels			COL1
Around blood vessels			COL1

patients and on the progression of the disease (23, 24). Even though endometriosis in women, which consists of the abnormal growth of endometrial tissue outside the uterus (24, 25), and jenny's endometrial fibrosis are different conditions, at a certain stage of their development they both undergo an inflammatory process that ultimately may lead to fibrosis, as an end-point (25–29). We have shown that IL33 transcripts were detected in all jenny endometrial samples, regardless of their histopathological classification. Even though not reaching significance, IL33 mRNA levels in category III jenny endometrium were 5-fold increased, with respect to category IIA, while eosinophil count was about 14-fold lower in severe fibrosis than in healthier tissue (category IIA). The development of fibrosis and its chronicity in liver, skin, and intestine has been related to eosinophil infiltration and the expression of IL33 (4–6). Since a direct relationship between tissue eosinophil infiltration and the expression of IL33 has been referred, the present data on jenny endometria appears somewhat unexpected and cumbersome. In other species and tissues, accumulated observations have improved the understanding of eosinophil stimulation and ability to infiltrate tissues and participate in disease pathogenesis (30, 31). Even though rarely described, endometritis eosinophilica in the mare is a separate endometrial disease responsible for infertility (31). Nevertheless, deciphering the role of eosinophils in jenny's endometrium is still a challenge. It is plausible that jenny's endometrium with mild to moderate fibrosis (categories IIA and IIB) can

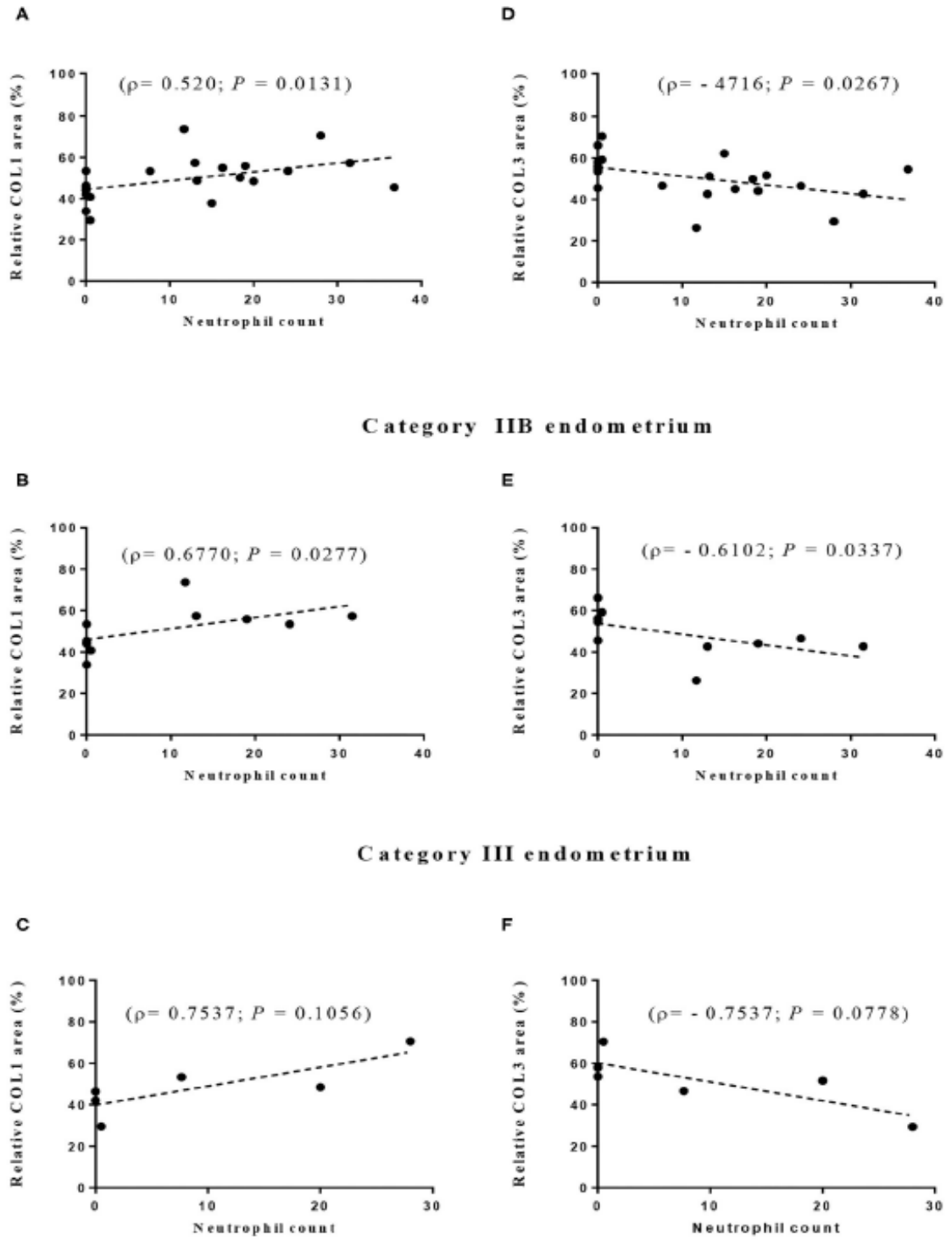


FIGURE 6 | Correlation between neutrophil count and relative proportion of collagen type I (COL1—**A–C**) and type III (COL3—**D–F**) in all **(A,D)** and in IIB **(B,E)**, and III **(C,F)** jenny endometrial categories. ρ—Spearman rank correlation.

mount an inflammatory reaction characterized by the presence of eosinophils and neutrophils. This eosinophil infiltration might be mediated by IL33. In fact, our results appear to indicate a trend toward a positive correlation between eosinophil count and IL33 transcripts in category IIA endometrium. Unlike other cytokines, when epithelial or endothelial cell damage or cell necrosis occurs, IL33 is passively released, suggesting that it may function as an alarmin that stimulates the immune system [reviewed by Chan et al. (22)]. However, in severe fibrosis (category III), as in other tissues where fibrosis is linked to impairment of organ function (32), the endometrial cells may no longer be capable of mounting an inflammatory reaction. Alternatively, eosinophil infiltration subsides, and the tissue reacts with fibrosis establishment, which could be stimulated by the still present pro-fibrotic cytokine IL33 (19), or by other pro-fibrotic stimuli (33). In spite of a decline in eosinophil infiltration in category III endometrium, the release of IL33 might be ascribed to other cells rather than eosinophils, such as fibroblasts [reviewed by Chan et al. (22)]. Nevertheless, this should be further investigated in jenny's endometrium.

In the present study, as fibrosis progressed from categories IIA to III, a 4-fold decrease in COL1A2 and a 3-fold decrease in COL3A1 in the mRNA levels were noted, although not significant. In addition, the percentage of areas occupied by COL1 and COL3 fibers in jenny endometria was similar, despite endometrial histopathological characteristics, in contrast to what we have previously shown for the mare endometrium. A preliminary work on Masson's trichrome-stained histological sections of jenny endometrium classified as I, IIA, or IIB was not conclusive about putative differences in the total area occupied by COL fibers (34). In contrast, in the mare, COL3 was the most predominant type of collagen in healthy endometrium, in comparison to severe endometriosis where COL1 was mostly found (10).

Interestingly, when evaluating the topographic histological distribution of COL1 and COL3 in jenny's endometrium, a different pattern was consistent, despite the histopathological classification and the progress of fibrosis. Even in category III endometrium, there was an area occupied by COL3 fibers under the basement membrane adjacent to the luminal epithelium, in the stratum compactum. In contrast, in the mare endometrium, COL3 fibers under the luminal epithelium were replaced by COL1, as fibrogenesis progressed. In fact, the arrangement of collagen fibers in the mare endometrium and their characteristics were related to the evolution of the process (35, 36). Mare foaling rates do not overcome 11% in category III endometrium (37). However, this correlation remains unknown in donkeys. The analysis of the Catalonian donkey stud book showed that only 3.3% of foaled jennies are older than 15 years of age[1]. Moreover, the generation interval index (average age of one jenny and its selected offspring) of this donkey breed is 7.75 ± 0.25 years[1]. However, based on these data, it is impossible to calculate jenny's reproductive longevity or overall fertility rate, let alone for each endometrial category. In addition, it has been referred that in mare endometriotic tissue, the incidence of periglandular fibrosis should not be based on the increased presence of collagen fibers (38). Instead, the arrangement of fibroblasts around endometrial glands, in one or more layers, which produce the extracellular matrix proteins such as collagen IV, laminin, and fibronectin, should be taken into consideration (38).

The connection between inflammation and fibrosis is well-recognized (31). One putative link between neutrophil and fibrogenesis has been provided by neutrophil extracellular traps (NETs, released by neutrophils) triggering the differentiation of myofibroblasts, cells responsible for COL deposition (17). In the mare, NET components induced an *in vitro* increase in COL1 in the endometrium (39). Likewise, in mares with closed cervix, a marked endometritis and intense neutrophil infiltration, and permanent pathological endometrial changes, including fibrosis were observed (40). In a recent study on jenny's endometrial cytology, an increase in neutrophil count in older and multiparous jennies was referred (41). In the present study, the neutrophil count positive correlations with the area occupied by COL1, and the negative correlation with the area of COL3 observed in endometria with mild lesions, suggest that the presence of neutrophils in jenny's uterus may be involved in endometrial fibrogenesis.

In conclusion, there are important differences in the collagen distribution between jenny and mare endometria. The presence of COL3 next to the surface epithelium, in the stratum compactum, and around endometrial glands might not have a deleterious effect on implantation and endometrial function, as it appears to occur in mares with category III endometrium. Further studies are needed to correlate these findings with jenny's fertility and age Therefore, donkey endometrium classification should be reconsidered. In addition, further studies are needed to unravel the unknown role of neutrophils and eosinophils present in jenny's endometrium on the reproductive performance of this species.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JM and GF-D conceived the study, participated in the sample acquisition and analysis, helped conduct the data analysis, contributed to the writing of the original draft, and reviewing and editing the manuscript. MG-R and JC participated in the jenny control, sample acquisition, and process and data curation. JS, CF, and GA-P performed the sample formal analysis, data curation, and analysis. MR participated in sample formal analysis, data curation, and analysis and writing of the original draft. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

[1] Rac.uab.cat/enllacos/racenlla.htm

FUNDING

This work was supported by a competitive grant from the Fundação para a Ciência e Tecnologia (PTDC-CVT-REP-4202-2014) and by Project UIDP/CVT/00276/2020 (funded by FCT).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Mrs. Maria do Rosário Luís, from the Laboratory of Pathology (FMV) and Dr. Telmo Nunes from the Laboratory of Microscopy, for the valuable assistance on biopsies histological preparation and observation, respectively.

REFERENCES

1. Vilés K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology*. (2013) 79:1019–26. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.006
2. Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. (2006) 24:147–74. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720
3. Gervasi MG, Osycka-Salut C, Caballero J, Vazquez-Levin M, Pereyra E, Billi S, et al. Anandamide capacitates bull spermatozoa through CB1 and TRPV1 activation. *PLoS ONE*. (2011) 6:e16993. doi: 10.1371/journal.pone.0016993
4. Mchedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, et al. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*. (2013) 39:357–71. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.018
5. Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK, et al. IL-33 induces IL-13–dependent cutaneous fibrosis. *J Immunol*. (2010) 184:1526–35. doi: 10.4049/jimmunol.0903306
6. Masterson JC, Capocelli KE, Hosford L, Biette K, McNamee EN, De Zoeten EF, et al. Eosinophils and IL-33 perpetuate chronic inflammation and fibrosis in a pediatric population with stricturing crohn's ileitis. *Inflamm Bowel Dis*. (2015) 21:2429–40. doi: 10.1097/MIB.0000000000000512
7. Kenney RM. The aetiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis (CDE) (endometriosis). In: Allen WR, editor. *Equine Endometritis Worship. Proceedings of the John P. Hughes International Workshop on Equine Endometritis; 1992 Aug 19-20*. Newmarket (1993). doi: 10.1111/j.2042-3306.1993.tb02940.x
8. Hoffmann C, Ellenberger C, Mattos RC, Aupperle H, Dhein S, Stief B, et al. The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Anim Reprod Sci*. (2009) 111:261–78. doi: 10.1016/j.anireprosci.2008.03.019
9. Bochsler PN, Slauson DO. Inflammation and repair of tissue. In: Slauson DO, Cooper BJ, editors. *Mechanisms of Disease: A Textbook of Comparative General Pathology*. St. Louis, MO: Mosby (2002). p. 140–245.
10. Pinto-Bravo P, Reborddo MR, Amoral A, Fernandes C, Cuello C, Parrilla I, et al. Is mare endometrosis linked to oviduct fibrosis? *Pferdeheilkunde*. (2018) 34:43–6. doi: 10.21836/PEM20180107
11. Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch Histol Jap*. (1978) 41:267–74. doi: 10.1679/aohc1950.41.267
12. Podico G, Canisso IF, Roady PJ, Austin SM, Carossino M, Balasuriya U, et al. Uterine responses and equine chorionic gonadotropin concentrations after two intrauterine infusions with kerosene post early fetal loss in mares. *Theriogenology*. (2020) 147:202–10. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.014
13. Porto CD. *Caracterização histoquímica do colágeno e expressão de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 nas endometrites crônicas das éguas* (Dissertation/Master's thesis). Botucatu: University Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (2006).
14. Kenney R, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: Morrow DA, editor. *Current Therapy in Theriogenology*. Philadelphia, PA: WB Saunders (1986). p. 723–9.
15. Rebordão MR, Amaral A, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Pinto-Bravo P, Galvão A, et al. Impairment of the antifibrotic prostaglandin E 2 pathway may influence neutrophil extracellular traps–induced fibrosis in the mare endometrium. *Domest Anim Endocrinol*. (2019) 67:1–10. doi: 10.1016/j.domaniend.2018.10.004
16. Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques*. (2004) 37:112–9. doi: 10.2144/04371RR03
17. Chrysanthopoulou A, Mitroulis I, Apostolidou E, Arelaki S, Mikroulis D, Konstantinidis T, et al. Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *J Pathol*. (2014) 233:294–307. doi: 10.1002/path.4359
18. Zhao S, Fernald RD. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Comput Biol*. (2005) 12:1047–64. doi: 10.1089/cmb.2005.12.1047
19. Gao Q, Li Y, Li M. The potential role of IL-33/ST2 signaling in fibrotic diseases. *J Leukoc Biol*. (2015) 98:15–22. doi: 10.1189/jlb.3RU0115-012R
20. Millar NL, O'Donnell C, McInnes IB, Brint E. Wounds that heal and wounds that don't – the role of the IL-33/ST2 pathway in tissue repair and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol*. (2017) 61:41–50. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.007
21. Liew FY. IL-33: a janus cytokine. *Ann Rheum Dis*. (2012) 71:101–4. doi: 10.1136/annrheumdis-2011-200589
22. Chan BCL, Lam CWK, Tam LS, Wong CK. IL33: roles in allergic inflammation and therapeutic perspectives. *Front Immunol*. (2019)10:364. doi: 10.3389/fimmu.2019.00364
23. Santulli P, Borghese B, Chouzenoux S, Vaiman D, Borderie D, Streuli I, et al. Serum and peritoneal interleukin-33 levels are elevated in deeply infiltrating endometriosis. *Hum Reprod*. (2012) 27:2001–9. doi: 10.1093/humrep/des154
24. Miller JE, Monsanto SP, Ahn SH, Khalaj K, Fazleabas AT, Young SL, et al. Interleukin-33 modulates inflammation in endometriosis. *Sci Rep*. (2017) 7:1–11. doi: 10.1038/s41598-017-18224-x
25. Bulun SE. Endometriosis. *N Engl J Med*. (2009) 360:268–79. doi: 10.1056/NEJMra0804690
26. Itoga T, Matsumoto T, Takeuchi H, Yamasaki S, Sasahara N, Hoshi T, et al. Fibrosis and smooth muscle metaplasia in rectovaginal endometriosis. *Pathol Int*. (2003) 53:371–5. doi: 10.1046/j.1440-1827.2003.01483.x
27. Vicino M, Scioscia M, Resta L, Marzullo A, Ceci O, Selvaggi LE. Fibrotic tissue in the endometrioma capsule: surgical and physiopathologic considerations from histologic findings. *Fertil Steril*. (2009) 91:1326–8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.02.157
28. Sokkar SM, Hamouda MA, El-Rahman SM. Endometritis in she donkeys in Egypt. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. (2001) 48:529–36. doi: 10.1046/j.1439-0450.2001.00457.x
29. Canisso IF, Panzani D, Miró J, Ellerbrock RE. Key aspects of donkey and mule reproduction. *Vet Clin North Am Equine Pract*. (2019) 35:607–42. doi: 10.1016/j.cveq.2019.08.014
30. Akuthota P, Weller PF. Eosinophils and disease pathogenesis. *Semin Hematol*. (2012) 49:113–9. doi: 10.1053/j.seminhematol.2012.01.005
31. Grimm AL, Schoon H-A, Schöniger S. Histopathological features of endometritis eosinophilica in mares. *Histol Histopathol*. (2017) 32:1161–73. doi: 10.14670/HH-11-872
32. Zeisberg M, Kalluri R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *J Physiol Cell Physiol*. (2013) 304:216–25. doi: 10.1152/ajpcell.00328.2012
33. Sziksz E, Pap D, Lippai R, Béres NJ, Fekete A, Szabó AJ, et al. Fibrosis related inflammatory mediators: role of the IL-10 cytokine family. *Mediators Inflamm*. (2015) 2015:764641. doi: 10.1155/2015/764641
34. Pires MA, Ferreira-Dias G, Catarino J, Bastos-de-Carvalho C, Silvestre M, Nóvoa M, et al. Correlation between morphological characterization of jenny (*Equus asinus*) endometrial biopsy and quantification of collagen deposition by image analysis. *J Comp Pathol*. (2019) 166:139. doi: 10.1016/j.jcpa.2018.10.125

35. Masseno, APB. *Assessment of endometrial fibrosis and myofibroblasts in endometriosis active and inactive mares* (Dissertation/Ph.D. thesis). Botucatu: University Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (2012).
36. Costa, LD. *Histochemical and immunohistochemical characterization of fibrotic changes in mares endometrosis* (Dissertation/Master's thesis). Botucatu: University Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (2015).
37. Kenney RM. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J Am Vet Med Assoc.* (1978) 172:241–62.
38. Walter I, Handler J, Reifinger M, Aurich, C. Association of endometriosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction.* (2001) 121:581–6. doi: 10.1530/reprod/121.4.581
39. Rebordão MR, Amaral A, Lukasik K, Szóstek-Mioduchowska A, Pinto-Bravo P, Galvão A, et al. Constituents of neutrophil extracellular traps induce *in vitro* collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology.* (2018) 113:8–18. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.02.001
40. Reilas T, Rivera del Alamo MM, Liepina E, Yeste M, Katila T. Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology.* (2016) 85:617–24. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.053
41. Quartuccio M, Cristarella S, Medica P, Fazio E, Mazzullo G, Rifici C, et al. Endometrial cytology during the different phases of the estrous cycle in jennies: new evidences. *Animals.* (2020) 10:1062. doi: 10.3390/ani10061062

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Miró, Gutiérrez-Reinoso, Silva, Fernandes, Rebordão, Alexandre-Pires, Catalán and Ferreira-Dias. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Histomorphometric characterization of the endometrium in mules (Equus mulus): An approach to endometritis/endometrosis

Miguel A. Gutiérrez-Reinoso; Pedro M. Aponte; Manuel García-Herreros; Katlhen G. García-Bravo; Daniela Rojas; Yat Sen Wong; Fernando Saravia; Fidel Ovidio Castro; Jaime Catalán and Jordi Miró

Animal Reproduction Science

Enero 2026

doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.108056

Animal Reproduction Science 284 (2026) 108056

Contents lists available at ScienceDirect

Animal Reproduction Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/anireprosci

Histomorphometric characterization of the endometrium in mules (*Equus mulus*): An approach to endometritis/endometrosis

Miguel A. Gutiérrez-Reinoso [a,b,c], Pedro M. Aponte [d,e], Manuel García-Herreros [f,g], Katlhen G. García-Bravo [b], Daniela Rojas [h], Yat Sen Wong [c], Fernando Saravia [c], Fidel Ovidio Castro [c], Jaime Catalán [i,j,l,*], Jordi Miró [a,l,**]

[a] Equine Reproduction Service, Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Sciences, Autonomous University of Barcelona, Cerdanyola del Vallès ES-08193, Spain
[b] Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi, (UTC), Latacunga 050150, Ecuador
[c] Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción, Chillán 3780000, Chile
[d] Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA), Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito 170901, Ecuador
[e] Instituto de Investigaciones en Biomedicina "One-Health", Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Campus Cumbayá, Quito 170901, Ecuador
[f] National Institute for Agricultural and Veterinary Research (INIAV), Santarém 2005-424, Portugal
[g] CIISA-AL4Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (UL), Lisbon 1300-477, Portugal
[h] Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepcion, Chillán 3780000, Chile
[i] Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Institute of Food and Agricultural Technology, University of Girona, Girona ES-17003, Spain
[j] Unit of Cell Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Girona, Girona ES-17003, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Mulke
Biopsy
Histological characterization
Proinflammatory genes
Degenerative endometrial fibrosis

ABSTRACT

Mules (*Equus mulus*), as sterile hybrids between mares and donkeys, present a unique uterine morphology and physiology that remains poorly characterized. This study provides the first histomorphometric evaluation and transcriptional profiling of the endometrium in adult mules. To achieve this, endometrial biopsies were analysed using quantitative stereology, histological classification (Kenney–Doig system), and qPCR of key immune-related and fibrotic genes. Histometric analyses revealed that the stratum spongiosum was the predominant component of the mule endometrium (mean volume density: 84.7 %), whereas the epithelium and compact layers accounted for smaller proportions. This distribution, more pronounced than what is typically reported in mares, suggests enhanced stromal expansion or edema. Endometrial glands were abundant, and the overall structural profile exhibited an intermediate phenotype with a clear asinine bias. Most samples were classified as grades I, IIA, or IIB, with no specimens reaching grade III. Mild to moderate stromal remodeling, preserved tissue architecture, and inflammatory signatures –characterized by increased relative abundance of IL1B, IL6, and TNFα transcripts– were observed in higher grades and were consistent with early stages of endometrial degeneration. Although these features indicate early degenerative changes, the hybrid reproductive physiology of mules, including limited hormonal cyclity, may contribute to reduced progression

* Corresponding author at: Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Institute of Food and Agricultural Technology, University of Girona, Girona ES-17003, Spain.
** Corresponding author.
E-mail addresses: jaime.catalan@udg.edu (J. Catalán), jordi.miro@uab.cat (J. Miró).
[1] Joint senior authors.

https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.108056
Received 21 October 2025; Received in revised form 1 December 2025; Accepted 1 December 2025
Available online 2 December 2025
0378-4320/© 2025 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

towards fibrosis. This integrated histological–molecular assessment reinforces the diagnostic value of the Kenney–Doig system in mules and supports the adaptation of a refined IIC grade to better capture hybrid-specific features. Overall, the mule endometrium displays distinct yet comparable traits relative to that of horses and donkeys, highlighting its potential as a comparative model for equine reproductive research. These findings provide a foundation for improved clinical decision-making and future studies on hybrid fertility and uterine health.

1. Introduction

The mule, a sterile hybrid resulting from the cross between a mare (*Equus caballus*) and a donkey (*Equus asinus*), has traditionally been valued for its endurance and work capacity in equestrian, agricultural, and military activities (Davis, 2019). Although generally considered infertile, there are reports of successful pregnancies (Rong et al., 1985, 1988; Ryder et al., 1985; Henry et al., 1995), suggesting that mules' reproductive physiology may present unique characteristics (Canisso et al., 2019). This biological singularity has attracted growing scientific interest, within reproductive biotechnology, where the ability of mules to carry pregnancies to term via embryo transfer has been documented (Allen and Short, 1997; González et al., 2015; Bottrel et al., 2017; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). Together, these findings highlight the relevance of the mule as a model for studying uterine function in the context of interspecific gestation.

The endometrium, critical for reproductive efficiency through its role in embryo implantation, has been extensively characterized in mares (Klein, 2015), particularly through the histological classification proposed by Kenney and Doig (1986), which allows correlation of structural changes with fertility (Kenney and Doig, 1986; Herrera et al., 2018; Schöniger and Schoon, 2020). Likewise, the expression of molecular markers related to inflammation and tissue remodeling has been described in pathologies such as endometritis and endometrosis (Woodward and Troedsson, 2015; Elshalofy et al., 2022; Ulaangerel et al., 2025). Similar studies have also been conducted in jennies, although in a more limited scope (Miró et al., 2020; Radar-Chafirovitch et al., 2025).

While the endometrial architecture is broadly conserved among equids, each species exhibits distinct histological features that reflect functional adaptations. The donkey endometrium is anatomically similar to that of the mare in terms of layers, presenting the same basic compartments: luminal epithelium, endometrial stroma (compactum and spongiosum), endometrial glands, and underlying vascular and lymphatic vasculature. However, species-specific traits influence both physiology and pathology, including variations in immune cell distribution, basal inflammatory infiltrate, presence of eosinophils, and fibrosis patterns, which may differ from horses. In mares, endometrial alterations such as periglandular fibrosis, glandular nesting, and the progressive replacement of collagen type III by collagen type I have been well documented and correlated with decreased fertility (Miró et al., 2020). In contrast, donkeys exhibit a distinctive pattern in collagen distribution, with type III collagen persisting in the compact layer even at advanced stages of degenerative endometrial fibrosis, while simultaneously type I collagen increases in the deeper stroma and periglandular regions. In terms of immune infiltration, the scarce presence of eosinophils in mares contrasts with the prominent eosinophilic infiltration observed in the endometrium of donkeys, where it serves as a notable histological marker (Miró et al., 2020). Donkeys exhibit a relatively stable population of resident immune cells, particularly T lymphocytes, across varying stages of degenerative endometrial fibrosis, which may indicate a distinctive pattern of uterine immune regulation (Radar-Chafirovitch et al., 2025). The mule, a sterile hybrid, remains relatively understudied in scientific literature. However, preliminary evidence indicates that its endometrial structure may resemble that of the donkey more than that of the mare (Canisso et al., 2019). These observations suggest that while mules share the fundamental structural organization of the equine endometrium, their histological phenotype may be preferentially aligned with asine traits, underscoring the need for dedicated studies to confirm whether hybridization produces unique uterine patterns of uterine remodeling.

Despite this progress in mares and donkeys, the mule endometrium remains virtually unexplored (Allen, 2005; Gambini et al., 2025). To date, no published studies have detailed the histological structure or molecular marker expression in mule (*Equus mulus*). This knowledge gap is particulary relevant given the hybrid nature of the species, which may give raise to specific endometrial characteristics not fully predictable from either parent species. Studies on hybrids of other species have shown that hybridization can induce specific tissue and molecular alterations (Gabryś et al., 2021; Adavoudi and Pilot, 2022; Runemark et al., 2024), which further supports the need to study the mule endometrium using modern analytical tools.

On the other hand, to date, no studies have provided an integrated histological and molecular characterization of the mule endometrium. Comprehensive analysis combining conventional histological techniques, unbiased stereology, and messenger RNA (mRNA) transcripts analysis of genes associated with inflammation (IL-1β, IL-6, TGF-β, and TNF-α) are previously validated in mares (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Lection et al., 2024). This integrative methodology enables a robust, quantitative, and biologically meaningful evaluation of both tissue structure and functional molecular status.

The objective of this study was to characterize the histological architecture and expression of key inflammatory mediators in the mule endometrium, with an emphasis on morphometric parameters and immune-related mRNA transcripts abundance. Defining the endometrial phenotype of the mule will provide a comparative framework relative to mares and donkeys, enhance diagnostic precision, refine the clinical management of endometrial disorders in equids, and contribute to the development of reproductive biotechnologies tailored to hybrid species.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

The authors certify that this study was conducted in strict accordance with ethical principles for animal research, following the international ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), available at http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVEchecklist (accessed July 7, 2023). The experimental protocol was reviewed and approved by the Bioethics Committee for the Use of Experimental Animals at Universidad de Concepción, Chillán Campus, Chile, under approval number CBE-8269/2023, dated September 1, 2023.

As this study was conducted exclusively with animals managed under institutional care, informed consent from individual owners was not required. All mules used in this research belonged to the Riñihue Military Breeding Center, which formally authorized the use of the animals for scientific purposes under veterinary supervision and in compliance with the procedures approved by the Bioethics Committee of Universidad de Concepción (Approval Code: CBE-8269/2023). Throughout the study, animal welfare was strictly monitored, and all procedures were carried out by trained personnel to ensure humane handling and minimize stress, in accordance with current national and international regulations on animal experimentation.

2.2. Animals and biopsies

Endometrial samples were obtained from 22 mules, aged between five and ten years, all of which were in estrus at the time of sampling. The animals were housed at the Riñihue Military Breeding Center, located in the commune of Los Lagos, Valdivia Province, Los Ríos Region, Chile.

None of the mules had previously participated in reproductive programs, such as embryo recipient protocols, and had no history of pregnancy or parturition. Selection criteria included reproductive age, physiological status, and absence of clinical history of uterine pathology. Each animal underwent a gynecological examination using vaginoscopy and transrectal ultrasonography with a SonoScape X3Vet® system (SonoScape Medical Corp, Shenzhen, Guangdong, China) equipped with a 5.0 MHz linear transducer. This procedure confirmed estrus and ruled out anatomical or functional abnormalities of the reproductive tract. The mules included in the study showed a preovulatory follicle diameter higher than 35 mm, absence of corpus luteum and endometrial edema. Non-cycling females were excluded from the study. Endometrial biopsy samples were obtained from adult female mules using a standard transrectal approach, following established veterinary protocols for equine endometrial sampling. Before the procedure, animals were gently restrained in a padded chute to minimize movement and reduce stress. The perineal area was thoroughly cleaned with a povidone-iodine solution and subsequently rinsed with sterile saline to minimize the risk of contamination.

To collect the sample, a sterile equine endometrial alligator-type biopsy forceps was introduced transvaginally, while a lubricated, gloved hand was inserted into the rectum to stabilize the uterus. The forceps were then guided through the cervix into the uterine body under rectal palpation. A single tissue sample (~0.5–1.0 cm^3) was carefully collected from the beginning of a uterine horn. After retrieval, the collected sample was divided into two portions. One was immediately placed in 4 % formaldehyde for histological analysis, while the other was immersed in RNAlater® solution (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for RNA stabilization and subsequent molecular analysis.

2.3. Histology

Tissue fixation in 4 % formaldehyde was carried out for 24 h. After fixation, samples were transferred to 70 % ethanol and stored at 4 °C until histological processing at the Instituto de Biodiversidad Tropical (IBIOTROP), Laboratorio de Salud Animal, Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador. Unless noted otherwise, all reagents used in the procedures were provided by Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, St.Louis, MO, USA.).

Tissue samples underwent standard histological processing, which included sequential dehydration steps in 70 % ethanol (2 × 1 h), 95 % ethanol (1 h), and absolute ethanol (3 × 20 min), followed by clearing in xylene (3 × 5 min). The samples were then embedded in paraffin using a progressive protocol: xylene: paraffin mixtures (1:1 and 1:2) and finally pure paraffin at 58°C (2 × 1 h). Sections were cut at a thickness of 4 µm using a Leica RM2125 RTS microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Sections were stained with Harris hematoxylin. The protocol included clearing in xylene (3 × 3 min), rehydration through graded ethanol (100 % and 95 %, 2 × 1 min each), rinsing in distilled water (2 × 3 min), and staining with Harris hematoxylin for 15 s, followed by a 10-minute wash under running tap water. Sections were dehydrated using 95 % and 100 % ethanol (2 × 1 min each), followed by clearing in xylene (3 × 1 min). Finally, the slides were mounted using SecureMount™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in preparation for morphometric and stereological analysis.

2.4. Stereology

Images were captured using the digital capturing system Labscope, Zeiss (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) coupled to a light microscope Zeiss Primostar 3 (Leica mycrosystems GmbH, Wetzlar, Germany) at a total magnification of 20 × . Cross-sectional diameters or heights of the structures were measured directly from the digital images using ImageJ software (downloaded from https://imagej.net/ij/), with an average of 25 measurements per endometrial sample per animal in 22 mules.

Endometrial volume densities were estimated using a digital grid image (point test system) consisting of 48 points (8 × 6) randomly

placed as a transparent layer over the captured endometrial digital images with the software Adobe Photoshop (version 21.0.3). The number of points landing on the diferent endometrial compartments (Epithelium, Compact Layer, Spongy Layer, Glands, Lymphatic Vessels, Capillaries) was recorded for volume density estimation using the formula $V_V = P_P/P_T$, where P_P represents the number of points landing on a specific compartment or phase and P_T represents the total number of points landing on the reference space (endometrial image). Data were derived from 550 individual observations, subjected to statistical refinement, and provide a systematic histomorphological characterization of endometrial tissue in this hybrid species.

2.5. Histopathological analysis of the endometrium

Endometrial alterations were classified according to the Kenney and Doig classification (Kenney and Doig, 1986), which grades the tissue as I, IIA, IIB, or III based on glandular degeneration, periglandular fibrosis, chronic inflammatory infiltrate, and other indicators of reproductive function.

2.6. RNA extraction and cDNA synthesis

Mules' endometrial biopsies preserved in RNAlater® medium (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA.) were used for RNA extraction and cDNA synthesis. Total RNA was extracted using the Total RNA Kit (E.Z.N.A®., Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA) according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity of RNA were assessed by spectrophotometry, and RNA integrity was evaluated using the 260/280 absorbance ratio. A total of 500 ng of purified RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), following the manufacturer's instructions.

2.7. Primer design and quantitative PCR (qPCR)

Primers were designed based on *Equus caballus* gene sequences obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the AmplifX software v2.0 (INRAE, Marceille, France). Quantitative PCR was then performed using gene-specific primers (Table 1) and the Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). For normalization, the ACTB gene was used as the reference gene. Reactions were run under standard cycling conditions recommended by the manufacturer. All reactions were carried out in triplicate, and appropriate no-template controls were included to verify the absence of contamination. Relative abundance of mRNA transcripts were calculated using the comparative ΔΔCt method.

2.8. Statistical analysis

Each animal was treated as an experimental unit. To prevent pseudoreplication, repeated field and image measurements were averaged within animals before analysis. Assumptions were assessed on per-animal means using the Shapiro–Wilk test for normality and Levene's test for homogeneity of variances. Differences among Kenney–Doig grades (I, IIA, IIB) were evaluated using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD; when assumptions were violated, Welch's ANOVA or Kruskal–Wallis with Dunn–Holm post hoc correction was applied.

Volume densities (Vv,%) were modeled as proportions using a logit transformation of Vv/100, with a small epsilon added for values of 0 or 100 %. When appropriate, a beta regression with grade as a fixed effect was preferred.

The relative abundance of gene transcripts was analyzed on ΔCq values (rather than fold changes), and false discovery rate across genes was controlled using the Benjamini–Hochberg procedure. All tests were two-sided with $\alpha = 0.05$. Effect sizes are reported with 95 % confidence intervals. Analyses were performed in R (v4.x) using the stats, car, emmeans, rstatix, and betareg packages.

Table 1
Primer sequences used for quantitative PCR (qPCR) amplification of selected mule endometrial genes, designed from *Equus caballus* reference sequences (NCBI RefSeq).

Gen	Forward	Reverse	Amplicon bp	NCBI RefSeq
ACTB	GTCCCCAGCATGAAGAT	GTCCCCAGCATGAAGAT	98	NM_001081838.1
IL1B	GCCCAAAACAGATGAAGGGCAG	AAAGTTGGTGGGAGAATTGAAGC	92	NM_001082526.1
TNFA	GCCTCAGCCTCTTCTCCTTC	GGCTTGTCACTTGGGGTTC	97	NM_001081819.2
IL6	CCAAAGTCCTGGTCCAGATCC	GTGAATGCAGCTTAGCCAGC	97	NM_001082496.2
TGFB	GGAATGGCTGTCCTTTGATG	GGAATGGCTGTCCTTTGATG	91	NM_001081849.1

Primer sequences (forward and reverse), amplicon size (bp), and accession numbers are listed for each target gene. Genes: Beta-actin (ACTB), Interleukin 1 beta (IL1B), Tumor necrosis factor alpha (TNFA), Interleukin 6 (IL6), Transforming Growth factor beta (TGFB).

3. Results

3.1. Histometric characteristics of the mule endometrium

Table 2 and Fig. 1 present the results for the main morphometric variables assessed in endometrial biopsies from mules. These include epithelial height, the thicknesses of the compact and spongy layers, endometrial gland diameter, gland wall thickness, and lymphatic vessel diameter.

The descriptive statistical analysis of the volume density of histological structures in the endometrium of mules is shown in Table 3 and Fig. 2. The variables analysed include the volume density of the total endometrial space, epithelium, compact and spongy layers, lymphatic vessels, and glandular and cellular components within both the compact and spongy regions.

Attending the Kenney and Doig classification (1986) 8 mules were included in category I, 7 in category IIA and 7 in category IIB. However, no mules were included in category III. Histometric characteristics of each Kenney and Doig characteristics was analyzed. Although slight numerical variations were observed between groups, most differences were not significant ($p < 0.05$), except for the glandular area, where group IIB showed a significant reduction ($p < 0.05$) (Table 4).

On the other hand, the density volume of the basal endometrial epithelium was 3.48 ± 1.64 % in Type I, with a significant increase to 4.57 ± 1.46 % in IIA, and a significant decrease 3.51 ± 1.61 % in IIB, in the IIB group ($p < 0.05$). In the compact layer there was no variation between I and IIA, 12.06 ± 3.89 % (I), 12.55 ± 1.88 % (IIA), and a significant decrease in the group IIB, 9.84 ± 1.95 % (IIB) ($p < 0.05$). The spongy layer showed proportions of 84.46 ± 4.02 % (I), 83.75 ± 3.36 % (IIA), and 86.80 ± 2.88 % (IIB), with a higher density in IIB. The proportion of lymphatic vessels in the endometrial tissue was 3.72 ± 3.04 % in Type I, 1.54 ± 0.85 % in IIA, and 2.21 ± 1.24 % in IIB, with the lowest expression in IIA ($p < 0.05$). Glands in the compact layer were more abundant in group IIA (9.62 ± 2.12 %) than in group I (9.08 ± 3.47 %), and group IIB (8.16 ± 2.15 %), and glands in the spongy layer increased from 57.43 ± 5.71 % (I) to 59.64 ± 4.60 % (IIA) and 59.92 ± 5.66 % (IIB), with no statistical differences observed ($p > 0.05$). As for the cells in the compact layer, a decrease was observed in IIB (5.04 ± 1.47 %) compared to I (5.17 ± 1.88 %) and IIA (5.38 ± 1.08 %), and the cells in the spongy layer showed decreasing values from 25.19 ± 6.61 % (I) to 21.78 ± 3.02 % (IIA) and 17.36 ± 2.43 % (IIB) ($p < 0.05$). The significant differences between groups for the variables analysed indicate progressive remodelling of the endometrium in mules with characteristics similar to those observed in mares with different degrees of degenerative endometrial fibrosis ($p < 0.05$) (Table 5).

3.2. Abundance of proinflammatory mRNA transcripts in the mule endometrium

A significant increase in the relative abundance of of IL-1β and IL-6 mRNA transcripts was observed in group IIA and IIB compared to Type I ($p < 0.05$), with higher levels of IL-1β in IIA and IL-6 in IIB, suggesting a progressive activation of proinflammatory cytokines with the advancement of degenerative endometrial fibrosis. Likewise, TGF-β (a mediator associated with fibrosis and stromal remodelling) showed the highest relative abundance in group IIB, being significantly higher compared to the other groups. TNF-α showed a similar pattern, with a marked increase in group IIB compared to groups I and IIA, although there were no differences between the latter two ($p > 0.05$) (Fig. 3).

4. Discussion

The present study aimed to explore the structural organization of the mule endometrium using detailed histological and stereological molecular analyses. These findings provide a novel reference framework for understanding reproductive physiology in hybrid equids and for comparing their uterine features with those of mares and jennies.

Morphometric analysis confirmed a structural hierarchy of the endometrium (stratum spongiosum > stratum compactum > surface epithelium), consistent with the canonical organization described for equine uteri and with the functional predominance of the spongiosum during phases favoring uterine receptivity (Camozzato et al., 2019; Schöniger and Schoon, 2020). In our mule biopsies, the surface epithelium averaged 17.96 µm (range, 6.81–36.75 µm), which falls within the magnitudes reported for mares during estrus in histomorphometric series (Herrera et al., 2018) and within broader epithelial ranges documented in postpartum mares (Katila, 1988). The compact layer averaged 43.98 µm (SD 23.84 µm), in line with cycle-dependent modulation of stromal/epithelial compartments in mares (Camozzato et al., 2019; Morris et al., 2020). The spongiosum showed the greatest height (mean 733.73 µm; SD

Table 2
Descriptive statistical values (mean ± standard deviation [SD], range, and 25th and 75th percentiles) of the histometric characteristics of the mule endometrium; n = 550 observations (25 measurements/22 mules).

Variable	(Mean ± SD) (µm)	Range (µm)	25th Percentile (µm)	75th Percentile (µm)
Epithelial height	17.96 ± 6.06	6.81 – 36.75	12.20	22.52
Compact layer thickness	43.98 ± 23.84	11.12 – 196.18	27.04	55.07
Spongy layer thickness	733.73 ± 197.31	237.62 –1188.73	590.99	894.16
Gland diameter	33.71 ± 17.92	14.23 – 402.32	26.83	38.62
Gland wall thickness	6.17 ± 1.08	3.43 – 10.19	5.42	6.91
Lymphatic vessel diameter	25.00 ± 14.36	4.99 – 113.03	14.64	32.14

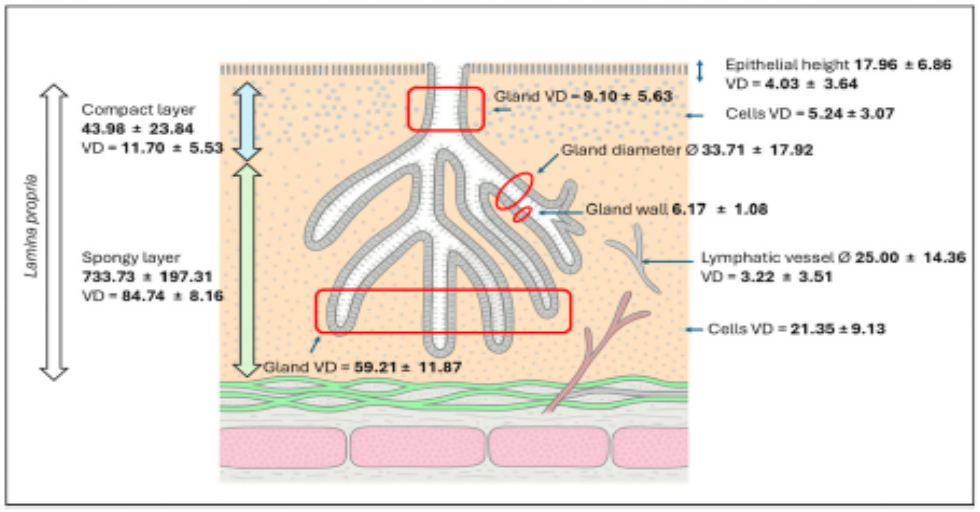


Fig. 1. Histological diagram of the mule endometrium, highlighting structural layers and key morphometric parameters. The compact and spongy layers of the lamina propria are depicted, along with endometrial glands, lymphatic vessels, and epithelial surfaces. Volume density (VD) values are expressed as percentages relative to the total volume of the endometrial biopsy, as estimated by unbiased stereology. All linear measurements are in micrometers (μm). Variability is reported as standard deviation (± SD).

Table 3
Descriptive statistical values (mean ± standard deviation [SD], range, and 25th, 50th, and 75th percentiles) for volume density (VD) measurements of various histological structures within the endometrium of mules; n = 1056 points of study (48/22 mules).

Variable	Replicates per sample	(Mean ± SD)	Range	25 %	50 %	75 %
Total Endometrium VD	110.00	100.0 ± 0.00	100.00 – 100.00	100.00	100.00	100.00
Epithelial VD	110.00	4.03 ± 3.64	0.03 – 17.65	0.01	3.71	5.88
Compact VD	110.00	11.70 ± 5.53	0.01 – 35.29	8.00	10.71	14.29
Spongy VD	110.00	84.74 ± 8.16	58.82 – 129.17	80.00	85.71	89.29
Lymphatic vessels VD	110.00	2.22 ± 3.51	0.01 – 25.81	0.01	0.01	3.67
Compact glands VD	110.00	9.10 ± 5.63	0.01 – 32.01	5.76	8.33	11.94
Spongy glands VD	110.00	59.21 ± 11.87	28.02 – 86.21	50.00	59.26	66.67
Compact cells VD	110.00	5.24 ± 3.07	0.01 – 16.01	3.45	5.01	6.91
Spongy cells VD	110.00	21.35 ± 9.13	7.41 – 60.23	15.00	20.00	24.14

Values are expressed as percentages (%) relative to the total endometrial volume.

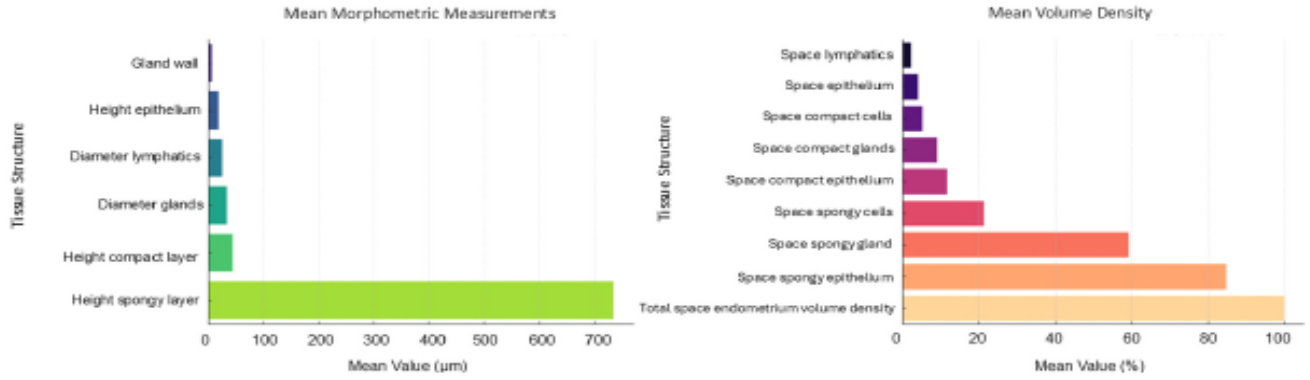


Fig. 2. Mean morphometric and volume density of mule endometrial components. Average height values (μm) of the three main structural layers of the mule endometrium: superficial epithelium, compact layer, and spongy layer, as well as the glandular diameter, glandular wall diameter, and lymphatic vessels.

197.31 μm), compatible with the well-known cyclic expansion of stromal/glandular components around the peri-luteal window (Camozzato et al., 2019; Caballeros et al., 2019).

For jennies, current high-quality studies emphasize species-specific histopathological and immunological traits (e.g., collagen

Table 4
Morphometric comparison of mule endometrium by kenney and doig.

Variable	Kenney and Doig			
	I (n = 8) (Mean ± SD)	IIA (n = 7) (Mean ± SD)	IIB (n = 7) (Mean ± SD)	III (Mean ± SD)
Epithelial layer height (μm)	28.51 ± 3.23[a]	27.91 ± 3.10[a]	26.70 ± 2.86[a]	———
Compact layer height (μm)	55.13 ± 4.51[a]	52.82 ± 5.06[a]	51.31 ± 4.93[a]	———
Spongy layer height (μm)	89.21 ± 6.36[a]	87.54 ± 6.84[a]	85.43 ± 7.22[a]	———
Total endometrial height (μm)	172.86 ± 9.58[a]	168.21 ± 10.26[a]	163.47 ± 11.16[a]	———
Gland diameter (μm)	34.72 ± 2.71[a]	33.65 ± 3.11[a]	31.91 ± 3.24[a]	———
Gland area (μm²)	922.11 ± 100.46[a]	899.47 ± 95.62[a]	837.33 ± 92.51[b]	———
Number of glands per field	12.34 ± 1.21[a]	11.81 ± 1.31[a]	11.20 ± 1.46[a]	———
Lumen diameter (μm)	15.96 ± 1.43[a]	15.12 ± 1.57[a]	14.71 ± 1.68[a]	———
Lumen area (μm²)	201.22 ± 30.36[a]	198.78 ± 28.92[a]	190.60 ± 27.53[a]	———

Values represent the mean ± standard deviation (SD) for each histological group. Group I corresponds to endometria without pathological changes; Groups IIA and IIB represent mild and moderate histological changes, respectively; and Group III (severe periglandular fibrosis and glandular degeneration) was not present. Different superscript letters (a) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

Table 5
Percentage of endometrial structure density volume in mules according to Kenney and Doig classification.

Kenney and Doig classification	Epithelial (%)	Compact Epithelial (%)	Spongious Epithelial (%)	Lymphatic Vessels (%)	Compact Glands (%)	Spongious Glands (%)	Compact Cells (%)	Spongious Cells (%)
I (n = 8)	3.48 ± 1.64[a]	12.06 ± 3.89[a]	84.46 ± 4.02[a]	3.72 ± 3.04[a]	9.08 ± 3.47[a]	57.43 ± 5.71[a]	5.17 ± 1.88[a]	25.19 ± 6.61[a]
IIA (n = 7)	4.57 ± 1.46[b]	12.55 ± 1.88[a]	83.75 ± 3.36[a]	1.54 ± 0.85[b]	9.62 ± 2.12[a]	59.64 ± 4.60[a]	5.38 ± 1.08[a]	21.78 ± 3.02[b]
IIB (n = 7)	3.51 ± 1.61[a]	9.84 ± 1.95[b]	86.80 ± 2.88[b]	2.21 ± 1.24[c]	8.16 ± 2.15[a]	59.92 ± 5.66[a]	5.04 ± 1.47[a]	17.36 ± 2.43[c]
III	-	-	-	-	-	-	-	-

Endometrial density volume (%); Kenney and Doig endometrium classification, I: normal endometrium; IIA: Acute inflammation; IIB: Moderate-chronic inflammation; III: Degenerative endometrial fibrosis values are shown as Mean ± standard deviation (%). Different letters within the same column indicate significant differences between Kenney and Doig classification groups ($p < 0.05$). Lowercase letters denote specific multiple comparisons between groups.

patterning and eosinophilic infiltration; resident T-cell predominance) rather than precise epithelial height benchmarks, supporting a shared horse–donkey endometrial physiology with distinct immuno-stromal nuances (Miró et al., 2020; Radar-Chafirovitch et al., 2025).

The stroma (surface epithelium 4.03 %, stratum compactum ≈11.7 %, and stratum spongiosum 84.74 %) accounted for the majority of endometrial volume in mules, a distribution consistent with the layered organization and functional dominance of the spongy stratum reported for the equine endometrium (Lefranc and Allen, 2007; Hanada et al., 2012; Schöniger and Schoon, 2020). This pattern aligns with quantitative studies in mares, which show high gland concentration and the functional relevance of the stratum spongiosum, as well as with morphologic reviews detailing the stromal–glandular interdependence during the cycle (Lefranc and Allen, 2007).

In donkeys, comparative pathology points to species-specific features (e.g., eosinophil-rich infiltrates and distinct collagen patterns) and to immune-cell distributions that differ from mares, supporting cautious inter-species comparisons (Miró et al., 2020). In our series, glandular density was clearly higher in the spongy than in the compact stratum (59.21 % vs. 9.10 %), in line with studies that localized greater glandular surface density within the stratum spongiosum of mares. Lymphatic structures showed low but heterogeneous volume fractions (2.22 %, SD 3.51 %); while direct morphometric diameter benchmarks in equids are scarce, functional and lesion-oriented evidence indicates that uterine lymphatics contribute to clearance and may form lacunae in degenerative settings (LeBlanc et al., 1995). Finally, glandular dimensions in mules (diameter 33.71 ± 17.92 μm; wall 6.17 ± 1.08 μm) fall within ranges reported by quantitative histology in mares, supporting preservation of a secretory architecture compatible with a physiologically active endometrium (Herrera et al., 2018).

Mule endometrial biopsies, classified according to the Kenney and Doig system (Grades I, IIA, IIB), predominantly exhibited mild to moderate, organized tissue remodeling, consistent with early stages of degenerative endometrial fibrosis but without evidence of architectural collapse. This reading is consistent with the histopathological definition and prognostic scope of the Kenney–Doig system and its updates in mares (Westendorf et al., 2021). This structural stability may reflect the unique reproductive physiology of hybrids, characterized by limited gonadal function and the absence of regular estrous cycles, which likely reduces exposure to cyclical hormonal fluctuations. It should be noted: many female mules are acyclic or show irregular cyclicity, but there are also reports of cyclical mules and pregnancies after embryo transfer; therefore, the lower "average" exposure to complete cycles is plausible but not universal (Camillo et al., 2003). Previous studies in equines have suggested a lower susceptibility to progressive fibrosis under certain

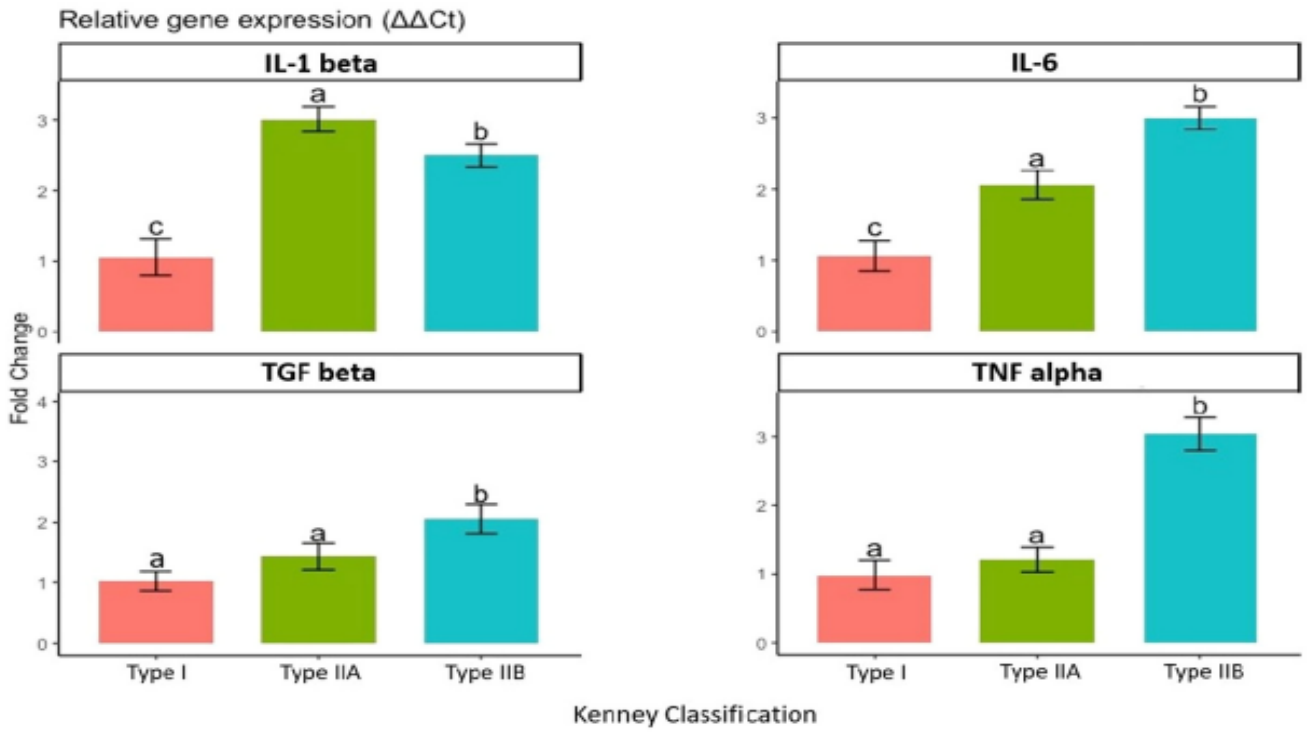


Fig. 3. Relative abundance of mRNA of proinflammatory gene transcripts in the mule endometrium classified according to Kenney and Doig classification (Types I, IIA, and IIB). Type III was not represented in the samples analysed. The genes analysed by real-time PCR were IL-1β, IL-6, TGF-β, and TNF-α. Results are shown as relative fold change (ΔΔCt) compared to the Type I group. Bars indicate the Standard Deviation of the Mean (SD). Different letters above the columns indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

physiological conditions (Katila and Ferreira-Dias, 2022).

The age of the mules included in the study may also have influenced the results obtained. The study used mules aged between five and ten years, but no aged animals were included. The association between endometriosis severity (including category III) and age/infertility/repeated reproductive stimuli is well documented in mares, supporting the idea that progression can be attenuated with lower cumulative exposure (Lehmann et al., 2011). However, given the sterility, age range, and genetic heterogeneity of mules, these observations warrant further validation through direct comparisons with data from mares and donkeys. On the other hand, as explained before, preliminary evidence indicates that the mule endometrial structure may resemble that of the donkey more than that of the mare (Canisso et al., 2019). The donkey endometrium also appears to progress more slowly toward fibrosis and to maintain fertility into more advanced ages (Miró et al., 2020). Recent literature specifically underscores the need for comparative and donkey- and mule-specific frameworks (uterine physiology and immunology), supporting the call for direct cross-species validation.

In contrast, the mule uterus is functional as a gestational recipient for embryo transfer (Davies et al., 1985), consistent with a non-terminal remodeling profile. The uterine function of the mule as a recipient has been demonstrated with equine embryos and also with donkey embryos in non-cycling hormonally treated mules. Furthermore, hybrid immune phenotypes could modulate chronic inflammation/fibrosis (Ferreira-Dias et al., 2024). In equines, recent reviews report that immune pathways (e.g., NF-κB; proinflammatory cytokines) modulate endometrial fibrosis. In donkeys, the endometrial immune population has been mapped, supporting species-specific differences that could be transferred to hybrids. We propose considering an IIC subcategory within IIB to describe moderate fibrous remodeling without collapse. The lack of marked changes even in IIB and the increase in glands in the spongy layer, along with reductions in the stratum compactum, lymphatics, spongy layer, and epithelium, support this hypothesis.

Transcriptional profiling revealed immune activation at intermediate stages, with IL-1β and IL-6 mRNA transcripts relative abundance increasing in grades IIA and IIB. This is consistent with the activation of these mediators during endometritis-induced inflammation in mares—with early increases in IL-1β, IL-6, and TNF-α—and with transcriptional modulation depending on the type and chronicity of inflammation (Christoffersen et al., 2012). This pattern aligns with their pivotal role as mediators between physiological function and chronic inflammation/remodeling in mares, as summarized in mechanistic reviews on PBIE and the transition to degenerative processes (Morris et al., 2020), and with their reported overexpression during degenerative processes in donkeys. In jennets, direct evidence on IL-1β/IL-6 is still limited. However, differential immunologic and histopathologic features (e.g., eosinophil infiltrates, collagen remodeling) and a resident immune cell landscape dominated by T lymphocytes, compatible with a sustained tissue inflammatory response, have been described (Miró et al., 2020). Relative abundance of TNF-α transcript was elevated in Grade IIB, a finding associated with decreased endometrial receptivity and glandular-stromal alterations previously described in mares (association between uterine inflammation, cytokines, and decreased receptivity/chronic endometrosis) (Morris et al., 2020).

The sustained increase in TGF-β in IIB is compatible with profibrotic remodeling and collagen deposition—TGF-β1 induces myofibroblast differentiation and COL1/COL3 synthesis in equine endometrium; furthermore, TGF-β1 has been correlated with endometrial fibrosis (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019). The absence of Grade III in our cohort underscores a pathophysiological trajectory distinct from that observed in mares exposed to prolonged reproductive insults and is consistent with the classic progression described by Kenney–Doig/Schoon toward advanced fibrosis in older mares or mares with a prolonged reproductive history (Schöniger and Schoon, 2020), and suggests that, in mules, inflammation does not progress to terminal fibrosis. From a comparative physiology perspective, natural sterility and less exposure to full cycles could buffer the progression to terminal lesions (Schöniger and Schoon, 2020). Gestational viability after embryo transfer without placental dysfunction in mules has been documented in controlled studies and successful cases, supporting an intermediate but functional histomolecular phenotype (Camargo et al., 2020). Equine endometrial transcriptomics and recent embryo-endometrium interaction studies provide frameworks and methodologies to validate biomarkers (Weber et al., 2021) to assess the prognostic relevance of inflammatory (IL-6, IL-1β, TGF-β1, TNF-α) and fibrotic (COL1A1, COL3A1) markers. (functional tests of TGF-β1→COL1/COL3 and profibrotic pathways in equine endometrium) (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019). This approach could help refine diagnostic systems to better accommodate the unique physiology of hybrids. Prior studies in mares and donkeys (Rebordão et al., 2014; Centeno et al., 2024; Gambini et al., 2025) support the potential utility of these biomarkers in equine endometrial pathology. Applying the Kenney–Doig classification to mules offers a useful framework for prognostic assessment and clinical decision-making; However, its validation and potential adaptation require correlation between histopathological and molecular findings with current conception and gestation outcomes in this hybrid species. (Kenney–Doig reliability and variability; need to validate against outcomes) (Westendorf et al., 2021).

Collectively, these data provide a robust anatomical reference to define physiological standards relevant to infertility work-ups, hormonal therapies, and embryo-transfer protocols across equids (Schöniger and Schoon, 2020).

5. Conclusions

This study presents the first quantitative morphometric and molecular characterization of the mule endometrium, revealing a distinct, intermediate phenotype that leans toward asinine features while retaining equine traits. Several structural metrics align with values reported in both mares and jennies, underscoring the hybrid's unique uterine architecture. We identified consistent histomorphometric patterns and mRNA transcriptional profiles indicative of mild to moderate degenerative endometrial fibrosis, supporting the value of integrating histological and molecular assessments in the reproductive evaluation of mules. Our findings suggest that the Kenney–Doig classification system, originally developed for mares, can be adapted for hybrid use (with a proposed refinement of the IIC category) to better reflect hybrid-specific endometrial changes. Altogether, this work establishes a foundational framework for future studies on mule reproductive physiology and positions the mule as a valuable comparative model in equine reproductive pathology and hybrid reproductive management.

CRediT authorship contribution statement

Daniela Rojas: Methodology, Investigation. **Yat Sen Wong:** Investigation, Data curation. **Fernando Saravia:** Resources, Methodology, Funding acquisition. **Fidel Ovidio Castro:** Resources, Methodology, Data curation. **Jaime Catalán:** Writing – review & editing, Supervision, Resources. **Miro Jordi:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Conceptualization. **Miguel A. Gutiérrez-Reinoso:** Writing – original draft, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Pedro M. Aponte:** Methodology, Investigation, Conceptualization. **Manuel García-Herreros:** Investigation. **Katlhen G. García-Bravo:** Methodology, Investigation.

Institutional Review Board Statement

The authors declare that this study was conducted in strict accordance with ethical principles for animal research, following the international ARRIVE guidelines (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), available at http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVEchecklist (accessed July 7, 2023). The experimental protocol was reviewed and approved by the Bioethics Committee for the Use of Experimental Animals at the Universidad de Concepción, Chillán Campus, Chile, under approval number CBE-8269/2023, dated September 1, 2023.

Funding sources

This research was partially funded by the Equine Reproduction Service, Universitat Autònoma Barcelona (Spain), DIRGI-CP2021-005/Universidad Técnica de Cotopaxi (Ecuador), Instituto de Investigaciones en Biomedicina "One-Health", Universidad San Francisco de Quito (Ecuador), y el Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción (Chile). J.C. was funded by the Ministry of Science, Innovation and Universities, Spain (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) and the European Union NextGenerationEU/PRTR (Juan de la Cierva Scheme: JDC2022-049684-I).

Declaration of Competing Interest

The authors of the manuscript entitled "Histomorphometric Characterization of the Endometrium in Mules (*Equus mulus*): an

approach to endometritis/endometriosis" declare that they have no conlicts of interest.

Acknowledgments

We would like to acknowledge the efforts of all individuals and laboratories involved in the execution of this research.

Data Availability

Raw data supporting the findings of this study are available from the corresponding author on request.

References

Adavoudi, R., Pilot, M., 2022. Consequences of hybridization in mammals: a systematic review. Genes 13, 50. https://doi.org/10.3390/genes13010050.
Allen, W.R., 2005. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. Reprod. Domest. Anim. 40, 310–329. https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2005.00602.X.
Allen, W.R., Short, R.V., 1997. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. J. Hered. 88, 384–392. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023123.
Bottrel, M., Portes, T., Ortiz, I., Hidalgo, M., Dorado, J., 2017. Establishment and maintenance of donkey-in-mule pregnancy after embryo transfer in a non-cycling mule treated with oestradiol benzoate and long-acting progesterone. Span. J. Agric. Res. 15, e04SC01. https://doi.org/10.5424/sjar/2017154-11653.
Caballeros, J.E., Camacho, C., Cazales, N., Estradé, M.J., Piala-Rechsteiner, S., Jobim, M.I.M., Mattos, R.C., 2019. Ultrastructural and histological characteristics of the equine endometrium at day 5 post ovulation. Theriogenology 132, 106–112. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.04.006.
Camargo, C.E., Rechsteiner, S.P., Macan, R.C., Kozicki, L.E., Gastal, M.O., Gastal, E.L., 2020. The mule (Equus mulus) as a recipient of horse (Equus caballus) embryos: comparative aspects of early pregnancy with mares: the mule as a recipient of horse embryos. Theriogenology 145, 217–225. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.029.
Camillo, F., Vannozzi, I., Rota, A., Di Luzio, B., Romagnoli, S., Aria, G., Allen, W.R., 2003. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. Reprod. Domest. Anim. 38, 380–385. https://doi.org/10.1046/J.1439-0531.2003.00444.X.
Camozzato, G.C., Martinez, M.N., Bastos, H.B.A., Piala-Rechsteiner, S., Meikle, A., Jobim, M.I.M., Gregory, R.M., Mattos, R.C., 2019. Ultrastructural and histological characteristics of the endometrium during early embryo development in mares. Theriogenology 123, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.018.
Canisso, I.F., Panzani, D., Miró, J., Ellerbrock, R.E., 2019. Key aspects of donkey and mule reproduction. Vet. Clin. North Am. Equine Pr. 35, 607–642. https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.014.
Centeno, L.A.M., Bastos, H.B.A., Bueno, V.L.C., Trentin, J.M., Fiorenza, M.F., Panziera, W., Winter, G.H.Z., Kretzmann, N.A., Piala-Rechsteiner, S., Mattos, R.C., Rubin, M.I.B., 2024. Collagen and collagenases in mare's endometrium with endometrosis. Theriogenology 230, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.08.031.
Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A.M., Jacobsen, S., Petersen, M.R., Troedsson, M.H.T., Lehn-Jensen, H., 2012. Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. BMC Vet. Res. 8, 41. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-41.
Davies, C.J., Antczak, D.F., Allen, W.R., 1985. Reproduction in mules: embryo transfer using sterile recipients. Equine Vet. J. 17, 63–67. https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1985.tb04595.x.
Davis, E., 2019. Donkey and mule welfare. Vet. Clin. North Am. Equine Pr. 35, 481–491. https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.005.
Elshafoy, A., Wagener, K., Weber, K., Blanco, M., Bauersachs, S., Bollwein, H., 2022. Identification of genes associated with susceptibility to persistent breeding-induced endometritis by RNA-sequencing of uterine cytobrush samples. Reprod. Biol. 22, 100577. https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100577.
Fanelli, D., Losinno, L., Castañeira, C., Alonso, C., Bragulat, A., Panzani, D., Bocci, C., Degl'Innocenti, A., Moroni, R., Camillo, F., Wilsher, S., (Twink) Allen, W., 2022. First report of mule-in-mule pregnancies with live births following embryo transfer. J. Equine Vet. Sci. 113, 103999. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103999.
Ferreira-Dias, G.M., Alpoim-Moreira, J., Szóstek-Mioduchowska, A., Rebordão, M.R., Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G.M., Alpoim-Moreira, J., Szóstek-Mioduchowska, A., Rebordão, M.R., Skarzynski, D.J., 2024. The path to fertility: current approaches to mare endometritis and endometrosis. Anim. Reprod. 21, e20240070. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0070.
Gabryś, J., Kij, B., Kochan, J., Bugno-Poniewierska, M., 2021. Interspecific hybrids of animals in nature, breeding and science - a review. Ann. Anim. Sci. 21, 403–415. https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0082.
Gambini, A., Smith, J.M., Gurkin, R.J., Palacios, P.D., 2025. Current and emerging advanced techniques for breeding donkeys and mules. Animals 15, 990. https://doi.org/10.3390/ani15070990.
González, S.M., Gomes, R.G., Souza, A.K., Silva, C.B., Silva-Santos, K.C., Seneda, M.M., 2015. Evidences of regular estrous cycles in mules and successful use of these animals as recipients for donkey embryos. J. Equine Vet. Sci. 35, 869–872. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.07.010.
Hanada, M., Maeda, Y., Oikawa, M.A., 2012. Equine endometrial gland density and endometrial thickness vary among sampling sites in thoroughbred mares. J. Equine Sci. 23, 35–40. https://doi.org/10.1294/jes.23.35.
Henry, M., Gastal, E.L., Pinheiro, L.E.L., Guimarães, S.E.F., 1995. Mating pattern and chromosome analysis of a mule and her offspring. Biol. Reprod. 52, 273–279. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.273.
Herrera, M., Herrera, J.M., Cantatore, S., Aguilar, J., Pelipe, A., Fumuso, E., 2018. Comparative histomorphological study of endometrium in mares. Anat. Histol. Embryol. 47, 153–158. https://doi.org/10.1111/ahe.12335.
Katila, T., 1988. Histology of the post partum equine uterus as determined by endometrial biopsies. Acta Vet. Scand. 29, 173–180. https://doi.org/10.1186/BF03548368.
Katila, T., Ferreira-Dias, G., 2022. Evolution of the concepts of endometrosis, post breeding endometritis, and susceptibility of mares. Animals 12, 779. https://doi.org/10.3390/ani12060779.
Kenney, R.M., Doig, P.A., 1986. Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D.A. (Ed.), Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Co, Philadelphia, pp. 723–729.
Klein, C., 2015. Pregnancy Recognition and Implantation of the Conceptus in the Mare. Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol. 216, 165–188. https://doi.org/10.1007/978-3-319-15856-3_9.
LeBlanc, M.M., Johnson, R.D., Calderwood Mays, M.B., Valderrama, C., 1995. Lymphatic clearance of india ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. Biol. Reprod. 52, 501–506. https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.501.
Lection, J., Wagner, B., Byron, M., Miller, A., Rollins, A., Chenier, T., Cheong, S.H., Diel de Amorim, M., 2024. Inflammatory markers for differentiation of endometritis in the mare. Equine Vet. J. 56, 678–687. https://doi.org/10.1111/evj.14058.
Lefranc, A.C., Allen, W.R., 2007. Influence of breed and oestrous cycle on endometrial gland surface density in the mare. Equine Vet. J. 39, 506–510. https://doi.org/10.2746/042516407X235812.
Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F.W., Klug, J., Allen, W.R., Sieme, H., Schoon, H.A., 2011. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. Theriogenology 76, 1326–1336. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.001.
Miró, J., Gutiérrez-Reinoso, M., Silva, J.A., da, Fernandez, C., Rebordão, M.R., Alexandre-Pires, G., Catalán, J., Ferreira-Dias, G., 2020. Collagen and eosinophils in Jenny's endometrium: do they differ with endometrial classification. Front. Vet. Sci. 7, 558096. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00631.

Morris, L.H.A., McCue, P.M., Aurich, C., 2020. Equine endometritis: a review of challenges and new approaches. Reproduction 160, R95–R110. https://doi.org/10.1530/REP-19-0478.
Radar-Chafirovitch, A., Quaresma, M., Yánez-Ortiz, I., Leiva, B., Ferreira-Dias, G., Payan-Carreira, R., Miro, J., Pires, M. dos A., 2025. Donkey endometrium: characterization of resident immune cells. Res. Vet. Sci. 184, 105516. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105516.
Rebordão, M.R., Galvão, A., Szóstek, A., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G., 2014. Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. Reprod. Domest. Anim. 49, 82–87. https://doi.org/10.1111/rda.12397.
Rong, R., Chandley, A.C., Song, J., McBeath, S., Tan, P.P., Bai, Q., Speed, R.M., 1988. A fertile mule and hinny in China. Cytogenet. Cell Genet. 47, 134–139. https://doi.org/10.1159/000132531.
Rong, R.H., Cai, H.D., Yang, X.Q., Wei, J., 1985. Fertile mule in China and her unusual foal. J. R. Soc. Med. 78, 821–825. https://doi.org/10.1177/014107688507801006.
Runemark, A., Moore, E.C., Larson, E.L., 2024. Hybridization and gene expression: Beyond differentially expressed genes. Mol. Ecol. 34, e17303. https://doi.org/10.1111/mec.17303.
Ryder, O.A., Chemnick, L.G., Bowling, A.T., Benirschke, K., 1985. Male mule foal qualifies as the offspring of a female mule and jack donkey. J. Hered. 76, 379–381.
Schöniger, S., Schoon, H.A., 2020. The healthy and diseased equine endometrium: a review of morphological features and molecular analyses. Animals 10, 625. https://doi.org/10.3390/ani10040625.
Szóstek-Mioduchowska, A.Z., Baclawska, A., Okuda, K., Skarzynski, D.J., 2019. Effect of proinflammatory cytokines on endometrial collagen and metallopeptidase expression during the course of equine endometrosis. Cytokine 123, 154767. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154767.
Ulaangerel, T., Mu, S., Sodyelalt, J., Yi, M., Zhao, B., Hao, A., Wen, X., Han, B., Bou, G., 2025. Transcriptome analysis reveals equine endometrium's gene expression profile around embryo fixation. Genes 16, 181. https://doi.org/10.3390/genes16020181/S1.
Weber, K.S., Wagener, K., Blanco, M., Bauerfeind, S., Bollwein, H., 2021. A comparative analysis of the intrauterine transcriptome in fertile and subfertile mares using cytobrush sampling. BMC Genom. 22, 377. https://doi.org/10.1186/S12864-021-07701-3.
Westendorf, J., Wobeser, B., Epp, T., 2021. IIB or not IIB, part 1: retrospective evaluation of Kenney–Doig categorization of equine endometrial biopsies at a veterinary diagnostic laboratory and comparison with published reports. J. Vet. Diagn. Invest. 34, 206–214. https://doi.org/10.1177/10406387211062207.
Woodward, E.M., Troedsson, M.H.T., 2015. Inflammatory mechanisms of endometritis. Equine Vet. J. 47, 384–389. https://doi.org/10.1111/evj.12403.

Histopathological, Immunohistochemical, and Molecular Characterization of Endometrial Remodeling in Mules (Equus mulus) Compared with Mares (Equus caballus)

Miguel A. Gutiérrez-Reinoso; Pedro M. Aponte; Manuel García-Herreros; Katlhen G. García-Bravo; Daniela Rojas; Yat Sen Wong; Fernando Saravia; Fidel Ovidio Castro; Iris Martinez; Jordi Miró and Jaime Catalán

Revista

Año publicación

Doi:

Title

Histopathological, Immunohistochemical, and Molecular Characterization of Endometrial Remodeling in Mules (*Equus mulus*) Compared with Mares (*Equus caballus*)

Authors

Miguel A. Gutiérrez-Reinoso[a,b,c], Pedro M. Aponte[d,e], Manuel García-Herreros[f,g], Katlhen G. García-Bravo[b], Daniela Rojas[h], Yat Sen Wong[c], Fernando Saravia[c] , Fidel Ovidio Castro[c], Jordi Miró[a,#,*] and Jaime Catalán[i,j,#,*]

Affiliations

[a]Equine Reproduction Service, Department of Animal Medicine and Surgery, Faculty of Veterinary Sciences, Autonomous University of Barcelona, Cerdanyola del Vallès ES-08193, Spain.

[b]Carrera de Medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Universidad Técnica de Cotopaxi, (UTC), Latacunga, 050150, Ecuador

[c]Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción, Chillán, 3780000, Chile.

[d]Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA), Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito 170901, Ecuador.

[e]Instituto de Investigaciones en Biomedicina "One-Health", Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Campus Cumbayá, Quito 170901, Ecuador.

[f]National Institute for Agricultural and Veterinary Research (INIAV), Santarém, 2005-424, Portugal

[g]CIISA-AL4AnimalS, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon (UL), Lisbon, 1300-477, Portugal.

[h]Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción, Chillán, 3780000, Chile.

[i]Biotechnology of Animal and Human Reproduction (TechnoSperm), Institute of Food and Agricultural Technology, University of Girona, ES-17003 Girona, Spain.

[j]Unit of Cell Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Girona, ES-17003 Girona, Spain.

[#] **Joint senior authors**

*** Corresponding authors:** jordi.miro@uab.cat; jaime.catalan@udg.edu

Abstract

Endometrial biopsy is the reference method to assess uterine health and reproductive prognosis in equids. Its interpretation relies mostly on mares data, with limited information available for hybrid species such as mules (*Equus mulus*). This study aimed to characterize endometrial remodeling in mules using an integrated diagnostic approach combining histopathology, immunohistochemistry, gene expression analysis, and second-harmonic generation (SHG) microscopy. Results obtained were compared with mares and jennies. Endometrial biopsies from 22 adult mules and 22 mares in estrus were graded by the Kenney–Doig classification. Tissue architecture, inflammatory infiltrates, and fibrosis were assessed with hematoxylin–eosin staining. Vimentin, cytokeratin, and steroid receptors were evaluated using immunohistochemistry and immunofluorescence. Stereological analysis estimated the volume density of epithelial and stromal markers. Collagen structre was examined with SHG microscopy, while of pro-inflammatory and pro-fibrotic gene transcripts (*IL1β*, *IL6*, *TNFα*, *TGFβ*) were detected by real-time PCR. Mule endometrium did not reach severe fibrotic stages (category-III). Compared with mares, mules showed reduced fibroblast activation, preserved epithelial integrity, stable steroid receptor transcription, low collagen deposition, and less inflammatory and fibrogenic gene transcription. SHG imaging revealed early, heterogeneous collagen remodeling in intermediate categories, suggesting delayed or reversible fibrosis. These findings demonstrate that mule endometrium follows a distinct structural and molecular remodeling. Thus, the mule represents a valuable comparative model for uterine resilience and fibrotic regulation in equids and related species.

Keywords: Endometrial biopsy; Mule; Endometrosis; Immunohistochemistry; Second harmonic generation; Fibrosis; Equids.

1. Introduction

Equine endometrosis is a severe, progressive, and irreversible disorder that represents a major cause subfertility and infertility in mares, significantly impacting the equine breeding industry (Rojas et al., 2020). Its dynamic pathological nature, occurring in active or inactive forms and involving glandular or stromal compartments, makes diagnosis dependent on the size, distribution, and number of fibrotic foci identified in endometrial biopsy samples (Hoffmann et al., 2009). This complexity underscores the need for refined diagnostic approaches capable of detecting both structural and functional alterations within the endometrium.

Building upon these complexities, in mares, the alterations have been extensively documented and systematised by the widely accepted Kenney and Doig classification, which stratifies endometrial fibrosis by severity and prognostic relevance (Kenney and Doig, 1986). Beyond conventional histopathology, the incorporation of complementary markers has improved diagnostic resolution. Cytoskeletal and mesenchymal markers such as vimentin, actin, and α-smooth muscle actin have been proposed as predictors of fibrotic activity (Rojas et al., 2020). In contrast, extracellular matrix components and epithelial markers, including collagen and cytokeratins, have been used to assess tissue damage and structural integrity (Centeno et al., 2024). Moreover, the presence, composition, and functional role of inflammatory infiltrates are critical determinants in the pathogenesis and progression of endometrial disease (Grimm et al., 2017; Schöniger and Schoon, 2020).

Histological evaluation of paraffin-embedded endometrial biopsies enables detailed characterization of disease progression. Morphological features include glandular proliferation with the formation of glandular nests. As the pathology advances, these nests become surrounded by concentric layers of fibrous tissue rich in fibroblasts at various stages of differentiation. This

pattern indicates ongoing fibrogenesis and active stromal remodeling (Buczkowska et al., 2014). Together, these histopathological alterations underlie impaired endometrial receptivity and reduced reproductive performance.

Similar histopathological and immunological features to those observed in mares are described in jennies (*Equus asinus*), highlighting conserved endometrial architecture is conserved among equids but also species-specific differences, such as collagen distribution, immune cell populations, and the progression of fibrotic remodeling (Miró et al., 2020). In particular, the persistence of type III collagen in advanced stages of fibrosis and the prominent eosinophilic and resident immune infiltrates indicates distinct endometrial inflammation and repair compared with mares (Miró et al., 2020). These findings emphasize the need for species-adapted diagnostic frameworks for endometrial pathology within the *Equidae*.

Despite advances in mares and the emerging data in jennies, little is known about endometrial pathology in mules (*Equus mulus*), a sterile hybrid from crossing a mare (*Equus caballus*) and a donkey (*Equus asinus*). Mules have recently attracted attention due to their unique biological characteristics and reproductive challenges (Canisso et al., 2019). They are traditionally considered infertile, but reports of successful pregnancies suggest that mules may have intermediate or hybrid-specific reproductive traits (Rong et al., 1988).

In addition, mules as embryo recipients represent a significant milestone in reproductive biotechnology. Studies show that mules can successfully maintain pregnancy after embryo transfer in both cycling and hormonally treated non-cycling females (Allen and Short, 1997; González et al., 2015; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). These findings broaden applications of assisted reproductive technologies and establish the mule as a model for uterine function during in interspecific gestation. Histological and molecular characterization of the mule endometrium

offers a valuable approach to undertsading how hybridization influences uterine structure and function (Gutiérrez-Reinoso et al., 2026).

Histological, immunohistochemical, and molecular markers have improved diagnosis and allowed evidence-based clinical decision-making regarding prognosis and therapeutic strategies in mares (Rojas et al., 2020). However, information on the occurrence, progression, and diagnostic characterization of endometrial disorders in other members of the family *Equidae* remains limited, particularly in species of major functional and biological relevance such as mules.

Comparative observations from mares show partial correlation with the endometrial structures identified in mules, thereby facilitating species-specific strategies for managing reproductive health in mules. Application of diagnostic markers validated in mares would enable assessment of endometrial damage and function in mules. The present study contributes to this emerging field by integrating molecular and immunohistochemical analyses to deliver a comprehensive evaluation of endometrial quality in mules.

2. Materials and Methods

2.1 Animal ethics statement and animal welfare

This study was conducted in strict accordance with ethical principles for animal research and met the international ARRIVE guidelines (http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVEchecklist, accessed July 7, 2023). The experimental protocol was reviewed and approved by the Bioethics Committee for the Use of Experimental Animals of the University of Concepción, Chillán Campus, Chile, under approval number CBE-8269/2023 (September 1, 2023).

The animals used were institutionally managed. Informed consent from individual owners was not required. All mules belonged to Criadero Militar Riñihue, which formally authorised their

125 participation under veterinary supervision and in adherence to the procedures approved by the
126 Bioethics Committee of the University of Concepción (Code: CBE-8269/2023).
127 Animal welfare standards was upheld at all stages, and invasive procedures minimised, in
128 accordance with national and international regulations.
129 ***2.2 Animals and reproductive evaluation***
130 Endometrial samples came from 22 adult mules (*Equus mulus*, 5–12 years old) and 22
131 Chilean Purebred mares (*Equus caballus*, 8–12 years old), all in estrus. Each mare had at least one
132 previous gestation. None of the mules used had a history of pregnancy or parturition, or had
133 previously participated in reproductive programs, including embryo recipient protocols, and non-
134 cycling mules were excluded. The animals were housed at the Centro de Crianza Militar Riñihue,
135 in the municipality of Los Lagos, Valdivia Province, Los Ríos Region, Chile.
136 Mules and mares selection criteria included reproductive age, physiological status, and the
137 absence of a clinical history of uterine pathology. Each animal underwent a comprehensive
138 gynecological evaluation, including vaginoscopy and transrectal ultrasonography using a
139 SonoScape X3Vet® system (SonoScape Medical Corp., Shenzhen, Guangdong, China) equipped
140 with a 5.0-MHz linear transducer. This examination confirmed estrus and ruled out anatomical or
141 functional abnormalities of the reproductive tract.
142 Only females with preovulatory follicular diameter greater than 35 mm, absence of a corpus
143 luteum, endometrial edema, and no intrauterine fluid were included in the study. Non-cycling
144 mules were excluded. Endometritis status was determined by integrating endometrial cytology and
145 bacteriological culture, following Nielsen et al. (2010) approach for mares. Samples were
146 classified as positive if cytology showed endometrial inflammation, mainly neutrophilic
147 infiltration, with or without positive bacterial growth. Cases with negative cytology and no

148 significant bacterial growth were classified as negative for active endometritis (Nielsen et
149 al.,2010).

150 For the comparative assessment of eosinophilic infiltration, archival formalin-fixed
151 paraffin-embedded (FFPE) endometrial sections from 23 Catalonian jennies (*Equus asinus*, aged
152 8–12 years, all having foaled at least three times) were retrieved from a previously published study
153 by this research group (Miró et al., 2020) and re-evaluated under identical staining and microscopic
154 conditions specifically to compare eosinophilic infiltration among Kenney–Doig categories: IIA
155 (n = 6), IIB (n = 11), and III (n = 6). No new animal procedures were required for this comparative
156 analysis.

157 ***2.3 Endometrial biopsy collection***

158 Endometrial biopsy samples were obtained using a standard transrectal approach for equine
159 endometrial sampling. Females were gently restrained in a padded chute to minimize movement
160 and stress. Perineal areas were thoroughly cleansed with povidone–iodine solution and rinsed with
161 sterile saline.

162 Sample collection used sterile crocodile-type forceps introduced transvaginally. A
163 lubricated, gloved hand stabilised the uterus through the rectum. Forceps were guided through the
164 cervix into the uterine body under rectal palpation, and a tissue sample (approximately 0.5–1.0
165 cm^3) was carefully collected from the proximal region of one uterine horn. Immediately after
166 collection, each biopsy was divided: one part was fixed in 4% formaldehyde for histology, and the
167 other was preserved in RNAlater® solution (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,
168 USA) for downstream analyses.

169 ***2.4 Histological processing and staining***

Endometrial tissue was fixed in 4% formaldehyde for 24 hours, then transferred to 70% ethanol and stored at 4°C until histological processing at IBIOTROP, Animal Health Laboratory, Universidad San Francisco de Quito (USFQ), Quito, Ecuador. Unless noted, all histological reagents used came from Sigma-Aldrich® (Merck KGaA, St. Louis, MO, USA).

Samples underwent standard histology: dehydration in graded ethanol (70% : 2 × 1 h, 95%: 1 h, and absolute ethanol: 3 × 20 min), clearing in xylene (3 × 5 min), embedding in paraffin with xylene–paraffin mixtures (1:1 and 1:2), and, lastly, in pure paraffin at 58°C (2 × 1 h). Blocks were sectioned at 4 µm using a Leica RM2125 RTS microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

Tissue sections were stained with Harris hematoxylin and eosin (H&E) using standard protocols. Briefly, sections were cleared in xylene (3 × 3 min), rehydrated through 100% and 95% ethanol (2 × 1 min each), and rinsed in distilled water (2 × 3 min). Slides were stained with Harris hematoxylin for 15 s, and rinsed for 10-min under tap water, dehydrated in 95% and 100% ethanol (2 × 1 min each), cleared in xylene (3 × 1 min), and finally mounted with SecureMount™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for morphometric and stereological analyses.

2.5 Histopathological evaluation and classification

Each endometrial biopsy was examined by light microscopy (Leica DM500) to assess the presence and distribution of inflammatory cells, with emphasis on eosinophilic infiltrates. Eosinophils were identified on H&E-stained sections by standard morphological criteria: large cells with a bilobed nucleus and abundant bright eosinophilic (pink) granular cytoplasm. Granules were occasionally observed to be released into the extracellular matrix, making eosinophils clearly distinguishable from neutrophils and lymphocytes. Random eosinophil counts were performed in ten microscopic fields per biopsy at 200× magnification.

193 Since no histopathological classification exists for mule endometrium, the Kenney and
194 Doig categorisation, developed for mares, was applied (Kenney and Doig, 1986). Normal
195 histological architecture were category I. Mild fibrosis and inflammatory infiltration were category
196 IIA, samples showing moderate lesions were category IIB, and biopsies displaying severe fibrotic
197 and inflammatory alterations were category III (Kenney and Doig, 1986).
198 In addition, eosinophilic infiltration in the current study was compared with the previously
199 reported results from this research group (Miró et al., 2020) for jennies, obtained from analysis of
200 paraffin-embedded sections from that study.
201 ***2.6 Immunohistochemistry***
202 Sections were mounted on Epic Plus1 adhesive slides for immunohistochemistry
203 (TOMO®, Tokyo, Japan). The sections were deparaffinised, rehydrated, and endogenous
204 peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H_2O_2 in methanol for 30 min. Primary
205 antibodies were diluted using Diamond 2™ Antibody Diluent (Vector Laboratories, Burlingame,
206 CA, USA). Details of the antibodies used, their dilutions, and antigen retrieval pre-treatments are
207 provided in Table 1. A total of 36 samples were analysed immunohistochemically. All antibodies
208 used in this study had been previously employed in equid tissue across multiple species, supporting
209 their cross-reactivity with mare, mule, and jenny endometrial tissue. Negative controls were
210 included in every staining run, consisting of a technique control (omission of the primary antibody)
211 and an isotype control, both of which confirmed the specificity of the immunoreactive signal.
212 Representative negative control images are provided alongside Figures 2, 3, and 4.
213 Primary antibody incubation was performed overnight at 4 °C (24 h). Immunodetection
214 was carried out using a universal labelled polymer detection system (Vector Laboratories,
215 Burlingame, CA, USA). After each step, sections were thoroughly rinsed with phosphate-buffered

saline (PBS). Immunoreactivity was visualised using the ImmPACT™ DAB Substrate Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Subsequently, all sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated through graded ethanol solutions, cleared, and mounted with Entellan® mounting medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

2.7 Confocal immunofluorescence microscopy

Samples were analysed using a pulsed laser on a confocal laser scanning microscope (LSM 700; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Images were acquired and processed using the integrated ZEN software (ZEISS Efficient Navigation; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany).

Briefly, 4-µm FFPE tissue sections were deparaffinised, rehydrated, and incubated in 1% PBS–Tween® 20 (Sigma-Aldrich®, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 20 min at room temperature. Protein blocking was then performed using 3% normal horse serum, followed by overnight incubation at 4 °C with the following primary antibody combinations: anti-cytokeratin antibody (rabbit, 1:200; BioSystems S.A., Barcelona, Spain) and anti-vimentin antibody (mouse monoclonal, 1:200; Dako, Glostrup, Denmark).

On the second day, sections were thoroughly washed and incubated simultaneously with Alexa Fluor™ 488 goat anti-rabbit IgG (1:200; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse IgG (1:200; Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 h at room temperature in the dark. Subsequently, sections were washed in PBS–Tween® 20 and mounted using ProLong™ Gold Antifade Reagent with DAPI aqueous mounting medium (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, USA).

Immunofluorescence labelling with the antibodies listed above (Table 1) was performed simultaneously on the same tissue sections.

2.8 Second-harmonic generation (SHG) microscopy and confocal immunofluorescence

Collagen fiber organization was assessed by second-harmonic generation (SHG) microscopy on the same confocal microscope system used for immunofluorescence imaging (Section 2.7), using a pulsed laser. SHG signal is generated by the physical interaction of the laser with non-centrosymmetric structures, such as fibrillar collagen, enabling label-free visualization of collagen fibers without staining or fluorescent markers. For each sample, voltage gain values were calibrated to visualize collagen fibers without signal saturation, and identical gain settings were maintained across all samples to ensure comparability between groups.

SHG signal intensity is directly proportional to fibrillar collagen presence and concentration under constant excitation conditions, allowing semi-quantitative estimation of collagen fiber abundance and organization. This approach offers an advantage over fluorescence-based markers such as Alexa Fluor 488/594, where signal stability may be compromised by photobleaching and background autofluorescence. The relative SHG signal intensity was therefore used as a semi-quantitative indicator of collagen remodeling across histopathological categories and species.

As SHG is a physical optical phenomenon dependent on the intrinsic properties of fibrillar collagen rather than antibody-antigen interactions, negative controls are not applicable to this technique and were therefore not included.

2.9 Quantitative immunohistochemical and stereological image analysis

All images were acquired under strictly standardised conditions, with exposure time, illumination intensity, gain, and magnification kept constant across all samples and experimental groups to ensure quantitative comparability. Images were captured at 400× magnification. For each section, a minimum of five non-overlapping microscopic fields containing well-preserved and

clearly delineated endometrial glands were randomly selected, avoiding areas with tissue folds, sectioning artifacts, or nonspecific staining.

Digital image analysis was performed using ImageJ/Fiji (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) according to stereological principles. For each image, the glandular compartment was manually delineated using the polygon selection tool to define the region of interest (ROI), thereby excluding stromal areas not associated with glandular structures. Background fluorescence was corrected using the rolling ball subtraction algorithm prior to thresholding. Marker-specific thresholds were applied using an automated thresholding method and visually validated to ensure accurate discrimination between true immunopositive signal and background noise.

The fraction of the glandular compartment occupied by cytokeratin- or vimentin-positive profiles was estimated as volume density (Vv), based on the proportional area of immunopositive pixels within each ROI. Under the assumption of isotropy and random field selection, this area fraction provides an unbiased stereological estimator of volume density. Results were expressed as the percentage of the total glandular volume occupied by immunopositive structures. This stereological approach allowed normalization of marker expression relative to gland size, minimizing variability associated with differences in glandular morphology among samples and histopathological categories.

For each animal, mean Vv values were calculated from all analysed fields and used as the experimental unit for subsequent statistical analyses.

2.10 RNA extraction and real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from endometrial tissue samples using the E.Z.N.A. Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA), following the manufacturer's instructions. RNA

concentration and purity were assessed by spectrophotometry using the A260/A280 ratio, and RNA integrity was verified by agarose gel electrophoresis. Complementary DNA (cDNA) was synthesised from 100 ng of total RNA using the LunaScript Reverse Transcription Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), according to the manufacturer's protocol.

Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using an AriaMx Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix. Each reaction was carried out in a final volume of 20 µL, containing 2 µL of cDNA, 12.5 µL of master mix, and 0.5 µL of each primer (2.5 µM). Primer sequences for IL1β, IL6, TNFα, TGFβ, and the housekeeping gene ACTB were designed using AmplifX software based on Equus caballus reference sequences (NCBI RefSeq) and are provided in Table 2. Amplification conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 seconds and annealing/extension at 60°C for 30 seconds. All samples were analysed in triplicate. Relative mRNA transcript abundance was calculated using the 2^−ΔΔCt method, with ACTB as the reference gene.

2.11 Statistical analysis

Data were analysed according to their distribution and are presented as mean ± standard deviation (SD), as indicated. Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. Comparisons among species and Kenney–Doig histopathological categories were performed using two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the appropriate post hoc tests, or by the Kruskal–Wallis test with Dunn's correction for non-parametric data.

Quantitative immunohistochemical and gene expression data were analysed using two-way ANOVA to evaluate the effects of species and histopathological category. Relative gene expression levels were calculated using the ΔΔCt method. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All

statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1 Histology

Endometrial biopsy samples were categorised according to the Kenney and Doig criteria as follows: in mules, grades I and IIA accounted for 31.8% of samples each, grade IIB for 36.4%, and none for grade III. In mares, grades I accounted for 18.2%, grade IIA for 31.8%, grade IIB for 27.3% and grade III for 27.7% (Table 3).

According to the Kenney and Doig classification (Kenney and Doig, 1986) (Table 3), none of the mule samples were classified as category III, the most severe grade. Most samples were classified as categories IIA and IIB, corresponding to intermediate endometrial lesions.

In mule endometrial samples, eosinophils were absent in the stromal compartment, and no eosinophil-associated inflammatory infiltrates were observed in the tissue architecture (Figure 1A). Similarly, mare endometrial samples showed no eosinophilic infiltration, with stromal profiles indicating an absence of eosinophil-related inflammation (Figure 1B). In contrast, jennies endometrial sections exhibited abundant eosinophilic infiltration, mostly within stromal tissue (Figure 1C). These findings demonstrate differing inflammatory responses: jennies exhibit prominent eosinophilic infiltration, whereas this is not observed in mares or mules.

3.2 Immunohistochemistry

3.2.1 Vimentin

Vimentin expression was observed in 21 of 22 mule samples (95.5%), with only one sample showing negative immunoreactivity, and ranged in intensity from moderate to abundant. Immunostaining was predominantly localised within the stromal compartment, consistent with the

331 presence of activated fibroblasts. In two samples, vimentin-positive cells were also observed
332 surrounding endometrial glands with moderate staining intensity (Figure 2).

333 *3.2.2 Cytokeratin*

334 This glandular epithelial marker showed positive immunoreactivity in all samples, with
335 staining intensity ranging from moderate to abundant in samples classified as categories II and I,
336 respectively (Figure 3).

337 *3.2.3 Estrogen and progesterone receptors*

338 The expression of hormonal receptor markers in the endometrium, localised to the nuclei
339 of glandular and stromal cells, was associated with the Kenney and Doig classification level
340 (Kenney and Doig, 1986). As the Kenney–Doig category advanced, a trend toward reduced
341 immunoreactivity for estrogen and progesterone receptors was observed, suggesting that steroid
342 receptor expression progressively declines with increasing endometrial damage (Figure 4).

343 *3.2.4 Quantitative immunohistochemistry*

344 The volume density of vimentin-positive profiles was significantly higher in mares than in
345 mules across all Kenney–Doig categories (Figure 5). Specifically, categories I ($p < 0.001$), IIA (p
346 < 0.001), and IIB ($p < 0.01$) showed notable differences, with the greatest difference seen in
347 category III ($p < 0.001$), where mule samples exhibited minimal vimentin immunoreactivity
348 compared to mares. For cytokeratin-positive profiles, mares had significantly higher density than
349 mules in categories IIA ($p < 0.05$) and III ($p < 0.001$), whereas mules showed markedly lower
350 values in category III (Figure 5).

351 *3.2.5 Second-harmonic generation imaging*

In endometrial samples obtained from mules classified as category IIA, weak cytokeratin positivity (green) was observed in glandular epithelial cells, accompanied by vimentin-positive stromal cells (red), consistent with fibroblast-like cells. This cellular distribution may represent early stromal activation, potentially associated with subclinical tissue remodeling processes. However, complementary evaluation using SHG imaging did not reveal mature collagen fiber formation, indicating that the observed signal does not yet correspond to established structural fibrosis (Figure 6).

3.3 Immunohistochemistry and SHG imaging in category IIB mule endometrium.

In endometrial tissue obtained from mules classified as category IIB, preservation of glandular architecture was evident, with strong cytokeratin expression in the glandular epithelium (green) and a sparse population of vimentin-positive stromal cells (red), suggesting minimal fibroblastic activation. However, analysis by SHG microscopy revealed the presence of newly forming collagen fibers (Figure 7B, arrows), indicating an early stage of extracellular matrix deposition. The SHG signal was weak and dispersed, suggesting that the fibrotic process is at an incipient and potentially reversible stage, consistent with an intermediate histopathological category such as IIB (Figure 7).

3.4 mRNA transcript levels

In mares, mRNA levels of IL1β, IL6, TGFβ, and TNFα were significantly higher ($p < 0.001$) across all Kenney–Doig histopathological categories (I, IIA, IIB, and III) compared with those in mules (Figure 8).

4. Discussion

The present study demonstrates that the mule endometrium exhibits a distinct histopathological progression pattern compared with that described in mares, characterised by the

absence of severe fibrotic stages equivalent to Kenney–Doig category III. Endometrial biopsy remains the reference method for assessing uterine health in equids affected by infertility or subfertility, providing robust prognostic value for reproductive performance (Kenney and Doig, 1986; Martínez-Bartolomé et al., 2024). However, despite its predictive utility, therapeutic interventions frequently fail to restore fertility in mares with advanced endometrial pathology, highlighting the intrinsic biological limitations associated with progressive fibrosis. In this context, the mule emerges as a biologically distinct and potentially advantageous model, both as an embryo recipient and as a comparative system for investigating endometrial remodeling.

Marked species-specific differences in eosinophilic infiltration observed in the present study reveal fundamental divergences in endometrial immune regulation among equids. The absence of eosinophils in the endometrium of mares and mules is fully consistent with both classical and contemporary reports describing the equine uterus as predominantly characterised by neutrophilic and lymphoplasmacytic inflammatory profiles, with eosinophils considered uncommon under physiological conditions or in cases of reproductive compromise (Kenney and Doig, 1986; Miró et al., 2011, 2020).

In contrast, the abundant eosinophilic infiltration consistently detected in jennies endometrium aligns with multiple studies reporting a distinctive baseline immune phenotype in donkey species, in which eosinophils are frequently present even in the absence of overt uterine pathology (Grimm et al., 2017; Miró and Papas, 2018; Ferreira-Dias et al., 2020; Miró et al., 2020; Radar-Chafirovitch et al., 2025). Notably, the absence of eosinophilic infiltration in the mule endometrium indicates that its uterine immune phenotype resembles that of the mare rather than an intermediate parental state between mare and jenny. This finding is consistent with previous studies demonstrating functional uterine competence in mules used as embryo recipients (Allen

398 and Short, 1997; González et al., 2015) and contrasts with the jenny-specific inflammatory
399 baseline reported in the literature (Miró et al., 2020).

400 At the stromal level, vimentin immunoreactivity gives insight into early fibrotic dynamics.
401 In mares, early-stage periglandular fibrosis reflects fibroblast activation instead of mature collagen
402 deposition, a well-documented process in equine endometrosis (Buczkowska et al., 2014). The
403 present results are consistent with this model in mares. However, in mules, vimentin
404 immunoreactivity shows a much weaker fibroblastic response. Mule samples in category IIB have
405 fewer vimentin-positive fibroblasts layers around endometrial glands (Fig. 2). This suggests a
406 weaker or delayed fibrotic response, differs from the progressive accumulation of fibroblasts
407 observed in infertile mares (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019) and points to species-specific
408 modulation of stromal activation.

409 Cytokeratin expression supports the preservation of glandular function in mule
410 endometrium. In mares, loss of cytokeratin immunoreactivity is linked with advanced fibrosis and
411 glandular degeneration, especially in category III endometrosis (Rojas et al., 2020). In contrast,
412 most glands in mules maintain cytokeratin expression across all histopathological categories (Fig.
413 3), indicating preserved epithelial integrity and functional capacity. The difference from the mare
414 model highlights a key distinction in epithelial–stromal coupling. It suggests glandular dysfunction
415 in mules may not follow the same progressive path as described in equine endometrosis.

416 Patterns of steroid receptor expression further reinforce this interpretation. Previous studies
417 have demonstrated reduced estrogen and progesterone receptor expression in fibrotic stromal
418 regions compared with healthy endometrium, with receptor downregulation correlating with
419 fibrosis severity (Lehmann et al., 2011). Although mule endometrium exhibited trends consistent
420 with this framework, a substantial proportion of biopsies retained strong steroid receptor

421 immunoreactivity, in contrast to the pronounced receptor loss reported in severely affected mares.
422 Collectively, these findings support the concept that mules represent a distinct model for the study
423 of equine endometrial fibrosis, characterised by altered remodeling kinetics that may differ from
424 the progressive fibrotic evolution described in mares.

425 Second-harmonic generation microscopy provided enhanced resolution of stromal
426 architecture. In category IIA mule endometrium, SHG revealed stromal remodeling in the absence
427 of organised fibrillar collagen deposition, consistent with early stromal remodeling changes. This
428 observation contrasts with multiple reports in mares describing progressive accumulation of type
429 I and type III collagen in periglandular and perivascular distributions during the progression of
430 endometrosis (Lehmann et al., 2011; Rebordão et al., 2018). The absence of structured collagen
431 fibers in mule samples suggests a divergence from the canonical fibrotic pathway described in
432 mares and aligns with SHG-based studies demonstrating the ability of this technique to detect
433 collagen reorganization prior to conventional histological visualization (Strupler et al., 2007; Han
434 et al., 2008; Mostaço-Guidolin et al., 2017; Bueno et al., 2022).

435 In category IIB mule endometrium, SHG imaging revealed incipient, heterogeneous
436 collagen deposition, suggestive of a transitional state between early stromal remodeling and
437 established fibrosis. While this pattern partially resembles the moderate endometrosis described in
438 mares (Lehmann et al., 2011), the reduced intensity and irregular distribution of collagen fibers in
439 mules contrast with reports in jennies, in which intermediate categories already exhibit collagen
440 deposition, eosinophilic infiltration, and increased mRNA levels of profibrotic cytokines such as
441 IL-33 (Miró and Papas, 2018; Ferreira-Dias et al., 2020; Miró et al., 2020). However, as fibrosis
442 progresses in mares, there is a gradual increase in collagen type I from the deep stroma to the
443 epitelium. In jennies, this progression appears to be much slower, with collagen type III being

maintained at different endometrial levels until significant degenerative states (category III) (Miró et al, 2020). These discrepancies suggest that mule endometrium follows a distinct fibrotic trajectory, potentially influenced by hybrid-specific regulatory or epigenetic mechanisms. Taken together, these findings show that category IIB is a critical point in mule endometrial remodeling.

Combined immunohistochemistry and SHG microscopy give a sensitive way to detect subclinical fibrotic changes, revealing heterogeneity within histological categories as Kenney and Doig (1986) originally proposed. This combined diagnostic approach may refine reproductive prognosis in hybrid equids. It also creates a basis for future studies on mRNA levels of fibrotic genes (COL1A1, COL3A1, MMP2, TIMP2) and myofibroblast activation markers (α-SMA), as Szóstek-Mioduchowska et al. (2019) suggested.

Different transcriptional profiles in mares and mules reveal essential species-specific differences in the regulation of endometrial inflammation and fibrosis. In mares, IL1β, IL6, and TNFα mRNA levels rise from category I to IIB. Then they partially decline in category III, following previous reports of an active inflammatory phase preceding advanced fibrotic remodeling in equine endometrosis (Lehmann et al., 2011; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019). Sustained, rising TGFβ levels as pathology worsens further support its role as a key regulator. It drives extracellular matrix deposition and fibroblast activation in advanced disease stages. This is extensively documented in fibrotic equine endometrium (Lehmann et al., 2011).

In contrast, the mule endometrium exhibited consistently attenuated mRNA levels of pro-inflammatory and pro-fibrotic genes across all Kenney–Doig categories, with transcript levels remaining close to baseline, even in category III. This transcriptional restriction contrasts sharply with the canonical molecular trajectory described in mares and suggests a dissociation between histopathological classification and fibrogenic signaling in this hybrid species.

467 Notably, similar dissociations between inflammatory mRNA levels and structural fibrosis
468 have not been reported in mares or jennies, in which elevated cytokine mRNA levels strongly
469 correlate with collagen accumulation and disease progression (Miró and Papas, 2018; Szóstek-
470 Mioduchowska et al., 2019; Ferreira-Dias et al., 2020; Wang et al., 2024).
471 Collectively, these findings indicate that mule endometrium follows a distinct molecular
472 program characterised by attenuated inflammatory amplification and limited activation of TGFβ-
473 driven fibrotic pathways. This molecular profile provides a mechanistic explanation for the
474 reduced severity and attenuated progression of endometrial remodeling observed in this species.
475 Moreover, this divergence highlights the mule as a unique comparative model for dissecting
476 regulatory checkpoints that constrain fibrosis despite histological alteration, with potential
477 implications for redefining prognostic markers and therapeutic targets in equine endometrial
478 disease.

479 **5. Conclusions**

480 This study demonstrates that the mule endometrium (*Equus mulus*) exhibits a distinct
481 structural, immunological, and molecular profile that differs from the classical paradigm of equine
482 endometrosis described in mares and from the eosinophil-rich inflammatory baseline characteristic
483 of jennies. The absence of advanced fibrotic remodeling, preservation of epithelial integrity and
484 steroid receptor expression, and the delayed or attenuated progression of stromal fibrosis
485 collectively indicate that the mule endometrium follows a unique trajectory of tissue remodeling
486 distinct from the progressive fibrotic pattern described in mares.
487 By integrating histopathology, immunohistochemistry, mRNA analysis, and SHG
488 microscopy, this study provides a multidimensional framework for evaluating subclinical

endometrial alterations. Within this context, the mule serves as a valuable comparative model for investigating endometrial fibrosis and resilience in equids.

These findings refine the interpretation of endometrial biopsy across different equid species and support future research aimed at improving reproductive prognosis, diagnostic accuracy, and therapeutic strategies in equine and hybrid reproductive biology.

Declaration of conflict of interest

The authors declare that there are no financial, institutional, or personal conflicts of interest that could have inappropriately influenced the conduct of this study or the interpretation of its results.

Authorship and Contributions

Daniela Rojas: Methodology, Investigation. **Yat Sen Wong:** Investigation, Data curation. **Fernando Saravia:** Resources, Methodology, Funding acquisition. **Fidel Ovidio Castro:** Resources, Methodology, Data curation. **Jaime Catalán:** Writing review and editing, Supervision, Resources. **Jordi Miró:** Writing – review and editing, Supervision, Resources, Conceptualization. **Miguel A. Gutiérrez-Reinoso:** Writing – original draft, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation. **Pedro M. Aponte:** Methodology, Investigation, Conceptualization. **Manuel García-Herreros:** Investigation. **Kathlen G. García-Bravo:** Methodology, Investigation.

All authors have read and approved the final version of the manuscript and take responsibility for its content.

Funding

This research was partially funded by the Equine Reproduction Service, Universitat Autònoma de Barcelona (Spain); DIRGI-CP2021-005/Universidad Técnica de Cotopaxi

(Ecuador); the One Health Biomedical Research Institute, Universidad San Francisco de Quito (Ecuador); and the Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Sciences, Universidad de Concepción (Chile).

Acknowledgments

The authors acknowledge the Animal Health Laboratory of the Tropical Biodiversity Institute (IBIOTROP), USFQ, Quito, for technical support with histological processing. The authors also thank all individuals and laboratories involved in the execution of this research for their valuable contributions.

Data Availability Statement

The raw data supporting the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

Allen, W. R., Short, R. V., 1997. Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. J. Hered. 88, 384–392. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a023123

Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raš, A., Mrowiec, J., 2014. Endometrosis--significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. Pol. J. Vet. Sci. 17, 547–554. https://doi.org/10.2478/pjvs-2014-0083

Bueno, J. M., Martínez-Ojeda, R. M., Yago, I., Ávila, F. J., 2022. Collagen Organization, Polarization Sensitivity and Image Quality in Human Corneas using Second Harmonic Generation Microscopy. Photonics. 9, 672. https://doi.org/10.3390/photonics9100672

Camargo, C. E., Rechsteiner, S. F., Macan, R. C., Kozicki, L. E., Gastal, M. O., Gastal, E. L., 2020. The mule (Equus mulus) as a recipient of horse (Equus caballus) embryos: Comparative

aspects of early pregnancy with mares: The mule as a recipient of horse embryos. Theriogenology. 145, 217–225. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.029

Canisso, I. F., Panzani, D., Miró, J., Ellerbrock, R. E., 2019. Key Aspects of Donkey and Mule Reproduction. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 35, 607–642. https://doi.org/10.1016/j.cveq.2019.08.014

Centeno, L. A. M., Bastos, H. B. A., Bueno, V. L. C., Trentin, J. M., Fiorenza, M. F., Panziera, W., Winter, G. H. Z., Kretzmann, N. A., Fiala-Rechsteiner, S., Mattos, R. C., Rubin, M. I. B., 2024. Collagen and collagenases in mare's endometrium with endometrosis. Theriogenology, 230, 28–36. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.08.031

Fanelli, D., Losinno, L., Castañeira, C., Alonso, C., Bragulat, A., Panzani, D., Bocci, C., Degl'Innocenti, A., Moroni, R., Camillo, F., Wilsher, S., (Twink) Allen, W., 2022. First report of mule-in-mule pregnancies with live births following embryo transfer. J. Equine Vet. Sci. 113, 103999. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.103999

Ferreira-Dias, G., Rebordão, M. R., Galvão, A. M., Roberto-da-Costa, R., Amaral, A., Fernandes, C., Pinto-Bravo, P., Morazzo, S., Alexandre-Pires, G., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Skarzynski, D. J., 2020. What Goes Wrong from a Mare Healthy Endometrium to Endometrosis? In: Freitas Duarte, A., Lopes da Costa, L. (eds.), Advances in Animal Health, Medicine and Production. Springer., Cham, pp. 528–540. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61981-7_29

González, S. M., Gomes, R. G., Souza, A. K., Silva, C. B., Silva-Santos, K. C., Seneda, M. M., 2015. Evidences of Regular Estrous Cycles in Mules and Successful Use of These Animals

as Recipients for Donkey Embryos. J. Equine Vet. Sci. 35, 869–872. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2015.07.010

Grimm, A. L., Schoon, H. A., Schöniger, S., 2017. Histopathological features of endometritis eosinophilica in mares. Histol. Histopathol. 32, 1161–1173. https://doi.org/10.14670/HH-11-872

Gutiérrez-Reinoso, M. A., Aponte, P. M., García-Herreros, M., García-Bravo, K. G., Rojas, D., Sen Wong, Y., Saravia, F., Castro, F. O., Catalán, J., Miró, J., 2026. Histomorphometric characterization of the endometrium in mules (Equus mulus): An approach to endometritis/endometrosis. Anim. Reprod. Sci. 284, 108056. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2025.108056

Han, X., Burke, R. M., Zettel, M. L., Tang, P., Brown, E. B., 2008. Second harmonic properties of tumor collagen: determining the structural relationship between reactive stroma and healthy stroma. Opt. Express. 16, 1846–1859. https://doi.org/10.1364/oe.16.001846

Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., Schoon, H. A., 2009. Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. Theriogenology. 71, 264–274. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.008

Kenney, R. M., Doig, P. A., 1986. Equine endometrial biopsy. In Morrow, D.A. (ed), Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 723-729.

Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R., Sieme, H., Schoon, H. A., 2011. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares

suffering from equine endometrosis. Theriogenology. 76, 1326–1336. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.001

Martínez-Bartolomé, I., Masot, J., & Serres, C. (2024). Development of an equine endometrial histology scoring system to complement the Kenney-Doig scale. Reprod. Domest. Anim. 59 Suppl 3, e14614. https://doi.org/10.1111/rda.14614

Miró, J., Gutiérrez-Reinoso, M., Silva, J. A. da, Fernandes, C., Rebordão, M. R., Alexandre-Pires, G., Catalán, J., Ferreira-Dias, G., 2020. Collagen and Eosinophils in Jenny's Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification?. Front. Vet. Sci. 7, 558096. https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00631

Miró, J., Papas, M., 2018. Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys. J. Equine Vet. Sci. 65, 38–43. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.11.007

Miró, J., Viles, K., Fernandez, M., Fabregas, N., Soares, J., Garcia, W., 2011. Induced acute endometritis by frozen semen insemination in donkey. Reprod. Domest. Anim. 46, 130.

Mostaço-Guidolin, L., Rosin, N. L., Hackett, T. L., 2017. Imaging Collagen in Scar Tissue: Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications. Int. J. Mol. Sci. 18, 1772. https://doi.org/10.3390/ijms18081772

Nielsen, J. M., Troedsson, M. H. T., Pedersen, M. R., Bojesen, A. M., Lehn-Jensen, H., & Zent, W. W. (2010). Diagnosis of endometritis in the mare based on bacteriological and cytological examinations of the endometrium: Comparison of results obtained by swabs and biopsies. Journal of Equine Veterinary Science, 30(1), 27–30. doi:10.1016/j.jevs.2009.11.006

Radar-Chafirovitch, A., Quaresma, M., Yánez-Ortiz, I., Leiva, B., Ferreira-Dias, G., Payan-Carreira, R., Miro, J., Pires, M. dos A., 2025. Donkey endometrium: Characterization of resident immune cells. Res. Vet. Sci. 184, 105516. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105516

Rebordão, M. R., Amaral, A., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Skarzynski, D. J., Ferreira-Dias, G., 2018. Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. Theriogenology. 113, 8–18. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.001

Rojas, D., Cabezas, J., Ramírez, G., Saravia, F., Rodriguez-Alvarez, L., Castro, F. O., 2020. Complimentary diagnostic tools for endometrosis in biopsies of mares with clinical subfertility. Acta Sci. Vet. 48. https://doi.org/10.22456/1679-9216.98312

Rong, R., Chandley, A. C., Song, J., McBeath, S., Tan, P. P., Bai, Q., Speed, R. M., 1988. A fertile mule and hinny in China. Cytogenet. Cell. Genet. 47, 134–139. https://doi.org/10.1159/000132531

Schöniger, S., Schoon, H. A., 2020. The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses. Animals. 10, 625. https://doi.org/10.3390/ani10040625

Strupler, M., Pena, A.-M., Hernest, M., Tharaux, P.-L., Martin, J.-L., Beaurepaire, E., Schanne-Klein, M.-C., 2007. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. Opt. Express 15, 4054–4065. https://doi.org/10.1364/oe.15.004054

Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Baclawska, A., Okuda, K., Skarzynski, D. J., 2019. Effect of proinflammatory cytokines on endometrial collagen and metallopeptidase expression during

the course of equine endometrosis. Cytokine. 123, 154767. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154767

Wang, Z., Zeng, S., Wang, Y., Wang, T., Qu, H., Zhu, Y., Li, J., 2024. Reproductive Disorders in Donkeys: Current Evidence and Update. Animals. 14, 2494. https://doi.org/10.3390/ani14172494

Tables

Table 1. Primary antibodies and immunohistochemical conditions used for the analysis of endometrial tissue in mules (*Equus mulus*) and mares (*Equus caballus*).

Antibody (target)	Clone	Host	Cat. no	Antigen retrieval	Working dilution	Supplier
Cytokeratin (AE1/AE3)	AE1/AE3	Mouse monoclonal	M3515	EDTA (pH 8.5/microwave)	1:200	Diagnostic BioSystems
Vimentin	V9	Mouse monoclonal	M0725	Not required	1:200	Dako
Estrogen receptor (ER)	SP1	Rabbit monoclonal	249R-18	EDTA (pH 8.5/microwave)	Ready-to-use	Cell Marque
Progesterone receptor (PR)	Y85	Rabbit monoclonal	323R-17	EDTA (pH 8.5/microwave)	Ready-to-use	Cell Marque

All antibodies had been previously validated for use in equid tissue in peer-reviewed publications (Rojas et al., 2020; Miró et al., 2020). EDTA antigen retrieval was performed at pH 8.5 using microwave heating. Ready-to-use antibodies were applied as supplied by the manufacturer without further dilution.

643

644 **Table 2.** Primer sequences used for quantitative real-time PCR (qPCR) amplification of target
645 genes in mule endometrial tissue, designed from *Equus caballus* reference sequences (NCBI
646 RefSeq).

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Amplicon (bp)	NCBI RefSeq
ACTB	ACATCCGTAAGGACCTGT	CAGGGCTGTGATCTCCTTCT	98	NM_001081838.1
IL1B	GCCCAAAACAGATGAAGGGCAG	AAAGTTGGTGGGAGAATTGAAGC	92	NM_001082526.1
TNFA	GCCTCAGCCTCTTCTCCTTC	GGCTTGTCACTTGGGGTTC	97	NM_001081819.2
IL6	CCAAAGTCCTGGTCCAGATCC	GTGAATGCAGCTTAGCCAGC	97	NM_001082496.2
TGFB	AGCAGTGCCCGATCCCA	GGAATGGCTGTCCTTTGATG	91	NM_001081849.1

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

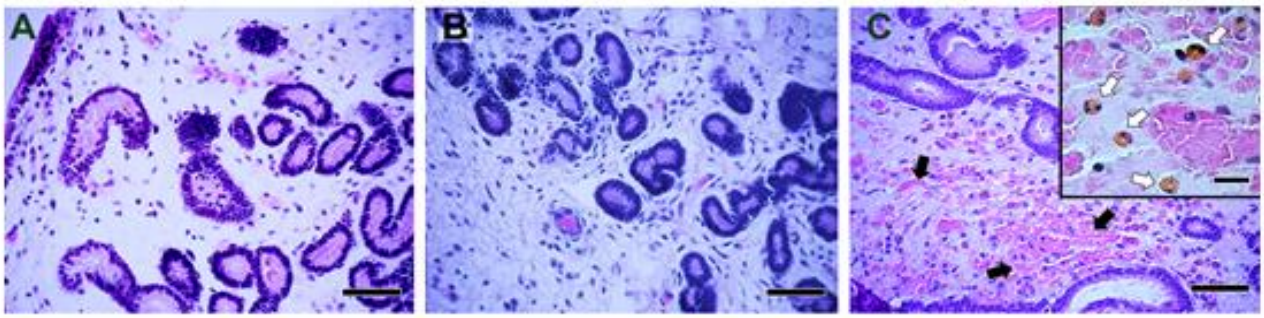
662 **Table 3.** Endometrial samples from mares and mules according to the Kenney–Doig classification.
663

Mules	I	IIA	IIB	III	Mares	I	IIA	IIB	III	Notes
M1		X			**H1**	X				Hemosiderin deposition without glandular nests
M2		X			**H2**		X			Hemosiderin deposition without glandular nests
M3		X			**H3**	X	X			Hemosiderin deposition without glandular nests
M4	X				**H4**			X		Normal histological architecture
M6	X				**H5**				X	Normal histological architecture
M5			X		**H6**		X			Dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests
M7	X				**H7**			X		Normal histological architecture
M8	X				**H8**		X			Normal histological architecture
M9		X			**H9**			X		Marked hemosiderosis
M10		X			**H10**				X	Mild hemosiderin deposition, without glandular nests
M11		X			**H11**				X	Marked hemosiderosis
M12		X			**H12**				X	Dilated glands
M13			X		**H13**		X			Dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density
M14			X		**H14**			X		Dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests
M15			X		**H15**	X				Dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests
M16			X		**H16**	X				Dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests
M17	X				**H17**		X			Reduced glandular density
M18	X				**H18**					Reduced glandular density
M19	X				**H19**				X	Hemosiderosis
M20			X		**H20**			X		Hemosiderosis, glandular dilation, dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests
M21			X		**H21**		X			Hemosiderosis, glandular dilation, dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests
M22			X		**H22**			X		Hemosiderosis, glandular dilation, dilated lymphatic vessels, mild to moderate periglandular fibrosis, reduced glandular density, without glandular nests

Mule (*Equus mulus*, 8–12 years old.; M1–M22) and mare (*Equus caballus*, 8–12 years old; H1-H22) identification number and endometrial type according to the Kenney and Doig classification. Endometrial categories were defined as follows: category I, normal endometrium; category IIA, mild inflammatory changes; category IIB, moderate to chronic inflammatory changes; category III, severe endometriosis with marked degenerative alterat

688 **Figure legends**

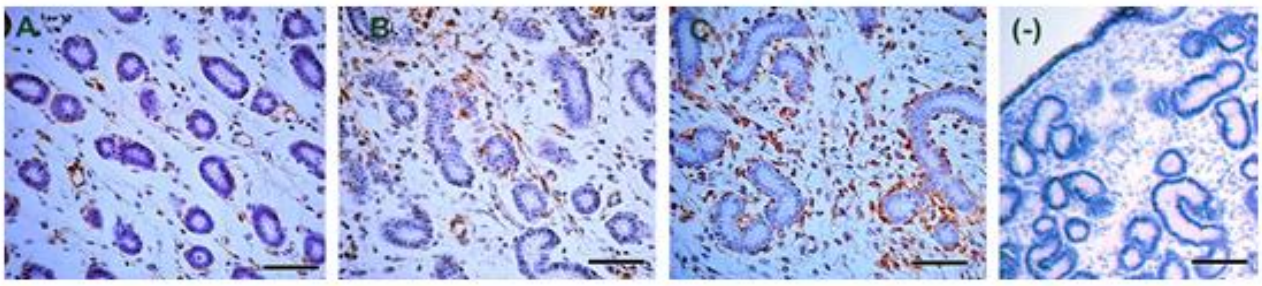
689



690

691 **Figure 1.** Comparative histological evaluation of eosinophilic infiltration in the endometrium of
692 the mule (*Equus mulus*), mare (*Equus caballus*), and jenny (*Equus asinus*). The figure illustrates
693 the absence of eosinophils in mule **(A)** and mare **(B)** samples and their marked presence in jenny
694 **(C)** endometrium. Hematoxylin and eosin **(H&E)**. Scale bar = 50 µm. Inset: jenny eosinophils are
695 shown in the infiltration areas (white arrows). Inset scale bar = 25 µm.

696



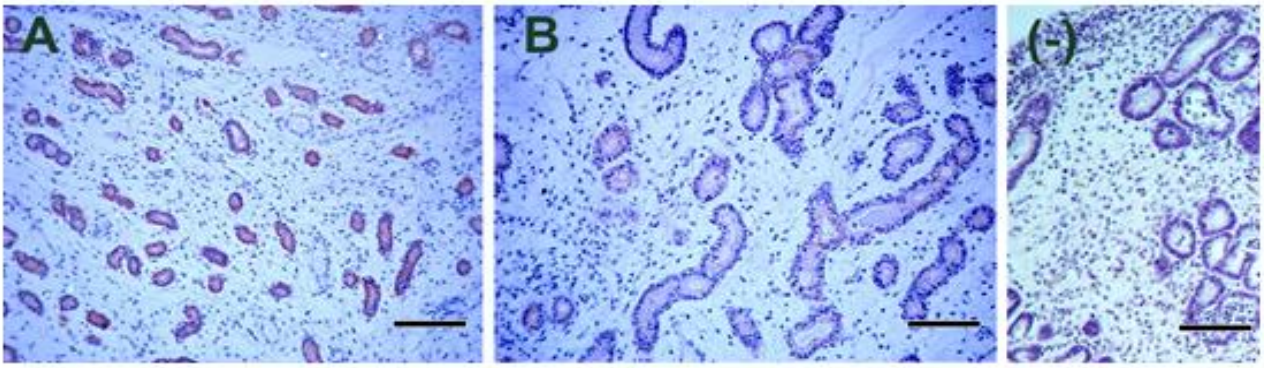
697

698 **Figure 2.** Immunohistochemical expression of vimentin in the mule endometrium. Representative
699 histological sections immunolabeled with a monoclonal anti-vimentin antibody. Category I **(A)**:
700 weak immunostaining predominantly localised in stromal fibroblast-like cells. Category IIA **(B)**:
701 moderate immunostaining within the stromal compartment, with very weak labeling observed in
702 the periglandular regions. Category IIB **(C)**: stronger immunoreactivity, primarily within the

703 stroma, with additional fibrillar staining patterns forming linear arrangements surrounding some
704 glandular groups. **(–)** Negative control. Hematoxylin and eosin **(H&E)**. Scale bar = 50 µm.

705

706



707

708 **Figure 3.** Immunohistochemical expression of cytokeratin in the mule endometrium. **A**: Category
709 I endometrium showing strong and uniform cytokeratin immunoreactivity in all glandular
710 epithelial structures. **B:** Category IIB endometrium displaying a more diffuse cytokeratin
711 immunostaining pattern with reduced staining intensity. **(–)** Negative control. Hematoxylin and
712 eosin **(H&E)**. Scale bar = 100 µm.

713

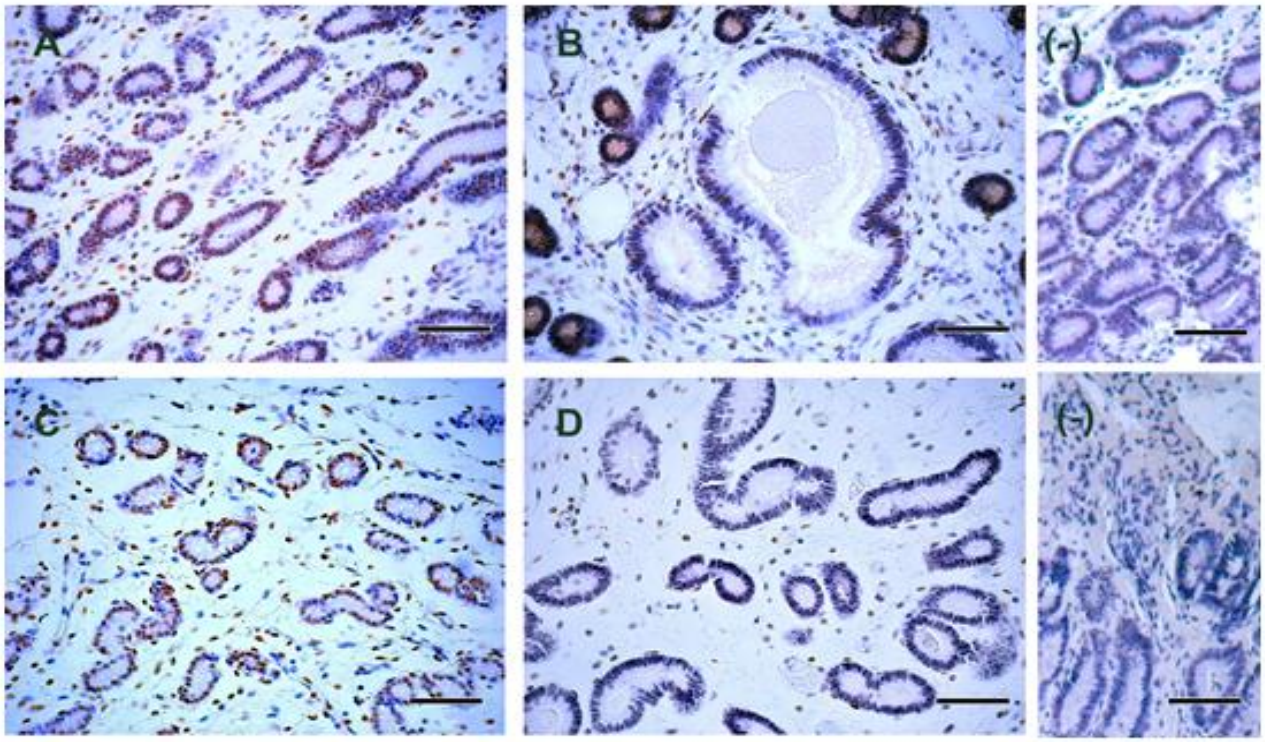
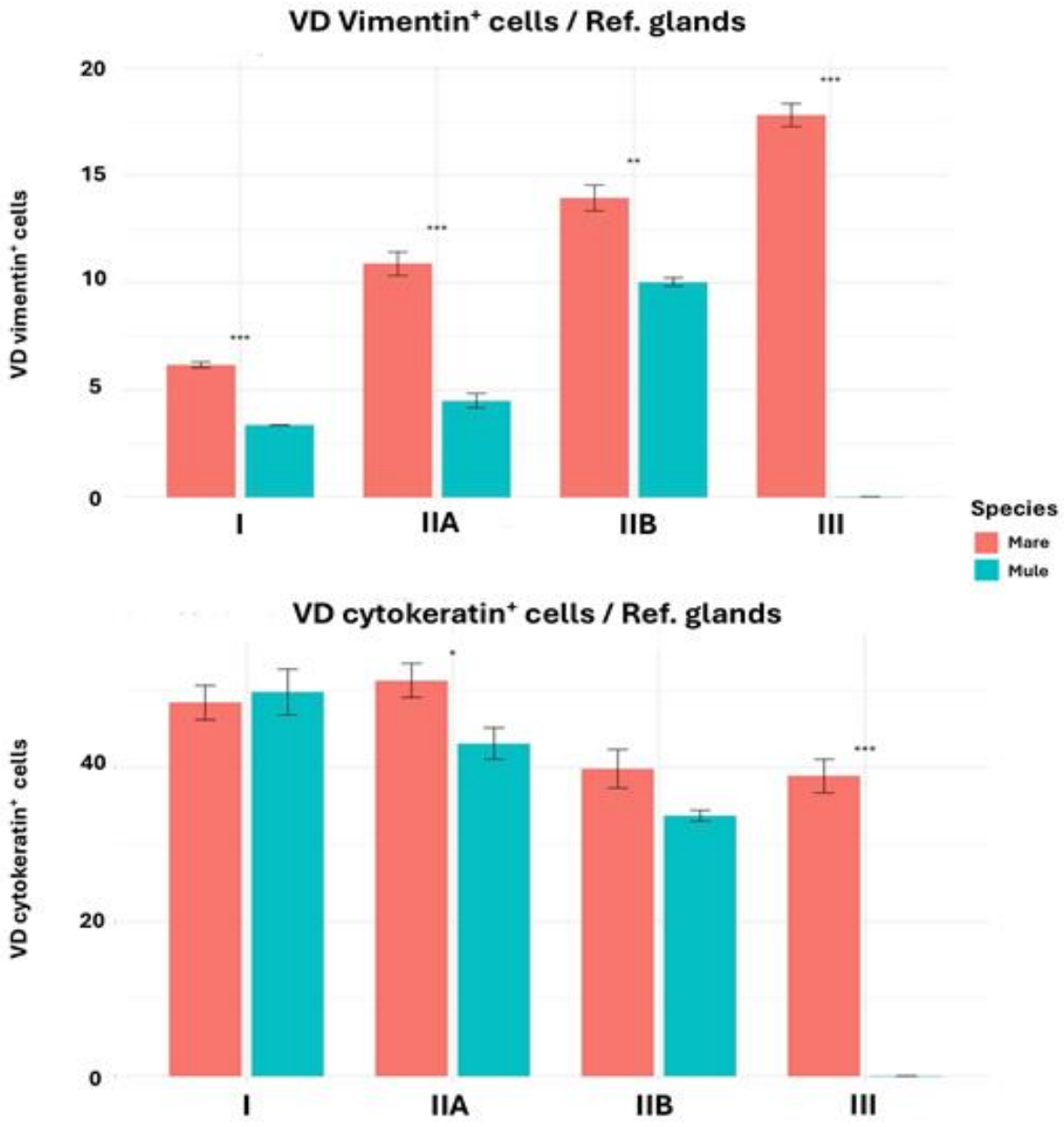


Figure 4. Immunohistochemical expression of progesterone (P4) and estrogen (E2) nuclear receptors in the mule endometrium. The figure shows the nuclear expression of progesterone receptors in stromal and glandular epithelial cells of mule endometrium classified as category I **(A)** and category IIB **(B)**. Abundant nuclear immunoreactivity is observed in category I samples **(A)**, whereas the absence of staining is evident in some dilated glands in category IIB samples **(B)**. **C, D**: Nuclear immunostaining corresponding to estrogen receptor expression. Strong nuclear labelling is observed in category I mule endometrium **(C)**, while in category IIB samples **(D)** estrogen receptor immunoreactivity is absent in glandular structures but preserved within the stromal compartment. **(−)** Negative controls. Hematoxylin and eosin **(H&E)**. Scale bar = 100 µm.

726

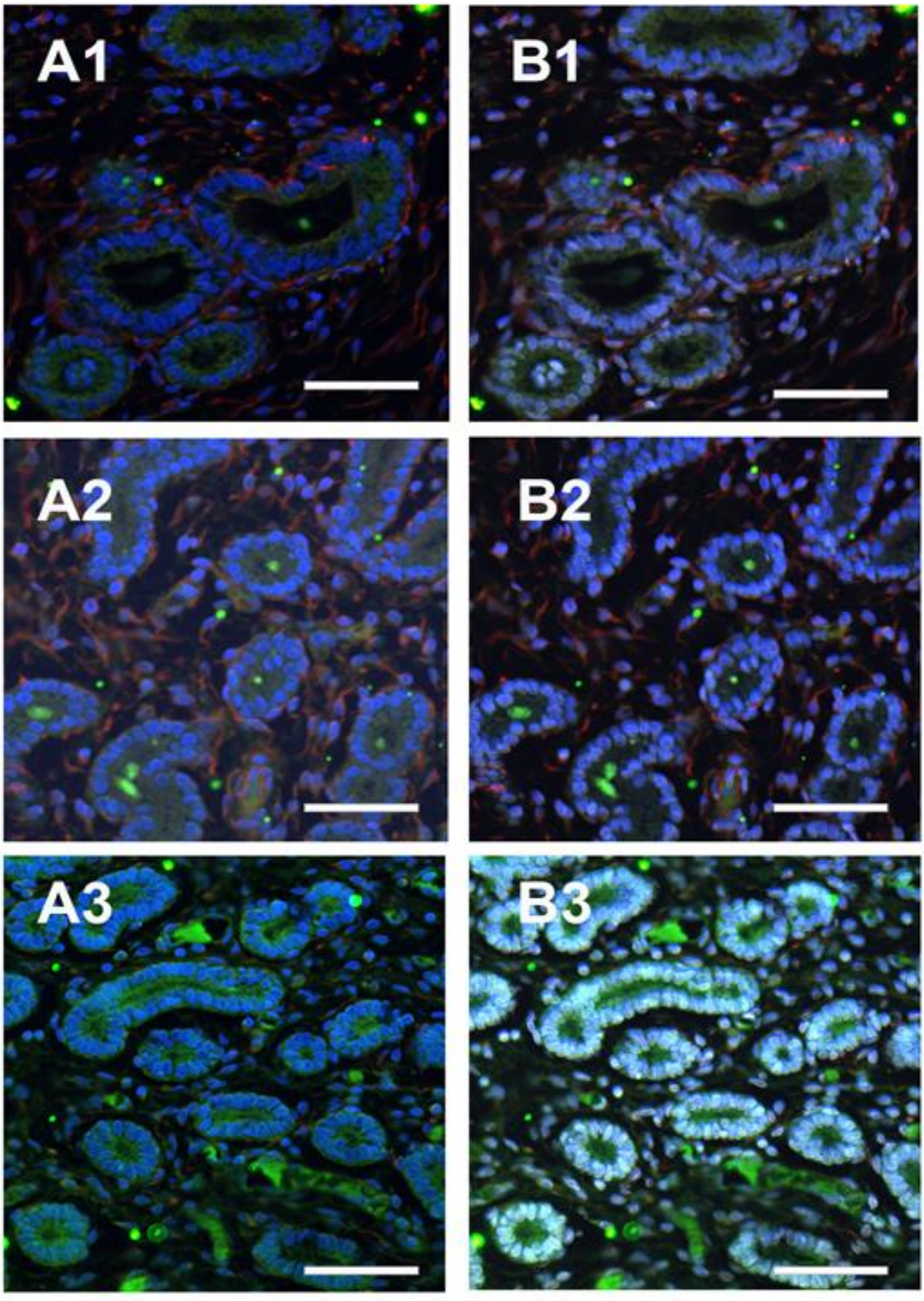

VD Vimentin⁺ cells / Ref. glands
VD vimentin⁺ cells
20
15
10
5
0
***
***
**
***
I
IIA
IIB
III
Species
Mare
Mule
VD cytokeratin⁺ cells / Ref. glands
VD cytokeratin⁺ cells
40
20
0
*
***
I
IIA
IIB
III

727

728

729 **Figure 5.** Quantification of vimentin-positive area relative to glandular area in mare (*Equus*
730 *caballus*) and mule (*Equus mulus*) endometrium across Kenney–Doig categories. Quantitative
731 stereological analysis of the volume density (Vv) of vimentin- and cytokeratin-positive profiles
732 within the glandular compartment of the endometrium of mares (Equus caballus) and mules (Equus
733 mulus) across Kenney–Doig histopathological categories (I, IIA, IIB, III). Bars represent mean ±
734 standard deviation (SD). Asterisks indicate statistically significant differences between species
735 within the same category ((*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$).

736



737

738

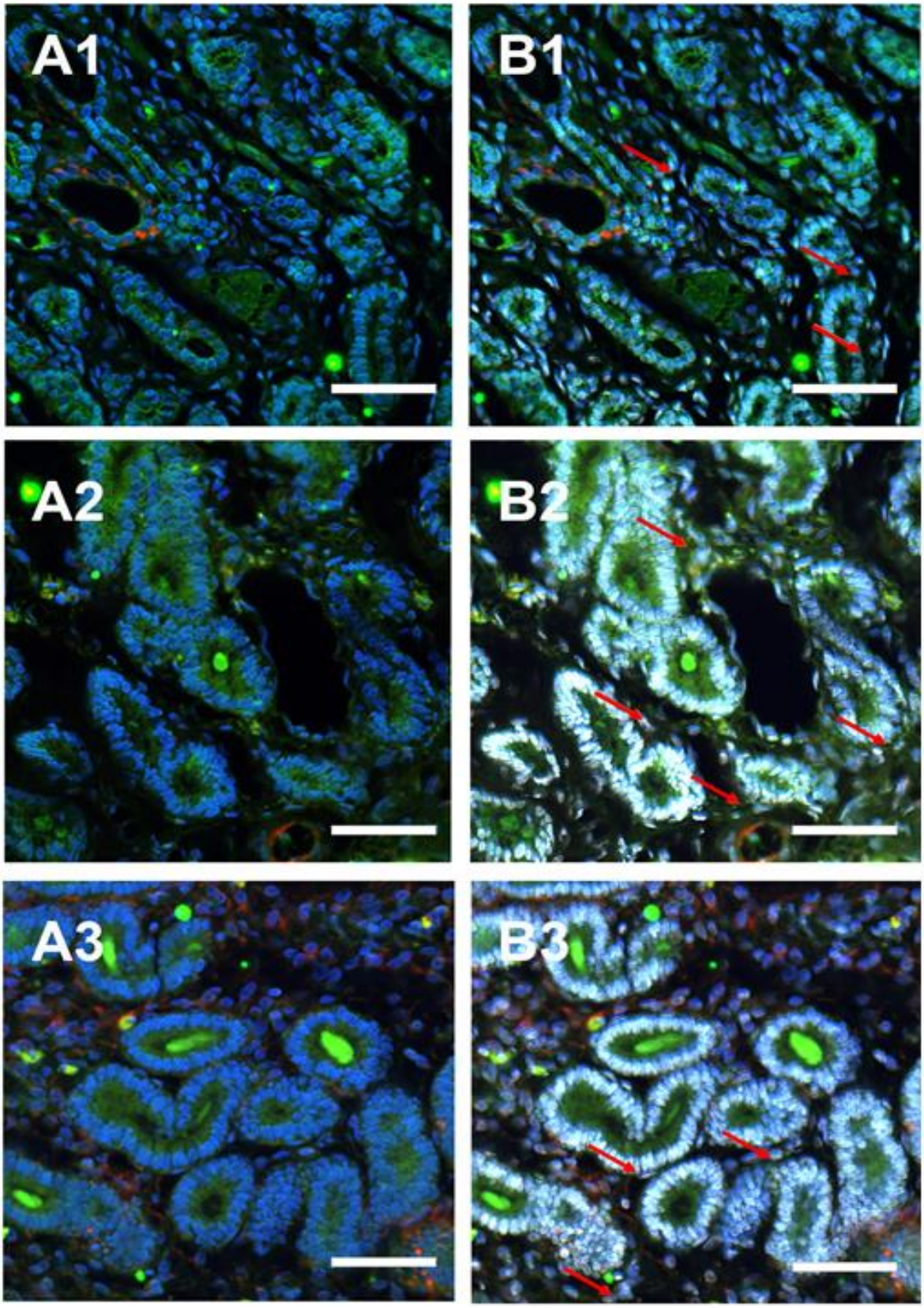
739 **Figure 6.** Immunohistochemistry and-second harmonic generation (SHG) imaging in category IIA
740 mule endometrium in three cases. **A1, A2, A3:** Indirect immunofluorescence of endometrial tissue
741 shows weak cytokeratin-positive staining (green) in the glandular epithelium, indicative of
742 preserved epithelial characteristics, accompanied by surrounding stromal cells expressing
743 vimentin (red), suggesting the presence of potentially activated fibroblast-like cells. **B1, B2, B3:**
744 Images acquired by SHG systemmicroscopy showing no evidence of organised collagen fiber
745 formation, indicating that the stromal activation pattern observed in **A** panel of images has not
746 progressed to established structural fibrosis. Cell nuclei are counterstained in blue (DAPI). Scale
747 bar = 50 µm.
748 Case 1. Mule endometrium is classified as category IIA. **(A1)** Weak cytokeratin-positive staining
749 (green) is observed in the glandular epithelium, surrounded by vimentin-positive fibroblast-like
750 stromal cells (red), which may indicate the early onset of fibrotic-related processes. **(B1)**. When
751 integrated with second-harmonic generation (SHG) imaging, this pattern does not progress to the
752 formation of organised collagen fibers, indicating the absence of established structural fibrosis.
753 Case 2. Mule endometrium is classified as category IIA. Weak cytokeratin-positive staining
754 (green) is observed in the glandular epithelium, accompanied by abundant vimentin-positive
755 fibroblast-like cells (red) dispersed throughout the stromal compartment without forming
756 organised fiber bundles **(A2)**. When these findings are integrated with second harmonic generation
757 (SHG) imaging, no collagen fiber formation is observed **(B2)**.
758 Case 3. Mule endometrium is classified as category IIA. Stronger cytokeratin-positive staining
759 (green) is observed in the glandular epithelium, with very few vimentin-positive fibroblast-like

760 cells (red) present in the stromal compartment **(A3)**. Consistently, second harmonic generation

761 (SHG) imaging shows the absence of collagen fiber formation **(B3).**

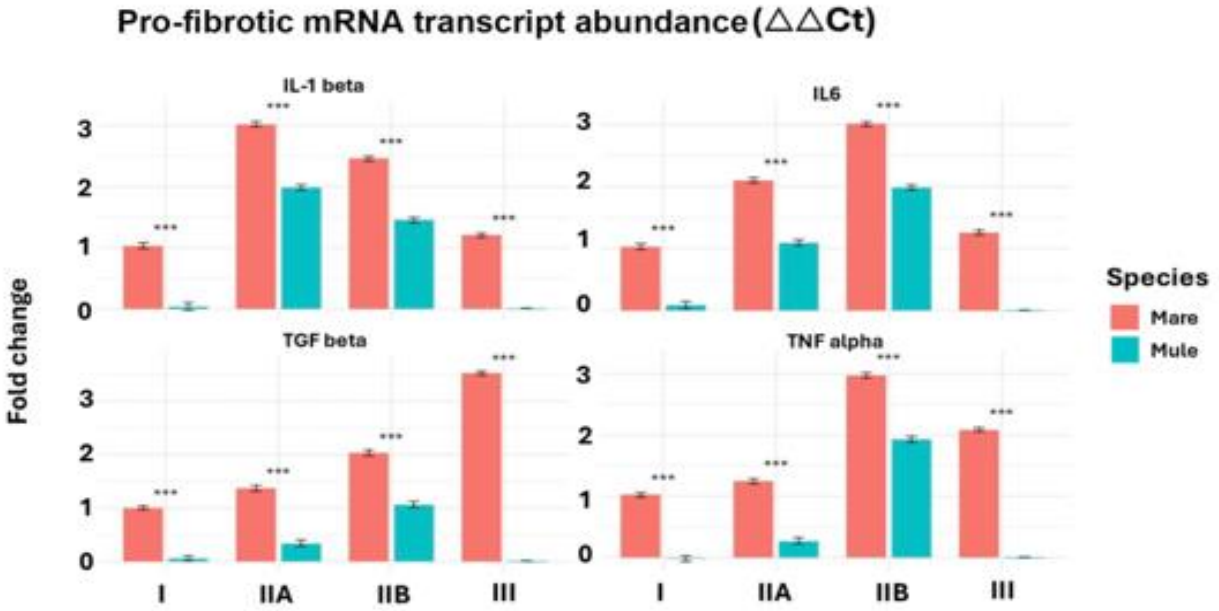
762

763



764

765 **Figure 7.** Immunohistochemical detection and second-harmonic generation (SHG) imaging in
766 category IIB mule endometrium. **A1, A2, A3:** Preserved endometrial glandular morphology with
767 positive cytokeratin expression in the glandular epithelium (green) and a sparse presence of
768 vimentin-positive stromal cells (red), indicating low fibroblastic activity. **B1, B2, B3:** Second-
769 harmonic generation microscopy reveals a weak signal corresponding to newly forming collagen
770 fibers (arrows), suggesting the onset of an incipient fibrotic process. The collagen signal remains
771 discontinuous and poorly organised, reinforcing the interpretation of an early stage of endometrial
772 stromal remodeling. Cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 50 μm.
773 Case 1. Mule endometrium is classified as category IIB. Glandular epithelium (green) with very
774 few vimentin-positive fibroblast-like stromal cells (red), **(A1)**. Second harmonic generation (SHG)
775 imaging shows a weak presence of newly formed collagen fibers (arrows), **(B1)**.
776 Case 2. Mule endometrium is classified as category IIB. Glandular epithelium (green) with very
777 few vimentin-positive fibroblast-like stromal cells (red), **(A2)**. Second-harmonic generation
778 (SHG) imaging reveals the presence of some newly forming collagen fibers (arrows), **(B2)**.
779 Case 3. Mule endometrium is classified as category IIB. Glandular epithelium (green) with a
780 moderate number of vimentin-positive fibroblast-like stromal cells (red), **(A3)**. Second harmonic
781 generation (SHG) imaging reveals the presence of emerging collagen fibers (arrows), **(B3)**.
782



783

784 **Figure 8.** Abundance of pro-fibrotic and pro-inflammatory mRNA transcripts in the endometrium
785 of mares (*Equus caballus*) and mules (*Equus mulus*) across Kenney–Doig histopathological
786 categories. Relative expression of pro-inflammatory and pro-fibrotic genes in the endometrium of
787 mares (*Equus caballus*) and mules (*Equus mulus*) across Kenney–Doig histopathological
788 categories (I, IIA, IIB, III). Abundance mRNA transcripts of IL1β, IL6, TNFα, and TGFβ were
789 quantified by real-time PCR and normalised using the ΔΔCt method. Bars represent mean fold-
790 change values ± standard deviation (SD). Asterisks indicate statistically significant differences
791 between species within the same category (***$p < 0.001$).

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

Los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral proporcionan un marco comparativo integrado para comprender la biología endometrial en la yegua, la burra y la mula, enfatizando la interacción entre inflamación, organización tisular, señalización estromal y remodelación fibrótica. En este contexto, la mula no debe interpretarse como una simple condición intermedia entre sus especies parentales, sino como un fenotipo híbrido con una arquitectura, inmunología y dinámica de remodelación propias (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

Aunque la biopsia endometrial continúa siendo el estándar morfológico para evaluar el estado uterino y el pronóstico reproductivo en équidos, gran parte de este conocimiento se ha construido a partir de la yegua, donde la progresión desde la inflamación hacia la endometrosis ha sido ampliamente caracterizada a nivel histológico y molecular (Kenney, 1978; Hoffmann et al., 2009a; Hoffmann et al., 2009b; Lehmann et al., 2011; Snider et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020; Morris et al., 2020). La burra, por el contrario, modifica varias premisas del modelo equino clásico, partricularmente en relación con la distribución del colágeno, la eosinófilia basal y la relación entre inflamación y fibrosis (Radar-Chafirovitch et al., 2025). En consecuencia, la mula ocupa una posición biológica singular en la que ni la extrapolación directa de la yegua ni desde la burra resulta suficiente para explicar completamente el comportamiento del tejido uterino (Rong et al., 1985; Ryder et al., 1985; Rong et al., 1988; Allen & Short, 1997; Fennessy, 1997; Canisso et al., 2019; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022; Gambini et al., 2025).

El paradigma clásico de la yegua estableció la biopsia endometrial como la piedra angular para evaluar el pronóstico reproductivo en équidos, al integrar alteraciones inflamatorias, glandulares, estromales y fibróticas dentro de un único marco histológico (Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011). Sin embargo, la evidencia contemporánea demuestra que la endometrosis no es simplemente una acumulación pasiva de colágeno, sino un proceso dinámico que involucra inflamación, remodelación de la matriz extracelular, desregulación endocrina y fibrogénesis inmunomediada (Walter et al., 2001; Hoffmann et al., 2009a; Ferreira-Dias et al., 2024). En este contexto, la progresión del colágeno tipo III al tipo I refleja la transición de la reparación tisular temprana a la fibrosis establecida (Junqueira et al., 1979; Centeno et al., 2024). Sin embargo, aunque la yegua sigue siendo el modelo de referencia fundamental, cada vez hay más pruebas que sugieren que estas trayectorias inflamatorias-fibróticas no se pueden extrapolar directamente a la burra o a los équidos

híbridos como la mula (Canisso et al., 2019; Runemark et al., 2025).

La relevancia de esta Tesis Doctoral no reside simplemente en proporcionar tres conjuntos de resultados, sino en construir un marco comparativo triangular entre la yegua, la burra y la mula (Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025). El primer estudio, define claramente la vía asnal de remodelación endometrial, dominada por eosinofilia relativa, expresión de *IL33* y persistencia de colágeno tipo III en el estrato compacto. El segundo estudio, muestra que la mula comparte varias características de organización tisular con la burra, especialmente un sesgo asinino en la proporción del estrato esponjoso y en la preservación de la arquitectura, pero sin reproducir completamente el patrón inflamatorio asinino. Finalmente, el tercer estudio revela que la histología convencional subestima la complejidad del tejido endometrial de la mula y que la combinación de inmunohistoquímica, expresión génica (abundancia relativa de transcriptos) y microscopía SHG permite reconocer una remodelación más atenuada, heterogénea y potencialmente reversible que la observada en la yegua.

1. ***Contribución del primer estudio:*** *Collagen and Eosinophils in Jenny"s Endometrium: Do They Differ With Endometrial Classification?*

La principal contribución de este estudio no radica únicamente en describir la presencia de eosinófilos o en medir la IL-33 en la burra, sino en demostrar que el endometrio de este hibrido sigue una lógica fisiopatológica que no coincide completamente con la de la yegua (Walter et al., 2001; Hoffmann et al., 2009; Lehmann et al., 2011). Se demostró que, a medida que aumentaba la gravedad histopatológica, disminuían los recuentos de eosinófilos y neutrófilos, mientras que los transcritos de *IL33* tendían a aumentar desde las categorías moderadas hacia las lesiones más graves. Paralelamente, ni las áreas de colágeno I/III ni los transcritos de COL1A2 y COL3A1 mostraron cambios significativos entre las categorías, lo que sugiere que, en la burra la progresión crónica no puede reducirse a la transición clásica de "lesión más grave = mayor cantidad de colágeno I subepitelial", como se observa en la yegua (Radar-Chafirovitch et al., 2025).

La abundante presencia de eosinófilos en el endometrio de la burra resulta particularmente reveladora. En la yegua, la eosinofilia endometrial es poco frecuente y suele asociarse con procesos de

hipersensibilidad o inflamación atípica (Grimm et al., 2017). En la burra, por el contrario, los eosinófilos parece ser parte del paisaje inmunitario basal del tejido, probablemente relacionados con mecanismos locales de homeostasis e inmunidad innata (Rothenberg & Hogan, 2006; Akuthota & Weller, 2012; Radar-Chafirovitch et al., 2025). Este hallazgo obliga a reconsiderar la interpretación universal de la eosinofilia en équidos, ya que en la burra podría representar un componente fisiológico o parafisiológico del microambiente uterino (Quartuccio et al., 2020; Wu et al., 2024; Radar-Chafirovitch et al., 2025; Vallejo-Soto et al., 2026).

La relación entre los eosinófilos y la IL-33 refuerza esta interpretación. En otros tejidos, la IL-33 actúa como una alarmina y moduladora de las respuestas de tipo 2, promoviendo la infiltración eosinofílica y perpetuando circuitos profibróticos en la piel, el hígado y el intestino (Mchedlidze et al., 2013; Gao et al., 2015; Masterson et al., 2015; Kurimoto et al., 2021; Chan et al., 2019; Carmine et al., 2022). El hecho de que, en la burra, exista una tendencia hacia una correlación positiva entre los eosinófilos y la IL-33 en las categorías menos graves, seguida de un escenario de menor eosinofilia, pero mayor IL-33 en las lesiones avanzadas, sugiere un cambio celular en la fuente de la señal. En otras palabras, cuando la respuesta inflamatoria eosinofílica disminuye, la IL-33 puede seguir siendo liberada por fibroblastos u otras células estromales, manteniendo el tono profibrótico del tejido incluso en ausencia de eosinofilia marcada (Liew, 2012; Miller et al., 2021). Este matiz es importante porque anticipa una idea que reaparece en la mula: la actividad fibrogénica no siempre podría acompañarse de infiltrados inflamatorios exuberantes (Miller et al., 2021).

A diferencia de la yegua, en nuestro estudio realizado en la burra el colágeno tipo III persistió en el estrato compacto incluso en categorías avanzadas, mientras que el colágeno tipo I se concentra en el estroma profundo y las regiones periglandulares. Este patrón rompe con el esquema clásico de reemplazo progresivo de COL3 por COL1 inmediatamente debajo del epitelio luminal y sugiere que la remodelación asinina preserva, por más tiempo, una matriz subepitelial menos rígida o, al menos, una distribuida de manera diferente (Junqueira et al., 1979; Walter et al., 2001; Centeno et al., 2024). Funcionalmente, esto podría traducirse en diferencias en la elasticidad, la señalización mecánica, la migración celular o incluso en la forma en que el epitelio percibe la lesión (Kotsiou et al., 2018). Aunque el estudio no resuelve por sí solo la consecuencia reproductiva de esa distribución establece claramente que el endometrio de la burra no puede interpretarse como una copia reducida del equino.

En consecuencia, nuestro estudio proporciona la referencia parental asina sin la cual el fenotipo de la mula correría el riesgo de ser malinterpretado como una "yegua con lesiones menos severas". Por el contrario, una vez definido el patrón de la burra, se hace evidente que varias características observadas posteriormente en la mula como preservación de la estructura, progresión menos agresiva y una relación no lineal entre inflamación y fibrosis, deben entenderse no solo como una atenuación del modelo de la yegua, sino una posible herencia o reconfiguración híbrida de mecanismos propios del linaje asino (Allen & Short, 1997; Gabryś et al., 2021; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

2. ***Contribución del segundo estudio:*** *Histomorphometric characterization of the endometrium in mules (Equus mulus): An approach to endometritis/endometrosis*

Este estudio constituye el primer análisis cuantitativo integrado del endometrio de la mula y representa un paso decisivo para superar la especulación comparativa basada únicamente en observaciones cualitativas. Sus resultados demuestran que la mula conserva la organización básica del endometrio equino: epitelio luminal, estrato compacto, estrato esponjoso, glándulas, vasos y vasos linfáticos, pero expresa estos componentes en proporciones y relaciones espaciales distintas a las descritas en la yegua. El predominio volumétrico del estrato esponjoso, la menor representación relativa del epitelio y el estrato compacto, así como la abundancia glandular y la preservación general de la arquitectura, configuran un patrón que puede interpretarse como hibrido con sesgo asinino. Este hallazgo concuerda con la literatura que describe las principales variaciones regionales y cíclicas del endometrio en équidos, pero se sugiere que en la mula el sesgo estructural no es meramente fisiológico, sino constitutivo del híbrido (Hanada et al., 2012; Herrera et al., 2018; Silva et al., 2019; Vallejo-Soto et al., 2026).

La interpretación biológica de este predominio del estrato esponjoso merece especial atención. En la yegua, este compartimento es altamente dinámico durante las fases de receptividad y secreción, por lo que un mayor desarrollo relativo podría asociarse con mayor soporte glandular y vascular (Klein, 2016). En la mula, sin embargo, este hallazgo no parece corresponder únicamente a una fase cíclica específica, sino a un patrón estructural repetido observado en las biopsias analizadas.

Esto nos sugiere que el útero hibrido de la mula podría conservar una configuración estromal favorable para la función de soporte y el mantenimiento gestacional, pero no necesariamente para la progresión acelerada hacia la fibrosis crónica grave (Canisso et al., 2019). Esta interpretación resulta coherente con los reportes exitosos de transferencia embrionaria y mantenimiento de gestaciones en mulas receptoras, donde se ha documentado la competencia uterina a pesar de la esterilidad de la especie (González et al., 2015; Camillo et al., 2003; Bottrel et al., 2017; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022; Gambini et al., 2025).

Uno de los resultados más relevantes fue la ausencia de biopsias clasificadas como categoría III en las mulas estudiadas. Aunque este resultado podría interpretarse superficialmente como consecuencia del tamaño muestral; sin embargo, su análisis conjunto con la edad de los animales, su historial de nuliparidad y la condición híbrida sugiere una trayectoria de deterioro endometrial diferente y probablemente más lenta que la descrita en la yegua (Canisso et al., 2019). En la yegua, la progresión hacia endometrosis avanzada se asocia con edad, inflamación recurrente, estímulos reproductivos y remodelación crónica del estroma IIB (Lehmann et al., 2011; Woodward & Troedsson, 2013; Katila & Ferreira-Dias, 2022; Ferreira-Dias et al., 2024). En la mula, donde muchos de estos estímulos se reorganizan o reducen debido a la esterilidad, resulta razonable proponer que el tejido no alcance fácilmente las fases terminales del modelo clásico equino (Canisso et al., 2019). Esta hipótesis ya había sido sugerida por (Canisso et al., 2019) y se ve reforzada por la progresión más lenta descrita en la burra (Radar-Chafirovitch et al., 2025).

No obstante, la ausencia de la categoría III no debe interpretarse como evidencia absoluta de "resistencia a la fibrosis". El propio estudio reconoce limitaciones importantes relacionadas con el rango etario y la ausencia de animales sometidos a manipulación reproductiva intensiva. Por tanto, los resultados sugieren una progresión atenuada o retardada, más que una imposibilidad biológica de desarrollar lesiones severas. Aunque así, la concentración de biopsias en categorías I, IIA y IIB, junto con la preservación de la arquitectura observada, constituye un hallazgo consistente que respalda la hipótesis de que el endometrio de la mula no sigue espontáneamente la misma cinética degenerativa descrita en la yegua (Waelchli & Winder, 1989; Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024).

El estudio también aporta argumentos sólidos para cuestionar la transferencia acrítica del sistema Kenney-Doig a híbridos. La distribución de los hallazgos en la mula revela un espacio intermedio donde existen signos de remodelación e inflamación, pero sin la desorganización destructiva característica de la categoría III equina. En este contexto, la propuesta de una subcategoría IIC no representa una concesión taxonómica, sino una necesidad epistemológica orientada a describir tejidos híbridos que no responden completamente a la lógica de progresión de la yegua. Este planteamiento resulta coherente con estudios recientes que incluso en yeguas han propuesto sistemas complementarios para reducir la ambigüedad diagnóstica y capturar con mayor precisión la heterogeneidad histológica diagnóstica (Kenney & Doig, 1986; Waelchli & Winder, 1989; Snider et al., 2011; Adavoudi & Pilot, 2022; Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024; Runemark et al., 2025). En la mula, esta necesidad es aún mayor porque la especie también introduce el factor de la hibridación.

El componente molecular del estudio aporta una dimensión adicional a esta interpretación. El incremento de la expresión génica de *IL1B, IL6* y *TNFα* en las categorías superiores, acompañado por expresión de *TGFβ*, indica que la mula activa programas inflamatorios y de remodelación tisular comparables a los descritos en la yegua (Woodward & Troedsson, 2013; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Elshalofy et al., 2022; Zhang et al., 2023; Lection et al., 2024; Wong et al., 2024; Ferreira-Dias et al., 2024). Sin embargo, la diferencia parece radicar no en la existencia del proceso inflamatorio, sino en su intensidad, distribución y descenlace biológico. Mientras que en la yegua estos mediadores suelen asociarse con progresión hacia fibrosis consolidada, en la mula el perfil observado parece corresponder a estados tempranos o intermedios de reorganización tisular. Este matiz resulta particularmente importante porque prepara el escenario conceptual para los hallazgos del tercer estudio, donde el comportamiento del tejido híbrido se redefine mediante herramientas más sensibles que la histología convencional.

Otro hallazgo relevante fue la coexistencia entre preservación global de la arquitectura y modificaciones focales en vasos linfáticos, densidad celular y compartimento glandular. La reducción del componente celular en el estrato esponjoso y ciertos cambios en el área glandular sugieren que la mula no está exenta de la reorganización tisular; sin embargo, la distribución y organización de dicha remodelación parece diferir del patrón observado en la yegua. En esta

última, las alteraciones linfáticas y la deficiente limpieza uterina se han relacionado con la susceptibilidad a endometritis persistente y a la acumulación de líquido poscoital (LeBlanc et al., 1994; Morris et al., 2020; Katila & Ferreira-Dias, 2022). En la mula, por el contrario, la interpretación de los vasos linfáticos dilatados o las variaciones estromales debe abordarse con mayor cautela, ya que estos hallazgos no implican necesariamente el mismo defecto funcional descrito en la yegua, especialmente cuando el tejido conserva una organización estructural robusta. En el modelo equino clásico, la dilatación linfática se ha asociado con cambios degenerativos endometriales, fibrosis, drenaje deficiente y una reducción variable del potencial reproductivo; sin embargo, su significado en los híbridos de mulares aún no está suficientemente caracterizado. Por lo tanto, estos hallazgos podrían interpretarse preliminarmente como una posible forma híbrida de adaptación mecánica o drenaje tisular, en lugar de como evidencia directa de disfunción endometrial avanzada (Schöniger & Schoon, 2020; Muderspach et al., 2024; Zdrojkowski et al., 2024). Por lo tanto, es preciso haber cuantificado estos componentes, creando así una base de referencia con la que futuros estudios podrán correlacionar la morfometría, la contractilidad uterina, el aclaramiento luminal y el éxito gestacional.

Así mismo, el sesgo asinino observado en la mula no se fundamenta únicamente en impresiones comparativas cualitativas, sino en una convergencia de múltiples evidencias: predominio del estrato esponjoso, preservación arquitectónica, ausencia de lesiones terminales y un patrón de activación inflamatorio moderado. Esta convergencia reduce el riesgo de sobre interpretación y fortalece la hipótesis de un fenotipo hibrido biológicamente coherente. Al mismo tiempo, la mula se diferencia claramente de la burra al no presentar eosinofilia basal prominente. En consecuencia, el híbrido no puede interpretarse mediante una lógica dicotómica de semejanza simple; su identidad histológica emerge precisamente de la coexistencia de coincidencias parciales y divergencias selectivas. Conceptualmente, este hallazgo es consistente con estudios de hibridación en mamíferos, donde los rasgos morfológicos y moleculares rara vez siguen patrones puramente intermedios y, en cambio, tienden a reorganizarse en combinaciones específicas de cada híbrido (Allen & Short, 1997; Fennessy, 1997; Gabryś et al., 2021; Adavoudi & Pilot, 2022; Radar-Chafirovitch et al., 2025; Runemark et al., 2025).

3. ***Contribución del tercer estudio:*** *Histopathological, Immunohistochemical,*

and Molecular Characterization of Endometrial Remodeling in Mules (Equus mulus) Compared with Mares (Equus caballus)

La interpretación del endometrio de la mula no puede basarse únicamente en la histología convencional. La comparación inicial entre yegua, burra, y mula mostró que la eosinofilia característica del endometrio asino no se reproduce en la mula (Grimm et al., 2017; Radar-Chafirovitch et al., 2025). Este hallazgo posee una relevancia interpretativa considerable, ya que indica que el sistema inmunitario uterino del híbrido no ocupa simplemente un punto intermedio entre las especies parentales, sino que comparte mayor similitud con la yegua respecto al componente eosinofílico basal. Desde la perspectiva de la biología híbrida, este compartimiento coincide con revisores que describen como la hibridación rara vez produce fenotipos estrictamente intermedios, favoreciendo en cambio combinaciones no aditivas, silenciamiento selectivo de rasgos parentales y trayectorias transgresivas de organización tisular y expresión génica (Gabryś et al., 2021; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

La evaluación inmunohistoquímica de vimentina permitió profundizar aún más en esta interpretación. En la yegua, el incremento de vimentina y la diferenciación miofibroblástica periglandular se ha asociado con la activación del estroma y progresión de la endometrosis (Walter et al., 2001; Hoffmann et al., 2009a; Lehmann et al., 2011). El tercer estudio, confirmó esta lógica en la yegua, pero mostró que en la mula la respuesta fibroblástica resulta considerablemente más discreta. El menor número de capas de fibroblastos positivos para vimentina alrededor de las glándulas sugiere un estroma menos reactivo o con una transición más lenta hacia la fibrosis consolidada. En otras palabras, la lesión en la mula no parece deberse a la ausencia de estímulo, sino a una modulación diferente de la activación estromal (Aresu et al., 2012). Esta observación concuerda con los hallazgos del segundo estudio, donde las lesiones moderadas no culminaban en colapso estructural severo, y también dialoga con el patrón asinino, caracterizado por una remodelación distribuida de manera diferente a la descrita en la yegua.

La persistencia de inmunorreactividad para citoqueratina en la mayoría de las glándulas de la mula refuerza aún más esta interpretación. En la endometrosis avanzada de la yegua, la pérdida de la integridad epitelial y la alteración de la secreción glandular forman parte del deterioro funcional

del tejido, y diversos estudios han demostrado que los cambios en los perfiles secretores o los marcadores epiteliales acompañan la gravedad de la lesión (Hoffmann et al., 2009b; Lehmann et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). El hecho de que la mula conserve expresión de citoqueratina en glándulas que histológicamente ya muestran cambios moderados indica que la interacción epitelio-estroma no se desorganiza tan rápidamente como en la yegua. Por lo tanto, una categoría histológica no implica necesariamente equivalencia funcional entre especies, ya que grados morfológicos similares pueden reflejar estados biológicos profundamente diferentes.

Los receptores de esteroides aportaron una dimensión funcional adicional a esta interpretación. En la yegua, la disminución de los receptores de estrógeno y progesterona en áreas fibróticas se ha asociado con la pérdida de plasticidad tisular y con el deterioro de la respuesta endocrina local (Hoffmann et al., 2009b; Lehmann et al., 2011; Jasiński et al., 2022). En la mula, por el contrario, el mantenimiento de la inmunorreactividad nuclear para receptores de estrógenos (RE) y receptores de progesterona (PR) en una proporción considerable de biopsias sugiere que el tejido conserva una competencia hormonal mayor de la esperada para su grado histológico. Esto no implica que el endometrio de la mula sea "normal" en presencia de lesiones, pero sí sugiere que su margen de reversibilidad o compensación funcional podría ser mayor. En consecuencia, el eje diagnóstico deja de centrarse exclusivamente en la cuantificación morfológica del daño y pasa a incorporar la capacidad residual del tejido para responder, adaptarse o recuperarse.

La incorporación de microscopia de generación de segundo armónico (SHG) permitió evaluar un nivel de organización del colágeno que la histología convencional no siempre detecta. SHG es altamente específica para el colágeno fibrilar y particularmente sensible a cambios supramoleculares en la matriz extracelular, permitiendo detectar reorganización fibrilar y el ensamblaje del colágeno antes de que la fibrosis sea evidente mediante tinciones rutinarias (Strupler et al., 2007; Campagnola, 2011; Cox, 2011; Chen et al., 2012). En muestras de mula clasificadas como categoría IIA, la señal SHG mostró remodelación estromal sin depósitos de colágeno completamente organizados; en la categoría IIB, en cambio, comenzaron a observarse fibras heterogéneas e incipientes. Este patrón identifica un estado de transición en el que el tejido ya ha iniciado una vía fibrótica, pero aún no consolida una matriz densa y uniformemente organizada. En otras palabras, la mula parece desarrollar una fibrosis en formación más que una

fibrósis terminal completamente establecida.

La evaluación mediante SHG también ayuda a redefinir la posición biológica de la mula dentro del continuo yegua-burra. La yegua suele presentar una progresión más evidente hacia la acumulación organizada de colágeno periglandular y estromal conforme avanza la endometrosis (Walter et al., 2001; Lehmann et al., 2011; Centeno et al., 2024). La burra, por el contrario, conserva el colágeno III en el estrato compacto y expresa un patrón de remodelación distintivamente asinino. La mula no reproduce completamente ninguno de estos escenarios: no presenta la eosinofilia basal ni la activación inflamatoria típica de la burra, pero tampoco alcanza la densidad y organización del colágeno de la yegua en categorías comparables (Centeno et al., 2024). El panorama que emerge es el de una vía fibrótica desacoplada, donde la remodelación está presente, pero la maduración y ensamblaje de la matriz progresan de forma más irregular y probablemente más lenta.

La comparación transcriptómica entre yeguas y mulas consolido esta interpretación. Mientras que la yegua mostró incremento progresivo de *IL1β, IL6* y *TNFα* acompañado de una participación de *TGFβ* como eje principal de la activación profibrótica principal, la mula mantuvo niveles relativamente atenuados de estos mediadores incluso en presencia de alteraciones histológicas evidentes (Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Elshalofy et al., 2022; Zhang et al., 2023; Wong et al., 2024; Ferreira-Dias et al., 2024). La importancia de este hallazgo radica en demostrar una disociación relativa entre la categoría histológica y la intensidad del programa molecular. Esta disociación explica por qué una biopsia de mula con lesión moderada no debe interpretarse automáticamente con el mismo pronóstico que una biopsia equina de igual categoría (Lection et al., 2024; Ulaangerel et al., 2025).

En consecuencia, los resultados del tercer estudio respaldan una redefinición del concepto de "daño endometrial" en la mula. En esta especie, el daño no puede reducirse a una escala lineal de fibrosis histológica, sino que debe incorporar la respuesta fibroblástica, la integridad epitelial, la competencia hormonal y la organización supramolecular del colágeno (Campagnola, 2011; Schöniger & Schoon, 2020; Zdrojkowski et al., 2024). Esta aproximación multimodal no solo mejora el diagnóstico del tejido híbrido, sino que además plantea una pregunta biológica de mayor

alcance: ¿qué mecanismos permiten que un útero con remodelación activa limite la progresión hacia fibrosis irreversible? (Zeisberg & Kalluri, 2013; Centeno et al., 2024). Desde esta perspectiva, la mula adquiere valor no porque carezca de lesiones, sino porque parece contenerlas mediante una dinámica biológica distinta.

Asimismo, nuestros resultados demuestran que la heterogeneidad diagnóstica no ocurre únicamente entre categorías histológicas, sino también dentro de cada categoría. Dos biopsias de mula clasificadas como IIB pueden compartir la misma denominación histológica y, sin embargo, diferir marcadamente en el número de fibroblastos positivos para vimentina, la continuidad de la citoqueratina glandular, la intensidad de los receptores hormonales y la organización fibrilar detectada mediante SHG. Este hallazgo posee una consecuencia práctica inmediata: la clasificación ordinal por sí sola no agota el contenido biológico de la lesión. En la yegua, esta heterogeneidad ya había sido sugerida por estudios morfofuncionales y por la variabilidad interobservador del sistema Kenney-Doig (Lehmann et al., 2011; Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024). En la mula, sin embargo, la evidencia indica que parte de esta heterogeneidad refleja una biología intrínseca del híbrido y no únicamente limitaciones diagnósticas del observador. Por lo tanto, los resultados respaldan el desarrollo de modelos de diagnóstico estratificados e integrados que incluyan morfología, inmunofenotipo, firma molecular y organización de la matriz extracelular.

La aparente preservación funcional del tejido híbrido también obliga a reconsiderar la clásica oposición entre inflamación y degeneración. En la yegua, la fibrosis severa suele acompañarse de alteración glandular irreversible y deterioro pronunciado del pronóstico reproductivo (Lehmann et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020).

En la mula, por el contrario, los hallazgos observados sugieren que la remodelación tisular puede persistir durante un período más prolongado en una fase relativamente plástica, caracterizada por la activación del estroma y la reorganización de la matriz extracelular sin una pérdida completa de la integridad epitelial ni de los mecanismos de señalización hormonal. Esta interpretación plantea la posibilidad de una "ventana biológica" para la intervención temprana, en la que algunas lesiones podrían corresponder a estados potencialmente reversibles en lugar de una fibrosis terminal

consolidada. Si bien esta hipótesis requiere una mayor validación funcional, es coherente con el uso cada vez mayor de biomarcadores moleculares y enfoques transcriptómicos dirigidos a distinguir la inflamación activa, la subfertilidad y los cambios degenerativos progresivos en el endometrio equino (Elshalofy et al., 2022; Lection et al., 2024; Ferreira-Dias et al., 2024; Teixeira-Soares et al., 2025).

4. El endometrio de la mula como modelo de estudio

En conjunto, los hallazgos de esta tesis permiten proponer que el endometrio de la mula expresa una trayectoria híbrida de remodelación atenuada. Esta trayectoria combina, por un lado, afinidades estructurales con la burra y predominio del estrato esponjoso, preservación de la arquitectura y progresión menos agresiva y, por otro, una inmunobiología más cercana a la yegua en relación con la ausencia de eosinofilia basal prominente. Como resultado, emerge una configuración tisular singular: un sesgo asino en la organización estructural, un sesgo equino en parte del tono inmunitario y una respuesta estromal propia en cuanto a la progresión hacia la fibrosis. Este tipo de reorganización coincide con la literatura sobre híbridos, donde la expresión génica y los fenotipos tisulares responden frecuentemente a interacciones regulatorias no aditivas, silenciamiento selectivo de rasgos parentales y la aparición de nuevas trayectorias biológicas en las vías de señalización tisular (Allen & Short, 1997; Gabryś et al., 2021; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025).

Dentro de ese modelo, la yegua y la burra representarían dos polos interpretativos útiles, aunque insuficientes por sí solos. La yegua muestra una evolución histológica del endometrio relativamente bien caracterizada entre inflamación, activación fibroblástica, pérdida glandular y fibrosis crónica (Jasiński et al., 2022; Centeno et al., 2024; Rebordão et al., 2014). La burra, en contraste, combina eosinofilia basal, expresión de *IL33* y una distribución particular del colágeno. La mula parece operar con un "freno biológico" en algún punto del eje que conecta inflamación, diferenciación fibroblástica y ensamblaje de la matriz extracelular. Ese freno podría relacionarse con menor amplificación de citoquinas, diferente sensibilidad estromal al TGF-β, mayor preservación de señalización hormonal, una matriz inicial distinta o incluso efectos epigenéticos derivados de la hibridación (Zeisberg & Kalluri, 2013; Szóstek-Mioduchowska et al., 2019; Zhang

et al., 2023 Wong et al., 2024). La evidencia convergente obtenida respalda que la progresión endometrial en la mula es cuantitativa y cualitativamente distinta de la progresión equina clásica.

Este modelo también explica por qué la propuesta de una categoría IIC, o incluso de un enfoque diagnóstico específico para híbridos, resulta metodológicamente razonable. Si el tejido de la mula inicia remodelación, pero retrasa la consolidación fibrótica, entonces parte del universo diagnóstico estará constituido por lesiones moderadas con marcada heterogeneidad funcional. Dicho grupo incluiría biopsias con fibrosis incipiente, citocinas moderadamente elevadas, integridad epitelial aún preservada y señales SHG compatibles con reorganización temprana de colágeno. Clasificar ese conjunto simplemente como IIB podría ocultar su singularidad biológica, mientras que asignarlo a categoría III sería claramente excesivo (Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024). En consecuencia, la principal contribución conceptual de nuestra tesis no reside únicamente en describir una especie poco estudiada, sino en proponer una ampliación del marco diagnóstico cuando este se aplica a híbridos (Kenney & Doig, 1986; Snider et al., 2011).

5. Implicaciones diagnósticas, clínicas y biotecnológicas

Proponemos en primer lugar que una biopsia endometrial de mula no debe interpretarse automáticamente como equivalente a una biopsia de yegua. Hallazgos como fibrosis periglandular moderada, glándulas dilatadas o alteraciones estromales pueden poseer un significado pronóstico diferente si coexisten con la preservación de citoqueratina, receptores hormonales de esteroides y baja activación molecular profibrótica (Lehmann et al., 2011; Schöniger & Schoon, 2020). En segundo lugar, aunque la histología convencional continúa siendo indispensable, resulta insuficiente para comprender la magnitud biológica de las lesiones en el híbrido (Westendorf et al., 2022a; Westendorf et al., 2022b; Martínez-Bartolomé et al., 2024). Finalmente, la integración con inmunohistoquímica, qPCR y SHG no representa un lujo metodológico, sino una condición necesaria para evitar el sobrediagnóstico de fibrosis irreversible en una especie cuyo tejido parece conservar mayor resiliencia funcional.

Estas consideraciones adquieren especial relevancia dentro de los programas de transferencia

embrionaria. La capacidad de las mulas para actuar como receptoras de embriones de equinos y asininos, e inclusos mantener gestaciones entre mulas, demuestra que su útero es clínicamente competente en determinadas condiciones (Davies et al., 1985; Camillo et al., 2003; Bottrel et al., 2017; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). En consecuencia, comprender con mayor precisión el significado biológico de sus alteraciones endometriales podría mejorar la selección de receptoras y evitar exclusiones innecesarias basadas en criterios diseñados para yeguas (Canisso et al., 2019; Gambini et al., 2025). Si la mula mantiene integridad epitelial y competencia hormonal a pesar de lesiones moderadas, entonces parte de las biopsias consideradas "subóptimas" bajo lógica equina podrían continuar siendo funcionalmente adecuadas en el contexto híbrido (González et al., 2015; Camargo et al., 2020).

Existe además una consecuencia conceptual de mayor alcance: el endometrio de la mula emerge como un modelo comparativo para estudiar la resiliencia uterina y los mecanismos naturales de contención de la fibrogénesis. La mayor parte de las investigaciones sobre endometrosis se han concentrado comprensiblemente en la yegua; sin embargo, un modelo biológico que presenta remodelación moderada con progresión limitada ofrece una oportunidad singular para identificar puntos de control que, en la especie equina, pueden desregularse o fracasar (Ferreira-Dias et al., 2024L; Rebordão et al., 2014; Rebordão et al., 2018; Rebordão et al., 2019; Centeno et al., 2024). Desde esta perspectiva, la mula no posee únicamente interés veterinario aplicado, sino también valor biológico comparativo para comprender por qué algunos úteros progresan rápidamente hacia fibrosis irreversible mientras otros parecen contenerla (Zeisberg & Kalluri, 2013). Por lo tanto, podemos proyectar estos hallazgos más allá de la clínica del híbrido y situarlos dentro del problema general de la fibrosis reproductiva.

Desde una perspectiva biotecnológica, los resultados también obligan a reconsiderar el valor de la mula en los programas de reproducción asistida. Históricamente, su uso como receptora se interpretaba principalmente como una alternativa pragmática; sin embargo, los hallazgos aquí presentados sugieren que esta utilidad podría sustentarse sobre una base tisular específica (Canisso et al., 2019; Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022). Un útero que preserva su arquitectura mantiene señalización hormonal y limita la maduración fibrótica, podría resultar particularmente adecuado para sostener gestaciones interespecíficas o inter subespecíficas bajo condiciones

controladas. Esto no implica afirmar la superioridad universal de la mula como receptora, ya que intervienen múltiples factores relacionados con el embrión, manejo y sincronización endocrina (Allen, 2005; Bottrel et al., 2017; Mahmood et al., 2024). No obstante, permite proponer que parte de su desempeño reproductivo podría explicarse por una biología endometrial menos propensa a fibrosis terminal (Canisso et al., 2019; Gambini et al., 2025). Esta hipótesis merece evaluación prospectiva y representa una de las proyecciones traslacionales más relevantes derivadas de esta tesis (Gambini et al., 2025).

6. Limitaciones y perspectivas futuras

Es prioritario correlacionar la clasificación histológica específica de los híbridos con las tasas reales de embarazo y el mantenimiento de la gestación en los programas de transferencia embrionaria (Camargo et al., 2020; Gambini et al., 2025; Fanelli et al., 2022). Del mismo modo, será necesario ampliar el panel molecular hacia vías reguladoras adicionales relacionadas con remodelación de matriz extracelular y activación fibroblástica, incluyendo *COL1A1, COL3A1, MMP2, TIMP2, ACTA2* y *TGFβ1*, así como integrar transcriptómica espacial, proteómica y aproximaciones de biología de sistemas orientadas a diferenciar compartimentos estromales y epiteliales (Centeno et al., 2024; Ulaangerel et al., 2025; Teixeira-Soares et al., 2025). La incorporación de estas herramientas permitirá definir con mayor precisión qué mecanismos moleculares limitan la progresión hacia fibrosis irreversible en el tejido híbrido y cuales representan simples variaciones temporales dentro del proceso de remodelación.

Otro aspecto prioritario será correlacionar las categorías histológicas específicas propuestas para híbridos con resultados reproductivos reales en programas de transferencia embrionaria. Aunque diversos estudios han demostrado que las mulas pueden actuar exitosamente como receptoras (Camargo et al., 2020; Fanelli et al., 2022; Gambini et al., 2025), aún no existe una correlación directa entre características histológicas, perfiles moleculares y tasas de mantenimiento gestacional en esta especie. En este sentido, la validación clínica de categorías diagnósticas adaptadas constituirá un paso indispensable para trasladar los hallazgos experimnetales hacia aplicaciones reproductivas prácticas.

Asimismo, la validación de SHG como herramienta complementaria de rutina podría transformar el diagnóstico temprano de fibrosis subclínica en équidos e híbridos. La capacidad de esta técnica para detectar reorganización fibrilar antes de que la fibrosis sea evidente mediante histología convencional la convierte en una herramienta particularmente prometedora para estudios comparativos y evaluación pronóstica (Strupler et al., 2007; Campagnola, 2011; Chen et al., 2012; Nejim et al., 2022; Martínez-Bartolomé et al., 2024). La integración futura de SHG con inteligencia artificial, análisis morfométrico automatizado y modelos predictivos podría abrir nuevas posibilidades para la clasificación objetiva de remodelación endometrial.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el endometrio de la mula posee un fenotipo estructural y molecular propio dentro de la familia *Equidae*. La burra proporciona la referencia asinina caracterizada por eosinofilia basal, expresión de *IL33* y persistencia subepitelial de colágeno tipo III; la yegua representa el paradigma clásico de progresión inflamatoria-fibrótica hacia la endometrosis avanzada (Walter et al., 2001; Centeno et al., 2024). La mula, sin embargo, ocupa un espacio biológico distinto, caracterizado por una arquitectura con sesgo asinino, ausencia de eosinofilia basal prominente, activación fibroblástica moderada, preservación epitelial y hormonal, y reorganización heterogénea del colágeno detectada mediante SHG, compatible con una transición lenta y potencialmente reversible (Canisso et al., 2019).

Por lo tanto, la biopsia endometrial de la mula no debe interpretarse como una simple variación menor del modelo equino clásico, sino como la expresión de una biología híbrida que requiera categorías diagnósticas adaptadas e interpretación multimodal. La principal contribución de este compendio reside precisamente en transformar una laguna descriptiva en un modelo explicativo integrado. A partir de estos datos generados, la mula deja de ser un híbrido reproductivamente curiosos y se convierte en un sistema comparativo de gran valor para estudiar la regulación de la fibrosis endometrial, resiliencia uterina y remodelación tisular en *équidos* (Canisso et al., 2019).

Este cambio de perspectiva posee relevancia metodológica, clínica y biológica. Metodologicamente, porque justifica la adaptación del diagnóstico histopatológico cuando se aplica a híbridos; clinicamente, porque refina la selección y evaluación de receptoras en reproducción asistida; y biológicamente, porque abre la posibilidad de identificar mecanismos

naturales capaces de contener la progresión fibrótica (Allen, 2005; Adavoudi & Pilot, 2022; Runemark et al., 2025; Gambini et al., 2025). En ese sentido, esta tesis doctoral no se limita a describir el endometrio de la mula, sino que propone una nueva forma de interpretar la patología uterina comparada dentro de la familia *Equidae*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. El endometrio de la burra presenta características histopatológicas e inmunobiológicas propias que no pueden interpretarse mediante el modelo clásico de la yegua. La presencia de eosinófilos, la expresión de *IL-33* y la persistencia de colágeno tipo III indican una trayectoria específi remodelación endometrial.

2. El endometrio de la mula corresponde a un fenotipo híbrido con sesgo parental y organización estructural propia. Su arquitectura no reproduce completamente ni el patrón de la yegua ni el de la burra.

3. La caracterización del endometrio de la mula requiere un enfoque multimodal. La integración de histopatología, inmunohistoquímica, expresión génica y microscopía SHG demuestra una remodelación tisular más atenuada, heterogénea y potencialmente reversible que en la endometrosis avanzada de la yegua.

4. La preservación relativa de la integridad epitelial y la expresión de receptores de esteroides, junto con una menor activación proinflamatoria y profibrótica, respalda la existencia de una trayectoria propia de remodelación endometrial en la mula.

5. El endometrio de la mula representa un modelo comparativo valioso para investigar los mecanismos que regulan la fibrosis, la remodelación tisular y la resiliencia uterina en los équidos.

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

Adavoudi, R., & Pilot, M. (2022). Consequences of hybridization in mammals: A systematic review. *Genes*, *13*(1), 50. https://doi.org/10.3390/GENES13010050/S1

Akuthota, P., & Weller, P. F. (2012). Eosinophils and disease pathogenesis. *Seminars in Hematology*, *49*(2), 113–119. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2012.01.005

Allen, W. R. (2005). The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *40*(4), 310–329. https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2005.00602.X

Allen, W. R., & Short, R. V. (1997). Interspecific and extraspecific pregnancies in equids: anything goes. *The Journal of Heredity*, *88*(5), 384–392. https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JHERED.A023123

Alpoim-Moreira, J., Fernandes, C., Pimenta, J., Bliebernicht, M., Rebordão, M. R., Castelo-Branco, P., Szóstek-Mioduchowska, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2022). Metallopeptidades 2 and 9 genes epigenetically modulate equine endometrial fibrosis. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*, 970003. https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.970003/TEXT

Amaral, A., Agnieszka, S., Marta, C. P., Pawel, K., Dariusz, S., Graça, F. D., & Szóstek-Mioduchowska, A. (2025). Ovarian steroids modulate mRNA expression of ECM associated genes and collagen deposition induced by TGF β1 in equine endometrium in vitro. *Scientific Reports*, *15*(1), 538. https://doi.org/10.1038/S41598-024-84250-1

Aresu, L., Benali, S., Giannuzzi, D., Mantovani, R., Castagnaro, M., & Falomo, M. E. (2012). The role of inflammation and matrix metalloproteinases in equine endometriosis. *Journal of Veterinary Science*, *13*(2), 171. https://doi.org/10.4142/JVS.2012.13.2.171

Benirschke, K., Brownhill, L. E., & Beath, M. M. (1962). Somatic chromosomes of the horse, the donkey and their hybrids, the mule and the hinny. *Journal of Reproduction and Fertility*, *4*(3), 319–326. https://doi.org/10.1530/JRF.0.0040319

Bottrel, M., Fortes, T., Ortiz, I., Hidalgo, M., & Dorado, J. (2017). Short communication: Establishment and maintenance of donkey-in-mule pregnancy after embryo transfer in a non-cycling mule treated with oestradiol benzoate and long-acting progesterone. *Spanish Journal of Agricultural Research*, *15*(4), e04SC01-e04SC01. https://doi.org/10.5424/SJAR/2017154-11653

Camargo, C. E., Rechsteiner, S. F., Macan, R. C., Kozicki, L. E., Gastal, M. O., & Gastal, E. L. (2020). The mule (Equus mulus) as a recipient of horse (Equus caballus) embryos: Comparative aspects of early pregnancy with mares: The mule as a recipient of horse embryos. *Theriogenology*, *145*, 217–225.

https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.029

Camillo, F., Vannozzi, I., Rota, A., Di Luzio, B., Romagnoli, S., Aria, G., & Allen, W. R. (2003). Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *38*(5), 380–385. https://doi.org/10.1046/J.1439-0531.2003.00444.X

Campagnola, P. (2011). Second harmonic generation imaging microscopy: applications to diseases diagnostics. *Analytical Chemistry*, *83*(9), 3224–3231. https://doi.org/10.1021/AC1032325

Canisso, I. F., Panzani, D., Miró, J., & Ellerbrock, R. E. (2019). Key Aspects of Donkey and Mule Reproduction. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, *35*(3), 607–642. https://doi.org/10.1016/J.CVEQ.2019.08.014

Carmine, S. Di, Scott, M. M., McLean, M. H., & McSorley, H. J. (2022). The role of interleukin-33 in organ fibrosis. *Discovery Immunology*, *1*(1), kyac006. https://doi.org/10.1093/DISCIM/KYAC006

Centeno, L. A. M., Bastos, H. B. A., Bueno, V. L. C., Trentin, J. M., Fiorenza, M. F., Panziera, W., Winter, G. H. Z., Kretzmann, N. A., Fiala-Rechsteiner, S., Mattos, R. C., & Rubin, M. I. B. (2024). Collagen and collagenases in mare's endometrium with endometrosis. *Theriogenology*, *230*, 28–36. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.08.031

Chan, B. C. L., Lam, C. W. K., Tam, L. S., & Wong, C. K. (2019). IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Immunology*, *10*(MAR), 364. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.00364

Chen, X., Nadiarynkh, O., Plotnikov, S., & Campagnola, P. J. (2012). Second harmonic generation microscopy for quantitative analysis of collagen fibrillar structure. *Nature Protocols*, *7*(4), 654. https://doi.org/10.1038/NPROT.2012.009

Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A. M., Jacobsen, S., Petersen, M. R., Troedsson, M. H. T., & Lehn-Jensen, H. (2012). Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Veterinary Research 2012 8:1*, *8*(1), 41-. https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-41

Cox, G. (2011). Biological applications of second harmonic imaging. *Biophysical Reviews*, *3*(3), 131. https://doi.org/10.1007/S12551-011-0052-9

Davies, C. J., Antczak, D. F., & Allen, W. R. (1985). Reproduction in mules: Embryo transfer using sterile recipients. *Equine Veterinary Journal*, *17*(S3), 63–67. https://doi.org/10.1111/J.2042-3306.1985.TB04595.X

de Castro, T., van Heule, M., Domingues, R. R., Jacob, J. C. F., Daels, P. F., Meyers, S. A., Conley, A. J., & Dini, P. (2024). Embryo-endometrial interaction associated with the location of the embryo during the mobility phase in mares. *Scientific Reports 2024 14:1*, *14*(1), 3151-.

https://doi.org/10.1038/s41598-024-53578-z

Drzewiecka, E. M., Molcan, T., Sadowska, A., Piotrowska-Tomala, K., Słyszewska, M., Dias, G. F., Skarżyński, D. J., & Szóstek-Mioduchowska, A. (2025). The myometrial transcriptome changes in mares with endometrosis. *Scientific Reports 2025 15:1*, *15*(1), 3173-. https://doi.org/10.1038/s41598-025-86742-0

Elshalofy, A., Wagener, K., Weber, K., Blanco, M., Bauersachs, S., & Bollwein, H. (2022). Identification of genes associated with susceptibility to persistent breeding-induced endometritis by RNA-sequencing of uterine cytobrush samples. *Reproductive Biology*, *22*(2), 100577. https://doi.org/10.1016/J.REPBIO.2021.100577

Fanelli, D., Losinno, L., Castañeira, C., Alonso, C., Bragulat, A., Panzani, D., Bocci, C., Degl'Innocenti, A., Moroni, R., Camillo, F., Wilsher, S., & (Twink) Allen, W. (2022). First report of mule-in-mule pregnancies with live births following embryo transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, *113*, 103999. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2022.103999

Fennessy, P. (1997). Interspecies Hybrids: Some Thoughts. *Journal of Heredity*, *88*(5), 353–354. https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.JHERED.A023116

Ferreira-Dias, G. M. L., Alpoim-Moreira, J., Szóstek-Mioduchowska, A., Rebordão, M. R., & Skarzynski, D. J. (2024). The path to fertility: Current approaches to mare endometritis and endometrosis. *Animal Reproduction*, *21*(3), e20240070. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2024-0070

Gabryś, J., Kij, B., Kochan, J., & Bugno-Poniewierska, M. (2021). Interspecific hybrids of animals - in nature, breeding and science – a review. *Annals of Animal Science*, *21*(2), 403–415. https://doi.org/10.2478/AOAS-2020-0082

Gambini, A., Smith, J. M., Gurkin, R. J., & Palacios, P. D. (2025). Current and Emerging Advanced Techniques for Breeding Donkeys and Mules. *Animals 2025, Vol. 15, Page 990*, *15*(7), 990. https://doi.org/10.3390/ANI15070990

Gao, Q., Li, Y., & Li, M. (2015). The potential role of IL-33/ST2 signaling in fibrotic diseases. *Journal of Leukocyte Biology*, *98*(1), 15–22. https://doi.org/10.1189/JLB.3RU0115-012R

González, S. M., Gomes, R. G., Souza, A. K., Silva, C. B., Silva-Santos, K. C., & Seneda, M. M. (2015). Evidences of Regular Estrous Cycles in Mules and Successful Use of These Animals as Recipients for Donkey Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, *35*(10), 869–872. https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2015.07.010

Grimm, A. L., Schoon, H. A., & Schöniger, S. (2017). Histopathological features of endometritis eosinophilica in mares. *Histology and Histopathology*, *32*(11), 1161–1173. https://doi.org/10.14670/HH-11-872

Hanada, M., Maeda, Y., & Oikawa, M. aki. (2012). Equine Endometrial Gland Density and

Endometrial Thickness Vary among Sampling Sites in Thoroughbred Mares. *Journal of Equine Science*, *23*(3), 35. https://doi.org/10.1294/JES.23.35

Herrera, M., Herrera, J. M., Cantatore, S., Aguilar, J., Felipe, A., & Fumuso, E. (2018). Comparative histomorphological study of endometrium in mares. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, *47*(2), 153–158. https://doi.org/10.1111/AHE.12335

Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Aupperle, H., Ellenberger, C., & Schoon, H. A. (2009a). Immunohistochemical and histochemical identification of proteins and carbohydrates in the equine endometrium. Expression patterns for mares suffering from endometrosis. *Theriogenology*, *71*(2), 264–274. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.07.008

Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., & Schoon, H. A. (2009b). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal Reproduction Science*, *111*(2–4), 261–278. https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.03.019

Jasiński, T., Zdrojkowski, Ł., Ferreira-Dias, G., Kautz, E., Juszczuk-Kubiak, E., & Domino, M. (2022a). Molecular Mechanism of Equine Endometrosis: The NF-κB-Dependent Pathway Underlies the Ovarian Steroid Receptors' Dysfunction. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(13), 7360. https://doi.org/10.3390/IJMS23137360

Junqueira, L. C. U., Bignolas, G., & Brentani, R. R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical Journal*, *11*(4), 447–455. https://doi.org/10.1007/BF01002772

Katila, T., & Ferreira-Dias, G. (2022). Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *12*(6), 779. https://doi.org/10.3390/ANI12060779

Kenney, RM y Doig, P. (1986). *Kenney, RM y Doig, PA (1986) Biopsia endometrial equina. En Morrow, DA, Ed., Current Therapy in Theriogenology, WB Saunders, Filadelfia, 723-729. - Referencias - Scientific Research Publishing*. Theriogenology. https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=794213

Kenney, R. M. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *172*(3), 241–262. https://doi.org/10.2460/javma.1978.172.03.241

Killisch, R., Böttcher, D., Theuß, T., Edzards, H., Martinsson, G., Einspanier, A., Gottschalk, J., & Schoon, H. A. (2017). Seasonal or pathological findings? Morphofunctional characteristics of the equine endometrium during the autumn and spring transition. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*(6), 1011–1018. https://doi.org/10.1111/RDA.13016

Klein, C. (2016). Early pregnancy in the mare: old concepts revisited. *Domestic Animal Endocrinology*, *56 Suppl*, S212–S217. https://doi.org/10.1016/J.DOMANIEND.2016.03.006

Kotsiou, O. S., Gourgoulianis, K. I., & Zarogiannis, S. G. (2018). IL-33/ST2 axis in organ fibrosis.

Frontiers in Immunology, *9*(OCT), 404925. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02432/FULL

Kurimoto, M., Watanabe, T., Kamata, K., Minaga, K., & Kudo, M. (2021). IL-33 as a Critical Cytokine for Inflammation and Fibrosis in Inflammatory Bowel Diseases and Pancreatitis. *Frontiers in Physiology*, *12*, 781012. https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.781012/TEXT

LeBLANC, M. M., Neuwirth, L., Asbury, A. C., Tran, T., Mauragis, D., & Klapstein, E. (1994). Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Veterinary Journal*, *26*(2), 109–113. https://doi.org/10.1111/J.2042-3306.1994.TB04346.X

Lection, J., Wagner, B., Byron, M., Miller, A., Rollins, A., Chenier, T., Cheong, S. H., & Diel de Amorim, M. (2024). Inflammatory markers for differentiation of endometritis in the mare. *Equine Veterinary Journal*, *56*(4), 678–687. https://doi.org/10.1111/EVJ.14058

Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., Allen, W. R., Sieme, H., & Schoon, H. A. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology*, *76*(7), 1326–1336. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.001

Librado, P., Fages, A., Gaunitz, C., Leonardi, M., Wagner, S., Khan, N., Hanghøj, K., Alquraishi, S. A., Alfarhan, A. H., Al-Rasheid, K. A., Der Sarkissian, C., Schubert, M., & Orlando, L. (2016). The Evolutionary Origin and Genetic Makeup of Domestic Horses. *Genetics*, *204*(2), 423–434. https://doi.org/10.1534/GENETICS.116.194860

Librado, P., Khan, N., Fages, A., Kusliy, M. A., Suchan, T., Tonasso-Calvière, L., Schiavinato, S., Alioglu, D., Fromentier, A., Perdereau, A., Aury, J. M., Gaunitz, C., Chauvey, L., Seguin-Orlando, A., Der Sarkissian, C., Southon, J., Shapiro, B., Tishkin, A. A., Kovalev, A. A., … Orlando, L. (2021). The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature*, *598*(7882), 634–640. https://doi.org/10.1038/S41586-021-04018-9

Librado, P., Tressières, G., Chauvey, L., Fages, A., Khan, N., Schiavinato, S., Calvière-Tonasso, L., Kusliy, M. A., Gaunitz, C., Liu, X., Wagner, S., Der Sarkissian, C., Seguin-Orlando, A., Perdereau, A., Aury, J. M., Southon, J., Shapiro, B., Bouchez, O., Donnadieu, C., … Orlando, L. (2024). Widespread horse-based mobility arose around 2200 BCE in Eurasia. *Nature*, *631*(8022), 819–825. https://doi.org/10.1038/S41586-024-07597-5

Liew, F. Y. (2012). IL-33: A Janus cytokine. *Annals of the Rheumatic Diseases*, *71*(SUPPL. 2). https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200589

Mahmood, K., Channa, A. A., Ghafoor, A., & Riaz, A. (2024). Factors affecting the efficiency of equine embryo transfer (EET) in polo mares under subtropical conditions of Pakistan. *PLOS ONE*, *19*(2), e0298066. https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0298066

Martínez-Bartolomé, I., Masot, J., & Serres, C. (2024). Development of an equine endometrial

histology scoring system to complement the Kenney–Doig scale. *Reproduction in Domestic Animals*, *59*(S3), e14614. https://doi.org/10.1111/RDA.14614

Masterson, J. C., McNamee, E. N., Fillon, S. A., Hosford, L., Harris, R., Fernando, S. D., Jedlicka, P., Iwamoto, R., Jacobsen, E., Protheroe, C., Eltzschig, H. K., Colgan, S. P., Arita, M., Lee, J. J., & Furuta, G. T. (2015). Eosinophil-mediated signalling attenuates inflammatory responses in experimental colitis. *Gut*, *64*(8), 1236–1247. https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2014-306998

Mchedlidze, T., Waldner, M., Zopf, S., Walker, J., Rankin, A. L., Schuchmann, M., Voehringer, D., McKenzie, A. N. J., Neurath, M. F., Pflanz, S., & Wirtz, S. (2013). Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity*, *39*(2), 357–371. https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.07.018

Miller, J. E., Lingegowda, H., Symons, L. K., Bougie, O., Young, S. L., Lessey, B. A., Koti, M., & Tayade, C. (2021). IL-33 activates group 2 innate lymphoid cell expansion and modulates endometriosis. *JCI Insight*, *6*(23). https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.149699

Morris, L. H. A., McCue, P. M., & Aurich, C. (2020). Equine endometritis: a review of challenges and new approaches. *Reproduction (Cambridge, England)*, *160*(5), R95–R110. https://doi.org/10.1530/REP-19-0478

Mostaço-Guidolin, L. B., Ko, A. C. T., Wang, F., Xiang, B., Hewko, M., Tian, G., Major, A., Shiomi, M., & Sowa, M. G. (2013). Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. *Scientific Reports*, *3*. https://doi.org/10.1038/SREP02190

Muderspach, N. D., Troedsson, M. H. T., Ferreira-Dias, G., Agerholm, J. S., & Christoffersen, M. (2024). Distribution of degenerative changes in the equine endometrium as observed in a single versus two biopsies. *Theriogenology*, *213*, 52–58. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2023.09.018

Nejim, Z., Navarro, L., Morin, C., & Badel, P. (2022). Quantitative analysis of second harmonic generated images of collagen fibers: a review. *Research on Biomedical Engineering 2022 39:1*, *39*(1), 273–295. https://doi.org/10.1007/S42600-022-00250-Y

Nothnick, W., & Alali, Z. (2016). Recent advances in the understanding of endometriosis: the role of inflammatory mediators in disease pathogenesis and treatment. *F1000Research*, *5*. https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.7504.1

Orlando, L. (2015). Equids. *Current Biology*, *25*(20), R973–R978. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.005

Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., Stiller, M., Schubert, M., Cappellini, E., Petersen, B., Moltke, I., Johnson, P. L. F., Fumagalli, M., Vilstrup, J. T., Raghavan, M., Korneliussen, T., Malaspinas, A. S., Vogt, J., Szklarczyk, D., Kelstrup, C. D., … Willerslev, E. (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an

early Middle Pleistocene horse. *Nature*, *499*(7456), 74–78. https://doi.org/10.1038/NATURE12323

Quartuccio, M., Cristarella, S., Medica, P., Fazio, E., Mazzullo, G., Rifici, C., Liotta, L., & Satué, K. (2020). Endometrial Cytology During the Different Phases of the Estrous Cycle in Jennies: New Evidences. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *10*(6), 1–15. https://doi.org/10.3390/ANI10061062

Radar-Chafirovitch, A., Quaresma, M., Yánez-Ortiz, I., Leiva, B., Ferreira-Dias, G., Payan-Carreira, R., Miro, J., & Pires, M. dos A. (2025). Donkey endometrium: Characterization of resident immune cells. *Research in Veterinary Science*, *184*, 105516. https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2024.105516

Rebordão, M. R., Amaral, A., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2018). Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology*, *113*, 8–18. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.02.001

Rebordão, M. R., Amaral, A., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2019). Impairment of the antifibrotic prostaglandin E2 pathway may influence neutrophil extracellular traps–induced fibrosis in the mare endometrium. *Domestic Animal Endocrinology*, *67*, 1–10. https://doi.org/10.1016/J.DOMANIEND.2018.10.004

Rebordão, M. R., Galvão, A., Szóstek, A., Amaral, A., Mateus, L., Skarzynski, D. J., & Ferreira-Dias, G. (2014). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, *49 Suppl 4*(s4), 82–87. https://doi.org/10.1111/RDA.12397

Rojas, D., Cabezas, J., Ramírez, G., Saravia, F., Rodriguez-Alvarez, L., & Castro, F. O. (2020). *Complimentary Diagnostic Tools for Endometrosis in Biopsies of Mares with Clinical Subfertility*. *48*, 1717. https://doi.org/10.22456/1679-9216.98312

Rong, R., Chandley, A. C., Song, J., McBeath, S., Tan, P. P., Bai, Q., & Speed, R. M. (1988). A fertile mule and hinny in China. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *47*(3), 134–139. https://doi.org/10.1159/000132531

Rong, R., Yang, X., Cai, H., & Wei, J. (1985). Fertile mule in China and her unusual foal. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *78*(10), 821. https://doi.org/10.1177/014107688507801006

Rothenberg, M. E., & Hogan, S. P. (2006). The Eosinophil. *Annu. Rev. Immunol*, *24*, 147–174. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.24.021605.090720

Runemark, A., Moore, E. C., & Larson, E. L. (2025). Hybridization and gene expression: Beyond differentially expressed genes. *Molecular Ecology*, *34*(15). https://doi.org/10.1111/MEC.17303

Ryder, O. A., Chemnick, L. G., Bowling, A. T., & Benirschke, K. (1985). Male mule foal qualifies as the offspring of a female mule and jack donkey. *The Journal of Heredity*, *76*(5), 379–381. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a110118

Schöniger, S., & Schoon, H. A. (2020). The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, *10*(4). https://doi.org/10.3390/ANI10040625

Sheng, F., Li, M., Yu, J. M., Yang, S. Y., Zou, L., Yang, G. J., & Zhang, L. Le. (2025). IL-33/ST2 axis in diverse diseases: regulatory mechanisms and therapeutic potential. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1533335. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2025.1533335/FULL

Silva, E. S. M., Leite, R. O., Maciel, L. F. S., Francia, C. C. D. A., Padovani, C. R., Oliveira-Filho, J. P., & Meira, C. (2019). Endometrial Histomorphometry of Anestrous Mares Under the Influence of Different Embryo Transfer Hormonal Protocols. *Journal of Equine Veterinary Science*, *81*. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.102792

Snider, T. A., Sepoy, C., & Holyoak, G. R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, *75*(9), 1567–1581. https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.12.013

Strupler, M., Pena, A.-M., Hernest, M., Tharaux, P.-L., Martin, J.-L., Beaurepaire, E., & Schanne-Klein, M.-C. (2007). Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express*, *15*(7), 4054. https://doi.org/10.1364/OE.15.004054

Swegen, A. (2021). Maternal recognition of pregnancy in the mare: does it exist and why do we care? *Reproduction (Cambridge, England)*, *161*(6), R139. https://doi.org/10.1530/REP-20-0437

Szóstek-Mioduchowska, A. Z., Baclawska, A., Okuda, K., & Skarzynski, D. J. (2019). Effect of proinflammatory cytokines on endometrial collagen and metallopeptidase expression during the course of equine endometrosis. *Cytokine*, *123*. https://doi.org/10.1016/J.CYTO.2019.154767

Teixeira-Soares, C. M., Viana, A. G., Carvalho, R. P. R., Barros, E., Ramirez-Lopez, C., Moura, A. A., & Machado-Neves, M. (2025). Unraveling the uterine fluid proteome of mares diagnosed with post-breeding and infectious endometritis. *Journal of Reproductive Immunology*, *167*. https://doi.org/10.1016/j.jri.2024.104401

Todd, E. T., Tonasso-Calvière, L., Chauvey, L., Schiavinato, S., Fages, A., Seguin-Orlando, A., Clavel, P., Khan, N., Pardal, L. P., Rosa, L. P., Librado, P., Ringbauer, H., Verdugo, M., Southon, J., Aury, J. M., Perdereau, A., Vila, E., Marzullo, M., Prato, O., … Orlando, L. (2022). The genomic history and global expansion of domestic donkeys. *Science*, *377*(6611), 1172–1180. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABO3503

Ulaangerel, T., Mu, S., Sodyelalt, J., Yi, M., Zhao, B., Hao, A., Wen, X., Han, B., & Bou, G.

(2025). Transcriptome Analysis Reveals Equine Endometrium's Gene Expression Profile Around Embryo Fixation. *Genes*, *16*(2), 181. https://doi.org/10.3390/GENES16020181/S1

Vallejo-Soto, P., Dorado, J., Herrera-García, R., Álvarez-Delgado, C., Gómez-Laguna, J., Santiago, Á. de, Manrique, M., González Ariza, A., León Jurado, J. M., Hidalgo, M., & Ortiz, I. (2026). Histomorphometric Analysis of the Endometrium of Jennies (Equus asinus) and Mares (Equus caballus) in Estrus: Anatomical Differences and Possible Reproductive Implications. *Animals*, *16*(1), 143. https://doi.org/10.3390/ANI16010143/S1

Van Camp, S. D. (1988). Endometrial biopsy of the mare. A review and update. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, *4*(2), 229–245. https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30639-9

Waelchli, R. O., & Winder, N. C. (1989). Distribution of histological lesions in the equine endometrium. *The Veterinary Record*, *124*(11), 271–273. https://doi.org/10.1136/VR.124.11.271

Walter, I., Handler, J., Reifinger, M., & Aurich, C. (2001). Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, *121*(4), 581–586. https://doi.org/10.1530/REP.0.1210581

Westendorf, J., Wobeser, B., & Epp, T. (2022a). IIB or not IIB, part 1: retrospective evaluation of Kenney-Doig categorization of equine endometrial biopsies at a veterinary diagnostic laboratory and comparison with published reports. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation : Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *34*(2), 206–214. https://doi.org/10.1177/10406387211062207

Westendorf, J., Wobeser, B., & Epp, T. (2022b). IIB or not IIB, part 2: assessing inter-rater and intra-rater repeatability of the Kenney–Doig scale in equine endometrial biopsy evaluation. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *34*(2), 215–225. https://doi.org/10.1177/10406387211062866;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Wójtowicz, A., Sadowska, A., Molcan, T., Słyszewska, M., Drzewiecka, E. M., Tobolski, D., Ferreira-Dias, G., & Szóstek-Mioduchowska, A. (2025). Th1 and Th2 cells in equine endometrosis and their interactions with endometrial fibroblasts. *Scientific Reports*, *15*(1), 36263. https://doi.org/10.1038/S41598-025-20152-0

Wong, Y. Sen, Mançanares, A. C., Navarrete, F., Poblete, P., Mendez-Pérez, L., Cabezas, J., Riadi, G., Rodríguez-Alvarez, L., & Castro, F. O. (2024). Extracellular vesicles secreted by equine adipose mesenchymal stem cells preconditioned with transforming growth factor β-1 are enriched in anti-fibrotic miRNAs and inhibit the expression of fibrotic genes in an in vitro system of endometrial stromal cel…. *The Veterinary Quarterly*, *44*(1), 1–11. https://doi.org/10.1080/01652176.2024.2384906

Woodward, E. M., & Troedsson, M. H. (2013). Equine Breeding-Induced Endometritis: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(9), 673–682.

https://doi.org/10.1016/J.JEVS.2012.11.010

Wu, R., Yu, F., Holyoak, G. R., Gao, Y., Zhu, Y., & Li, J. (2024). Use of the endometrial histopathology to improve diagnosis of donkeys with endometritis. *Equine Veterinary Education*,*36*(1),43–50. https://doi.org/10.1111/EVE.13815

Zdrojkowski, Ł., Pawliński, B., Skierbiszewska, K., Jasiński, T., & Domino, M. (2024). Assessment of Connective Tissue in the Equine Uterus and Cervix: Review of Clinical Impact and Staining Options. *Animals 2024, Vol. 14, Page 156*, *14*(1), 156. https://doi.org/10.3390/ANI14010156

Zeisberg, M., & Kalluri, R. (2013). Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Https://Doi.Org/10.1152/Ajpcell.00328.2012*, *304*(3). https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00328.2012

Zhang, H., Zhou, Y., Wen, D., & Wang, J. (2023). Noncoding RNAs: Master Regulator of Fibroblast to Myofibroblast Transition in Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(2). https://doi.org/10.3390/IJMS24021801