



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID
FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



**EXPRESIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN TEJIDOS OCULARES
DE CONEJO CON INSUFICIENCIA LÍMBICA Y ANÁLISIS DE SUS
RECEPTORES EN CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

***EXPRESSION OF GROWTH FACTORS IN LIMBAL STEM CELL-DEFICIENCY RABBIT OCULAR
TISSUES AND ANALYSIS OF THEIR RECEPTORS IN MESENCHYMAL STEM CELLS***

Autor/a:

D. Rodrigo Villafáfila Martínez

Tutores:

D^a. Teresa Nieto Miguel y D^a. Beatriz Marceñido Gil

TÍTULO: Expresión de factores de crecimiento en tejidos oculares de conejo con insuficiencia límbica y análisis de sus receptores en células madre mesenquimales.

AUTOR/A: Rodrigo Villafáfila Martínez

TUTORES: Teresa Nieto Miguel y Beatriz Marceñido Gil

DEPARTAMENTO: Departamento de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología

TRIBUNAL

PRESIDENTE: D^a Patricia Gallego Muñoz (Dpto. de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología)

SECRETARIO: D^a. Marina López Paniagua (Dpto. de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología)

VOCAL: D^a. Teresa Nieto Miguel (Dpto. de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología)

SUPLENTE 1: D^a. María Mercedes Alberca Zaballos (Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología)

SUPLENTE 2: D^a. Verónica García Díaz (Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología)

FECHA: 04/07/2025

CALIFICACIÓN:

RESUMEN

Objetivo: Analizar la expresión de factores de crecimiento en tejidos oculares dañados y su variación tras el tratamiento con células madre mesenquimales de tejido adiposo (AT-MSCs), y estudiar la expresión de sus correspondientes receptores de membrana en AT-MSCs expuestas *in vitro* a un microambiente inflamatorio.

Metodología: Mediante inmunodetección, se estudió la expresión de VEGF-A, EGF y PDGF-B en un modelo en conejo de deficiencia de células madre limbo-corneales (LSCD) tratado con AT-MSCs, a corto y largo plazo postratamiento. Por citometría de flujo se analizó la expresión de EGF-R, PDGFR-B, VEGFR y NRP-1 en la superficie de AT-MSCs expuestas *in vitro* al secretoma de células epiteliales corneales inflamadas, en presencia y ausencia de suero en el medio de cultivo.

Resultados: La expresión de EGF y PDGF-B aumentó hasta niveles similares a los de tejidos sanos, tanto a tiempo corto como largo postratamiento. En cambio, los niveles de VEGF-A aumentaron respecto a los controles en los tejidos dañados, excepto en aquellos tratados con AT-MSCs y evolución a largo plazo. En la superficie de las AT-MSCs expuestas a condiciones inflamatorias se observó un aumento en la expresión de EGF-R y NRP-1, junto con una disminución de PDGFR-B y VEGFR.

Conclusión: El tratamiento con AT-MSCs moduló la expresión de factores de crecimiento en tejidos con LSCD, especialmente a tiempos largos postratamiento, aumentando EGF y PDGF-B y reduciendo VEGF-A. Además, la exposición de AT-MSCs a un microambiente inflamatorio alteró la expresión de sus respectivos receptores de membrana, evidenciando su capacidad de respuesta a estímulos locales.

Palabras clave

Deficiencia de células madre limbares, córnea, células madre mesenquimales, factores de crecimiento, migración celular

ABSTRACT

Objective: To analyse the expression of growth factors in damaged ocular tissues and their variation after the treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs), and to study the expression of their receptors on the membrane of AT-MSCs exposed to an inflammatory microenvironment *in vitro*.

Methodology: The expression of VEGF-A, EGF and PDGF-B was studied by immunodetection in a rabbit model of limbal stem cell deficiency (LSCD), at both short and long post-treatment times with AT-MSCs. Flow cytometry was used to assess the expression of EGF-R, PDGFR-B, VEGFR and NRP-1 on AT-MSCs exposed to the secretome of inflamed corneal epithelial cells *in vitro*, with and without serum in the culture medium.

Results: EGF and PDGF-B expression increased to levels comparable to healthy tissues, at both short- and long-term post-treatment. However, VEGF-A levels increased in all experimental groups compared to controls, except in those treated with AT-MSCs over the long-term. AT-MSCs exposed to inflammatory conditions showed increased surface expression of EGF-R and NRP-1, and decreased expression of PDGFR-B and VEGFR.

Conclusion: AT-MSC treatment modulated the expression of growth factors in LSCD tissues, particularly at long-term post-treatment time points, by increasing EGF and PDGF-B levels and reducing VEGF-A expression. Exposure of AT-MSCs to an inflammatory microenvironment altered the expression of their surface receptors, demonstrating their ability to respond to local stimuli.

Keywords

Limbal stem cell deficiency, cornea, mesenchymal stem cells, growth factors, cell migration

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis dos tutoras, Teresa y Beatriz, por haberme acogido y permitir que llevase a cabo este trabajo junto a ellas. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio y de la vida investigadora, por depositar vuestra confianza en mí desde el primer minuto y, sobre todo, por vuestra paciencia y dedicación. También, agradecer al resto de compañeros del IOBA, por haberme ayudado siempre que lo he necesitado y hacerme sentir como en casa.

Gracias a mis padres y a mi hermana por su dedicación, su apoyo moral y emocional. Gracias por haber estado en todo momento, en lo bueno y en lo malo, por ayudarme siempre que lo he necesitado y haber celebrado conmigo hasta los logros más pequeños, confiando en mí incluso cuando yo no lo hacía. Gracias por recordarme siempre que todo esfuerzo tiene su recompensa.

Por último, agradecer a mis amigos por brindarme su ayuda, por haberme escuchado y acompañado durante esta etapa. Todos y cada uno de vosotros habéis sido muy importantes en este proceso, esto no habría sido igual sin vosotros.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La superficie ocular.....	1
1.2. Deficiencia de células madre limbo-corneales.....	2
1.2.1. Tratamientos emergentes basados en células madre mesenquimales	2
1.3. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.....	3
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1. Modelo animal y toma de muestras.....	4
3.2. Inmunohistoquímica.....	6
3.3. Inmunofluorescencia	6
3.4. Obtención de medios condicionados por células epiteliales corneales tras estimulación proinflamatoria.....	7
3.4.1. Exposición de AT-MSCs a medios condicionados por HCE tras estimulación proinflamatoria.....	8
3.5. Citometría de flujo (CF).....	8
4. RESULTADOS.....	9
4.1. Estudio de la expresión de factores de crecimiento en tejidos de conejo.....	9
4.1.1. Ensayos de inmunohistoquímica.....	9
4.1.2. Ensayos de inmunofluorescencia	10
4.3. Prueba preliminar para estudiar la expresión de receptores de factores de crecimiento en AT-MSCs	14
5. DISCUSIÓN.....	16
6. CONCLUSIONES	19
7. LIMITACIONES	20
8. FINANCIACIÓN.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21
ANEXOS.....	24
ANEXO I – Resultados de citometría de flujo.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La superficie ocular y la regeneración del epitelio corneal.

Figura 2. Línea temporal de los modelos agudo y crónico de LSCD desarrollados en conejo tratados subconjuntivalmente con AT-MSCs.

Figura 3. Imágenes de inmunohistoquímica de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A).

Figura 4. Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Figura 5. Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B).

Figura 6. Gráficas representativas de la intensidad media de fluorescencia (FMI).

Figura S1. Porcentaje de células positivas que expresan EGF-R, PDGFR-B, VEGFR y NRP-1 en AT-MSCs analizados mediante citometría de flujo (CF).

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunodetección.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en el ensayo de citometría de flujo

ABREVIATURAS

AT-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo, del inglés *Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*.

BSS: solución salina balanceada, del inglés *Balanced Salt Solution*.

CF: citometría de flujo.

CLET: trasplante de epitelio limbar cultivado, del inglés *Cultivated Limbal Epithelial Transplantation*.

DAB: 3,3'-diaminobenzidina.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

EDTA: ácido etildiaminotetraacético.

EGF: factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermal Growth Factor*.

EGF-R: receptor de factor de crecimiento epidérmico, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*.

FBS: suero fetal bovino, del inglés *Fetal Bovine Serum*.

FMI: intensidad media de fluorescencia, del inglés *Fluorescence Median Intensity*.

HCE: línea celular de epitelio corneal humano, del inglés *Human Corneal Epithelium*.

LSCD: deficiencia de las células madre limbo-corneales, del inglés *Limbal Stem Cell Deficiency*.

MSCs: células madre mesenquimales, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*.

NRP-1: neuropilina-1, del inglés *Neuropilin-1*.

PBS: solución salina tamponada con fosfato, del inglés *Phosphate Buffered Saline*.

PDGF-B: factor de crecimiento derivado de plaquetas B, del inglés *Platelet-Derived Growth Factor B*.

PDGFR-B: receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas B, de inglés *Platelet-Derived Growth Factor Receptor B*.

Pen-Strep: penicilina-estreptomicina 100 U/ml-100 µg/ml.

TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*.

VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor A*.

VEGFR: receptor del factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La superficie ocular

La superficie ocular es una unidad anatómica y funcional localizada en la interfaz entre el ojo funcional y el ambiente, que provee de protección anatómica, fisiológica e inmunológica al globo ocular y participa en el mantenimiento de una correcta visión. Está constituida por la conjuntiva, el limbo, la córnea y la película lagrimal (*Figura 1A*) [1–3].

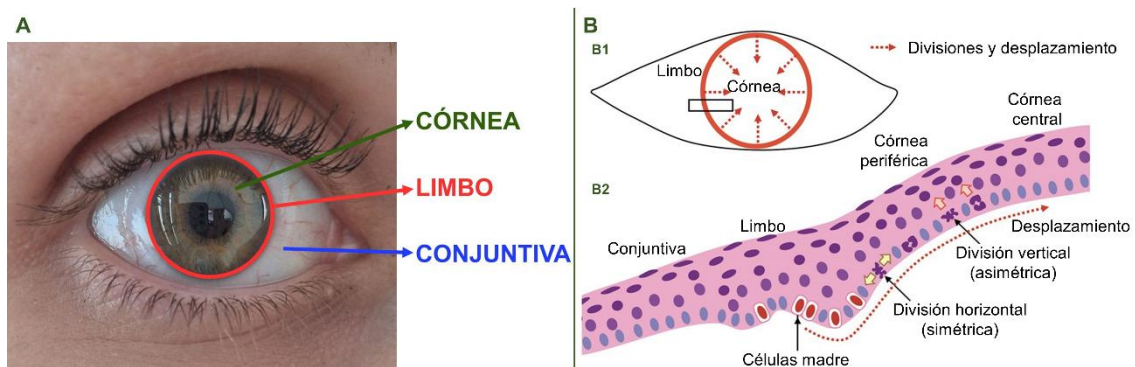


Figura 1. **La superficie ocular y la regeneración del epitelio corneal.** (A) Localización anatómica de la córnea, el limbo y la conjuntiva en la superficie ocular. Imagen de elaboración propia. (B) Regeneración del epitelio corneal. (B1) El epitelio corneal se regenera a partir de las células madre limbo-corneales ubicadas en el limbo esclerocorneal. (B2) Representación de un corte histológico de la superficie ocular, que se corresponde con el rectángulo de (B1), indicando las divisiones horizontales que originan dos células madre (flechas amarillas) para mantener la población celular; y las divisiones verticales que originan células que se diferenciarán y desplazarán hacia la superficie corneal (flechas rojas). Imagen tomada de Villaro, A. (2021) [3].

La conjuntiva es una fina membrana mucosa traslúcida que recubre la superficie anterior del globo ocular desde el limbo esclerocorneal (conjuntiva bulbar) y se extiende hasta la superficie interna de los párpados (conjuntiva palpebral) [4]. Histológicamente, está formada por un epitelio estratificado cilíndrico, con células caliciformes productoras de mucinas, que descansa sobre un estroma de tejido conjuntivo laxo ricamente vascularizado [2,4]. Sus principales funciones son la protección frente a la entrada de agentes extraños del exterior, la vigilancia inmunológica y la producción de algunos de los componentes de la lágrima [4].

El limbo esclerocorneal es la zona de transición entre la córnea y la conjuntiva. Forma un anillo de 1,5 - 2 mm de ancho y 1 mm de espesor, constituido por un epitelio que descansa sobre un estroma [1,3,4]. El epitelio limbar tiene un grosor de 10-12 capas de células en distintos estadios de diferenciación. También se caracteriza por la presencia de las denominadas empalizadas de Vogt, una serie de crestas fibrovasculares de orientación radial en cuya capa basal se encuentran las células madre limbo-corneales, que son fundamentales para el reemplazo físico de las células del epitelio corneal (*Figura 1B*) [5,6]. Por otro lado, el estroma limbar, una región altamente vascularizada e innervada, está constituido por tejido conectivo denso rico en fibras de colágeno. Además de sus funciones como barrera física y de renovación del epitelio corneal, el limbo esclerocorneal participa en el drenaje del humor acuoso desde la cámara anterior del ojo hasta el canal de Schlemm a través de la red trabecular [1,3,4].

La córnea es una estructura transparente y avascular localizada en la parte frontal del ojo, que actúa como barrera protectora de las estructuras internas del ojo, protegiéndolo de infecciones o daño por radiación ultravioleta. También tiene función de lente, permitiendo la transmisión de la luz a la retina para el procesamiento visual. Está constituida por cinco capas organizadas: **1) el epitelio anterior**, un epitelio estratificado plano no queratinizado que se recambia por completo cada 7-10 días, y tiene gran relevancia para el poder refractivo del ojo, además de actuar como barrera entre el entorno y el interior del ojo; **2) la membrana de Bowman**, una capa acelular posterior a la membrana basal del epitelio anterior, que termina abruptamente en el limbo. Está compuesta principalmente por fibras de colágeno y proteoglicanos organizados de manera irregular; **3) el estroma corneal**, la capa más gruesa, constituye aproximadamente el 90 % del espesor corneal. Los queratocitos sintetizan las fibras de colágeno que se disponen en forma de láminas paralelas con orientación ortogonal, lo que es fundamental para mantener su transparencia; **4) la membrana de Descemet**, es la membrana basal del epitelio posterior o endotelio. Está compuesta por distintos tipos de colágeno, laminina y fibronectina y tiene función principalmente estructural; y **5) el endotelio**, capa más interna, formada por una monocapa de células epiteliales planas, que es esencial para preservar la transparencia corneal mediante la regulación de la hidratación estromal [2–4,7].

1.2. Deficiencia de células madre limbo-corneales

La integridad del epitelio corneal es esencial para mantener la transparencia de la córnea y la función visual. Las células del epitelio corneal tienen una vida media de 7-10 días, tras los cuales sufren apoptosis y descamación [2]. Debido a esto, este epitelio se renueva de manera constante para mantener su integridad gracias a las células madre limbo-corneales (*Figura 1B*) [4,8,9]. La destrucción o disfunción de estas células madre, o de su nicho, puede provocar una afección clínica conocida como deficiencia de células madre limbo-corneales (LSCD, por sus siglas en inglés *Limbal Stem Cell Deficiency*). Esta afección, producida por diferentes causas tales como quemaduras químicas o térmicas, cirugías oculares múltiples o patologías autoinmunes, como el síndrome de Stevens-Johnson o el de Sjögren, compromete la integridad de la superficie ocular dando lugar a ulceración del epitelio corneal e invasión de la conjuntiva sobre la superficie corneal. Esto provoca inflamación, neovascularización y una pérdida de transparencia corneal, con la consiguiente pérdida de visión. Los pacientes con LSCD presentan un cuadro clínico caracterizado por dolor ocular crónico, fotofobia, enrojecimiento, lagrimeo y disminución de la agudeza visual, que empeora progresivamente hasta poder llegar a causar una pérdida de visión significativa [10–12].

1.2.1. Tratamientos emergentes basados en células madre mesenquimales

El trasplante de epitelio limbar cultivado (CLET, por sus siglas en inglés *Cultivated Limbal Epithelial Transplantation*), consiste en el cultivo de las células del epitelio limbar *ex vivo* y el

trasplante de las mismas al paciente [13,14]. Este tratamiento se ha consolidado como una de las estrategias terapéuticas más exitosas para el tratamiento de la LSCD. Sin embargo, el CLET no está exento de limitaciones como la necesidad de inmunosupresión prolongada en los trasplantes alogénicos, la baja disponibilidad de tejido donante, la dificultad del cultivo de las células epiteliales limbares, y la baja tasa de éxito en los casos de LSCD más severos [14,15].

Debido a estas limitaciones, se están explorando otras alternativas, siendo una de las más prometedoras el uso de células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés *Mesenchymal Stem Cells*), por su gran potencial terapéutico [16]. Las MSCs son una población de células madre adultas multipotentes de origen mesodérmico, autorrenovables y con capacidad de diferenciación a diferentes linajes celulares [17,18]. Estas células se pueden obtener de diferentes fuentes: médula ósea, tejido adiposo, músculo esquelético, cartílago, pulpa dental, cordón umbilical o placenta [17,19]. Su potencial terapéutico es gracias a su gran variedad de propiedades, como su capacidad de autorrenovación y diferenciación a distintos tipos celulares, su baja inmunogenicidad, su actividad inmunomoduladora, su potencial antiinflamatorio y su capacidad migratoria hacia tejidos dañados [17,18,20,21]. Aunque esta capacidad de direccionamiento de las MSCs hacia los tejidos dañados o inflamados está estudiada [21], el mecanismo exacto que regula este fenómeno continúa sin estar del todo claro. Esta propiedad parece estar mediada por la presencia de gradientes de concentración de quimiocinas y factores de crecimiento presentes en los tejidos dañados, los cuales inducirían la quimioatracción y migración de las MSCs hacia el foco del daño, guiadas por receptores específicos presentes en su membrana plasmática [22].

Es por todas estas propiedades por lo que las MSCs se han considerado como un posible tratamiento para la LSCD. De hecho, ya existen numerosos estudios, tanto *in vivo* en modelos animales como ensayos clínicos, que han demostrado que las MSCs son seguras y eficaces, ya que favorecen la reparación de tejidos como el epitelio corneal y reducen la inflamación de la superficie corneal [16,18,23–26].

1.3. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo

Las MSCs derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs, por sus siglas en inglés *Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*) tienen ciertas ventajas en comparación con las MSCs procedentes de otras fuentes, como su abundancia y su fácil obtención a través de procesos mínimamente invasivos [27].

Algunos estudios han demostrado que las AT-MSCs expresan de forma constitutiva el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGFR-B) [27–29], el receptor del factor de crecimiento endotelial (EGF-R) [30] y la glicoproteína transmembrana neuropilina-1 (NRP-1), que actúa como co-receptor del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGFR). En cambio, no expresan VEGFR [31], cuya expresión se ha demostrado que aumenta en condiciones

de hipoxia, inflamación o en respuesta a VEGF-A [32,33]. A través de la señalización mediada por estos receptores tras la unión a sus respectivos ligandos (PDGF-B en el caso del PDGFR-B, EGF en el caso del EGF-R y VEGF-A en el caso de NRP-1 y VEGFR), las MSCs logran migrar y dirigirse al tejido dañado y llevar a cabo, *in situ*, la reparación y regeneración tisular, además de promover la angiogénesis [27–30,34].

Con el objetivo de contribuir a la comprensión del mecanismo que regula la migración de las AT-MSCs hacia los tejidos dañados de la superficie ocular, en el presente trabajo se analizan las variaciones en los niveles de expresión de los factores de crecimiento VEGF-A, EGF y PDGF-B en tejidos oculares de un modelo de LSCD realizado en conejo, así como los posibles cambios inducidos en los mismos tras el tratamiento con AT-MSCs. Además, se estudia la expresión de los respectivos receptores de membrana en la superficie de las AT-MSCs y cómo ésta se ve afectada al exponerlas a un microambiente, *in vitro*, que simula el epitelio corneal inflamado.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis: El daño tisular altera la expresión de factores de crecimiento en los tejidos de la superficie ocular; estos cambios podrían modularse con el tratamiento con AT-MSCs, cuyos receptores de membrana también se ven afectados por el ambiente inflamatorio.

El **objetivo principal** de este trabajo fue analizar la expresión de factores de crecimiento en tejidos oculares de un modelo de LSCD desarrollado en conejo y su variación tras el tratamiento con AT-MSCs, así como estudiar la expresión de sus correspondientes receptores en la membrana de AT-MSCs expuestas *in vitro* a un microambiente inflamatorio. Para ello, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar, mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, los cambios en la expresión de los factores de crecimiento VEGF-A, EGF y PDGF-B en tejidos oculares de un modelo de LSCD desarrollado en conejo, tras la administración subconjuntival de AT-MSCs.
2. Realizar un análisis preliminar de la expresión de los receptores de los factores de crecimiento VEGF-A, EGF y PDGF-B en la superficie de AT-MSCs expuestas, *in vitro*, al secretoma de células epiteliales corneales sometidas a un estímulo proinflamatorio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales descritos en este trabajo fueron aprobados por la Comisión de Investigación del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad de Valladolid (1004476) y el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Área de Salud de Valladolid Este (PI-18-1116).

3.1. Modelo animal y toma de muestras

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron previamente obtenidas por el grupo de investigación a partir de hembras adultas de conejo New Zealand White (*Oryctolagus cuniculus*) a las que, en el ojo derecho, se les había inducido una LSCD mediante la desepitelización corneal con n-heptanol, seguida de una limbectomía quirúrgica de 360° del limbo, de manera similar a la descrita en el estudio de Galindo S. et al. (2017) [25]. Una vez realizada la limbectomía, los animales se dividieron en dos grupos experimentales (Figura 2):

1) Modelo agudo: la administración del tratamiento por vía subconjuntival se realizó transcurrida una semana desde la realización del daño y los animales fueron sacrificados transcurrida una semana de evolución post-inyección (eutanasia tras dos semanas de inducir el daño).

2) Modelo crónico: la administración del tratamiento por vía subconjuntival se realizó transcurridas tres semanas desde la realización del daño y los animales fueron sacrificados transcurridas ocho semanas de evolución post-inyección (eutanasia a las once semanas tras la inducción del daño).

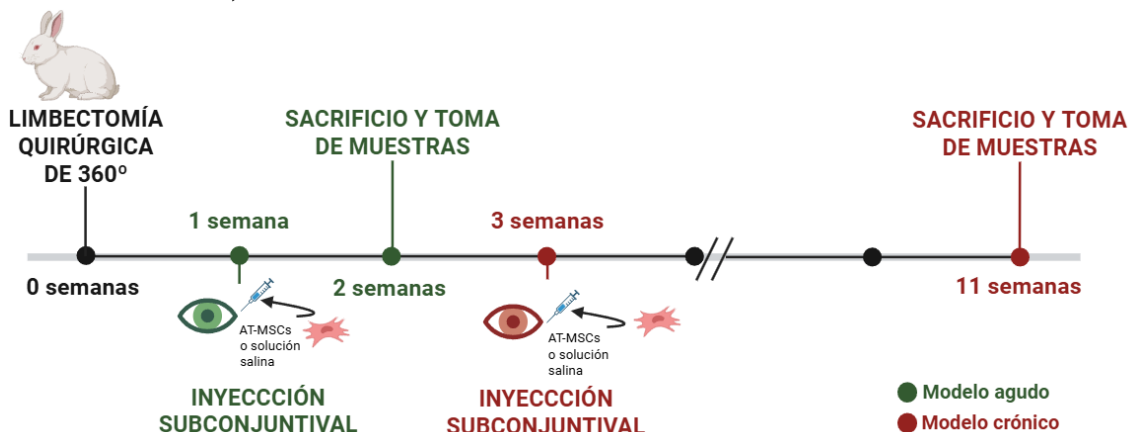


Figura 2. Línea temporal de los modelos agudo y crónico de LSCD desarrollados en conejo tratados subconjuntivalmente con AT-MSCs. A conejos adultos New Zealand White se les indujo una LSCD mediante desepitelización corneal seguida de libectomía quirúrgica de 360°. Modelo agudo indicado en verde: tras una semana de evolución de la enfermedad se administró subconjuntivalmente una solución de AT-MSCs o solución salina balanceada; tras una semana de evolución post-inyección se sacrificaron los animales y se tomaron las muestras. Modelo crónico representado en color rojo: tras la realización del daño, se dejaron tres semanas de evolución de enfermedad, momento en que se aplicó mediante una inyección subconjuntival una suspensión de AT-MSCs o solución salina balanceada. Se dejó una evolución de ocho semanas post-inyección antes del sacrificio y toma de muestras. LSCD: deficiencia de células madre limbo-corneales; AT-MSCs: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo. Imagen de elaboración propia con BioRender.

Los tratamientos que se administraron subconjuntivalmente fueron una solución salina balanceada (BSS, por sus siglas en inglés *Balanced Salt Solution*) (agudo n= 4 / crónico n= 3) o una suspensión de 2.000.000 de AT-MSCs humanas en BSS (agudo n= 4 /crónico n= 3). Los globos oculares izquierdos se utilizaron como controles sanos [25]. Tras la eutanasia, se obtuvieron los botones corneoesclerales, a los que se les realizó un corte en el plano un sagital, como si el ojo estuviera en posición primaria de mirada, siguiendo el eje anteroposterior. Esta técnica permite conservar la simetría entre las mitades nasal y temporal. Las regiones nasales se

fijaron en paraformaldehído al 4 %, durante 4 horas a 4 °C, se deshidrataron e incluyeron en parafina para, posteriormente, ser cortadas con un microtomo a un grosor de 4 µm.

3.2. Inmunohistoquímica

Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica para detectar la presencia de VEGF-A en los tejidos oculares de los distintos grupos experimentales.

Tras la desparafinación y el desenmascaramiento antigénico incubando las muestras con una solución de citrato a pH 6 durante 30 minutos a una temperatura entre 95 °C y 100 °C, las secciones de tejido se permeabilizaron con una solución de tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0,1 % durante 30 minutos y se bloquearon con suero de cabra (Sigma-Aldrich) al 5 % durante 30 minutos, antes de incubarlas toda la noche con el anticuerpo primario (anti-VEGF-A) (*Tabla 1*).

Tabla 1: Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de inmunodetección.

Nombre del anticuerpo	Especificidad	Especie de síntesis	Clon	Casa comercial Referencia	Dilución
Anti-VEGF-A	Isoformas 121, 165 y 189 del VEGF	Ratón (monoclonal)	VG-1	Abcam Cat#Ab1316	1/100
Anti-PDGF-B	Subunidad B de PDGF	Cabra (policlonal)	--	Abexxa Ltd. Cat#abx433673	1/100
Anti-EGF	EGF	Ratón (monoclonal)	4E11	Fisher Scientific Cat#11345573	1/200

La detección se realizó mediante un sistema de biotina-estreptavidina-peroxidasa siguiendo las instrucciones del Kit *Mouse ExtrAvidin® Peroxidase Staining Kit antibody produced in goat* (Merck KGaA) e incubando con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB), seguido de la tinción nuclear con hematoxilina de Carazzi durante 10 minutos. Finalmente, las muestras se deshidrataron incubándolas en alcoholes de graduación creciente (70°, 80°, 96° y 100°), se incubaron en xileno puro y se montaron utilizando el medio de montaje Entellan™ (Sigma-Aldrich). Las muestras se visualizaron y se obtuvieron imágenes con un aumento de 20X utilizando el microscopio Leica DM4000 B, abarcando distintas regiones de la superficie ocular: conjuntiva inferior, limbo inferior, córnea inferior, córnea central, córnea superior, limbo superior y conjuntiva superior. Todos los experimentos incluyeron controles negativos en tejidos de superficie ocular de conejo y controles positivos en muestras de riñón de conejo.

3.3. Inmunofluorescencia

Mediante inmunofluorescencia indirecta se estudió la expresión de los factores de crecimiento PDGF-B y EGF en los tejidos de la superficie ocular de los conejos de los distintos grupos experimentales.

Los tejidos se desparafinaron calentándolos a 60 °C durante 30 minutos e incubándolos con

xilenos puros y alcoholes de concentraciones decrecientes. A continuación, se llevó a cabo el desenmascaramiento antigénico mediante incubación con una solución de tripsina (Sigma-Aldrich) al 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS, por sus siglas en inglés *Phosphate Buffered Saline*) (Gibco™, Life Technologies) durante 20 minutos a 37 °C. Tras lavar las muestras, se realizó el bloqueo y la permeabilización mediante incubación con una solución de suero de burro (Sigma-Aldrich) al 5 % y tritón X-100 al 0,3 % en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida de la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (anti-EGF o anti-PDGF-B) (*Tabla 1*) durante toda la noche a 4 °C.

Al día siguiente, se lavaron las muestras y se incubaron durante una hora, a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo (Alexa Fluor™ 488 donkey anti-mouse, Thermo Fisher Scientific) en PBS a una dilución de 1:200. Posteriormente, las muestras se lavaron e incubaron durante 3 minutos con el reactivo *Vector® TrueView® Autofluorescence* (Vector Laboratories) y 5 minutos con el fluoróforo nuclear 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Thermo Scientific™) a una concentración de 1 µg/mL. Finalmente, se realizó un último lavado con PBS y otro con agua corriente y las muestras se montaron utilizando Vectaschield® (Vector Laboratories).

Todos los tejidos fueron observados y fotografiados en el microscopio invertido de fluorescencia Leica DMI6000 B. Se tomaron fotos de las distintas regiones de la superficie ocular: conjuntiva inferior, limbo inferior, córnea inferior, córnea central, córnea superior, limbo superior y conjuntiva superior a un aumento de 20X. En todos los experimentos se incluyeron controles negativos en muestras de tejidos de superficie ocular de conejo y controles positivos en riñón y pulmón de conejo.

3.4. Obtención de medios condicionados por células epiteliales corneales tras estimulación proinflamatoria

La línea celular de epitelio corneal humano (HCE, del inglés *Human Corneal Epithelium*) fue cultivada con el medio de cultivo DMEM/F-12 + GlutaMAX™ (Gibco™) suplementado con penicilina-estreptomicina (Gibco™) 100 U/mL-100 µg/mL (Pen-Strep), un 10 % de suero fetal bovino (FBS por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*) (Gibco™), 10 mg/mL de EGF (Sigma-Aldrich) y 5 µg/mL de insulina (Gibco™). Alcanzada una confluencia del 80 %, se inactivó el crecimiento de estas células cultivándolas, durante 24 horas, en medio de cultivo base suplementado únicamente con Pen-Strep. Tras la sincronización, se estimuló la inflamación de las HCEs suplementando el medio con 25 ng/mL de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α, por sus siglas en inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha*) (PeproTech®, ThermoFisher Scientific), en presencia o ausencia de un 10 % de FBS, dependiendo de la condición [35]. Transcurrido este tiempo, se recogió el medio condicionado, se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a 4 °C, se filtró con membranas de 0,45 µm de tamaño de poro y se congeló a -80 °C para su conservación

hasta su utilización.

3.4.1. Exposición de AT-MSCs a medios condicionados por HCE tras estimulación proinflamatoria

Se utilizaron AT-MSCs humanas almacenadas por el grupo de investigación en la colección de muestras biológicas número 1417, dada de alta en el Registro Nacional de Biobancos. Las AT-MSCs se cultivaron utilizando el medio de cultivo DMEM bajo en glucosa + GlutaMAX™ (Gibco™) suplementado con Pen-Strep y un 10 % de FBS (medio de cultivo completo de las AT-MSCs). Una vez alcanzado el 70 % de confluencia, se cultivaron durante 48 horas con el medio correspondiente en cada una de las siguientes condiciones a estudio: 1) medio de cultivo completo de las AT-MSCs, 2) medio DMEM/F-12 + GlutaMAX™ suplementado con Pen-Strep (DMEM/F-12 sin FBS), 3) medio condicionado DMEM/F-12 + GlutaMAX™ suplementado con Pen-Strep (DMEM/F-12 condicionado sin FBS), 4) medio DMEM/F-12 + GlutaMAX™ suplementado con Pen-Strep y 10 % de FBS (DMEM/F-12 con FBS), 5) medio condicionado DMEM/F-12 + GlutaMAX™ suplementado con 10 % de FBS y Pen-Strep (DMEM/F-12 condicionado con FBS).

3.5. Citometría de flujo (CF)

Tras la exposición de las AT-MSCs a los medios condicionados por las HCE, las células se despegaron de los frascos de cultivo y, mediante citometría de flujo (CF), se estudió la expresión de los receptores de factores de crecimiento relacionados con la migración y quimiotracción de las AT-MSCs: EGF-R, PDGFR-B, VEGFR y NRP-1.

Para ello, las AT-MSCs se levantaron con una solución de Versene-ácido etildiaminotetraacético (EDTA) (Gibco™) y se lavaron con un buffer de citometría (R&D Systems). Las células se tiñeron utilizando el kit *LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kit* (Thermo Fisher Scientific), seguido de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios conjugados con fluoróforos y sus correspondientes controles de isotipo (Tabla 2). Posteriormente, las células se lavaron e incubaron con paraformaldehído al 4 % durante 10 minutos para su fijación. Finalmente, se resuspendieron en buffer de citometría para ser analizadas mediante citometría de flujo espectral, Cytex® Aurora, y evaluar la expresión de los receptores de los marcadores de quimiotracción.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en el ensayo de citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluoróforo conjugado	Isotipo	Casa Comercial	Referencia	Cantidad (10 ⁵ células)
Anti-EGFR	PE	IgG2b	BD Biosciences	Cat#555997	10 µL
Anti-PDGFR-B	PerCP	IgG1	R&D Systems	Cat#FAB1263C	5 µL
Anti-VEGFR	APC	IgG1	R&D Systems	Cat#FAB321A	2 µL
Anti-NRP-1	PE	IgG2a	R&D Systems	Cat#FAB3870P	2 µL

Los datos se analizaron con el software FlowJo™ vX.0.7. La población de interés se clasificó según su tamaño (FSC) y complejidad (SSC), seguido de la exclusión de dobletes (FSC-H vs. FSC-A) y de la exclusión de células muertas gracias a la tinción de viabilidad. A continuación, se cuantificaron las células que expresaban o no las proteínas de estudio y, tomando como referencia el control de isotipo, se definieron las poblaciones celulares positivas y negativas mediante histogramas, y se analizó la intensidad media de fluorescencia (FMI por sus siglas en inglés *Fluorescence Median Intensity*).

4. RESULTADOS

4.1. Estudio de la expresión de factores de crecimiento en tejidos de conejo

4.1.1. Ensayos de inmunohistoquímica

Por medio de ensayos de inmunohistoquímica indirecta se estudió la expresión y variación en la expresión del VEGF-A en los tejidos oculares de conejo de los distintos grupos experimentales.

En el grupo control (ojos sanos), se observó expresión de VEGF-A en todo el epitelio corneal y en el epitelio limbar, así como un leve marcaje alrededor de las células caliciformes del epitelio conjuntival y en las células endoteliales de los vasos sanguíneos del estroma conjuntival. En el resto de los grupos experimentales, a excepción del grupo experimental del modelo crónico tratado con AT-MSCs, se observó un aumento en la intensidad de marcaje positivo en todo el epitelio corneal, limbar y conjuntival, siendo especialmente acusado el incremento de marcaje detectado en los estromas limbar y conjuntival (*Figura 3*).

Comparando los resultados obtenidos entre los dos grupos experimentales del modelo agudo, no se observaron grandes cambios de expresión mostrada en el epitelio y estroma corneales entre los tejidos del grupo tratado con BSS y el tratado con AT-MSCs. Sin embargo, sí que se vio un incremento del marcaje en el epitelio conjuntival superior y en los estromas conjuntivales y limbares en el grupo tratado con AT-MSCs en comparación con el grupo tratado con BSS. En cambio, los tejidos del modelo crónico mostraron grandes diferencias en la expresión de VEGF-A entre los procedentes del grupo tratado con BSS y el tratado con AT-MSCs, siendo la intensidad de marcaje de este segundo grupo, similar al grupo control del estudio. Los tejidos con mayor intensidad de marcaje en el grupo del modelo crónico tratado con BSS fueron el epitelio y el estroma conjuntivales, el estroma limbar superior, el epitelio limbar inferior y el epitelio de la córnea central (*Figura 3*).

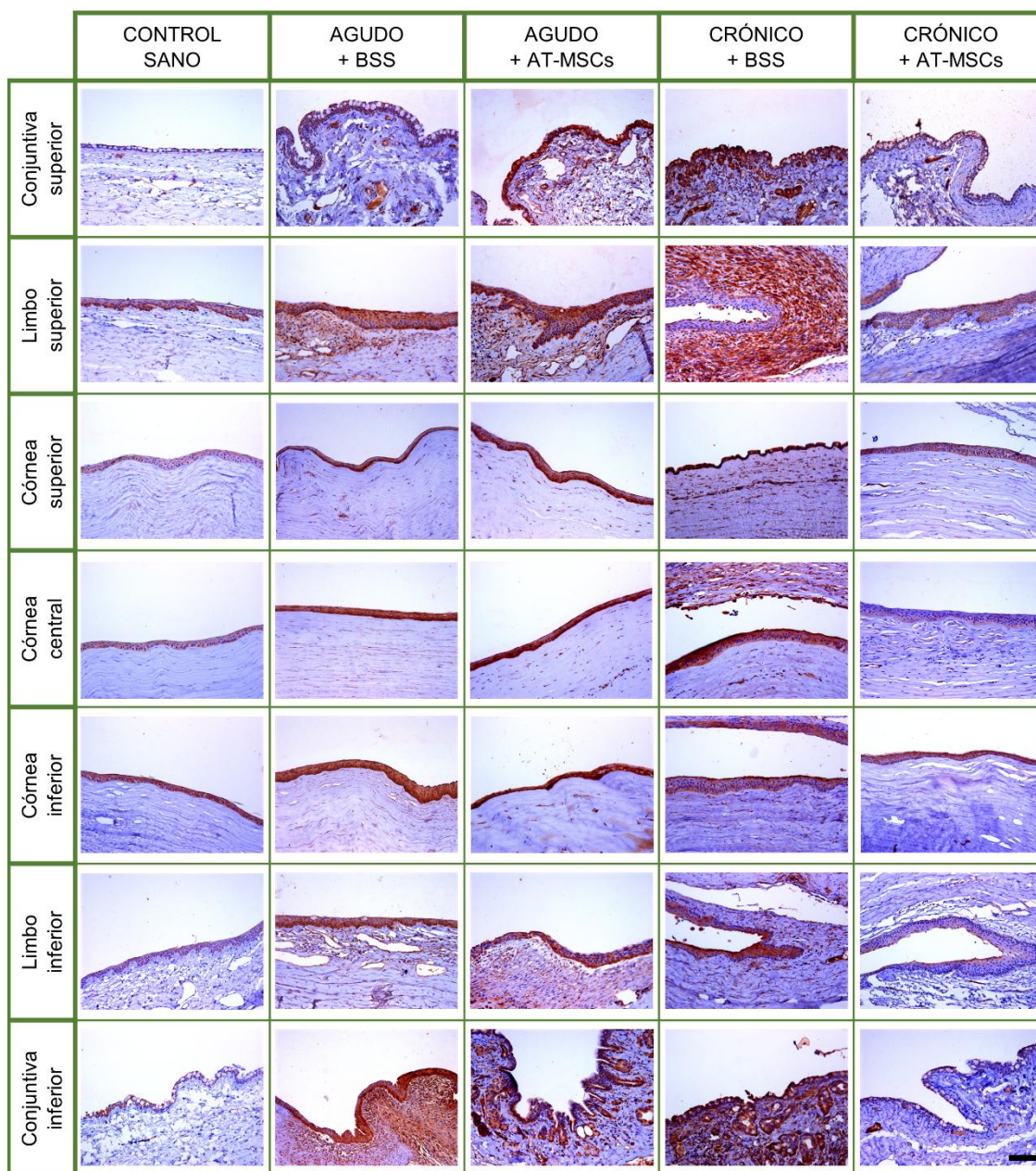


Figura 3. Imágenes de inmunohistoquímica de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). Imágenes representativas de los tejidos de la superficie ocular de los cinco grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (CONTROL SANO) (n=3); tejidos del modelo agudo de deficiencia de células madre limbo-corneales (LSCD) inyectados con BSS (AGUDO + BSS) (n=4) o con una suspensión de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs) (AGUDO + AT-MSCs) (n=4); tejidos del modelo crónico de LSCD inyectados subconjuntivalmente con BSS (CRÓNICO + BSS) (n=3) o con una suspensión de AT-MSCs (CRÓNICO + AT-MSCs) (n=3). En las imágenes se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con hematoxilina y en marrón la proteína VEGF-A. Imágenes tomadas con un microscopio óptico de campo claro a un aumento de 20X. La barra de la escala indica 100 μ m.

4.1.2. Ensayos de inmunofluorescencia

Para determinar si existían cambios en la expresión de los factores de crecimiento EGF y PDGF-B en los tejidos oculares de conejo procedentes de los distintos grupos experimentales, se realizaron inmunofluorescencias indirectas, y se estudió la variación en la intensidad de fluorescencia en las distintas regiones tisulares y grupos experimentales.

En primer lugar, se estudió la variación de la expresión del EGF. En los controles sanos, se observó que su expresión se localizaba principalmente en el epitelio corneal y en el epitelio y estroma limbar y conjuntival. En los tejidos procedentes del modelo agudo y del modelo crónico tratados con BSS, se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia frente a los controles sanos. Sin embargo, en los tejidos procedentes de los modelos agudo y crónico tratados con AT-MSCs, se observó un incremento de la intensidad de fluorescencia con respecto a los tratados con BBS en todo el epitelio de la superficie ocular. Este incremento fue especialmente acusado en el epitelio del limbo superior y de la conjuntiva inferior del modelo agudo, y en el epitelio de la córnea (superior, central e inferior), el limbo inferior y la conjuntiva inferior del modelo crónico. Se observó una mayor expresión de este marcador en el estroma limbar superior del modelo agudo tratado con AT-MSCs y del estroma del limbo superior del crónico tratado con AT-MSCs frente a los controles sanos (*Figura 4*).

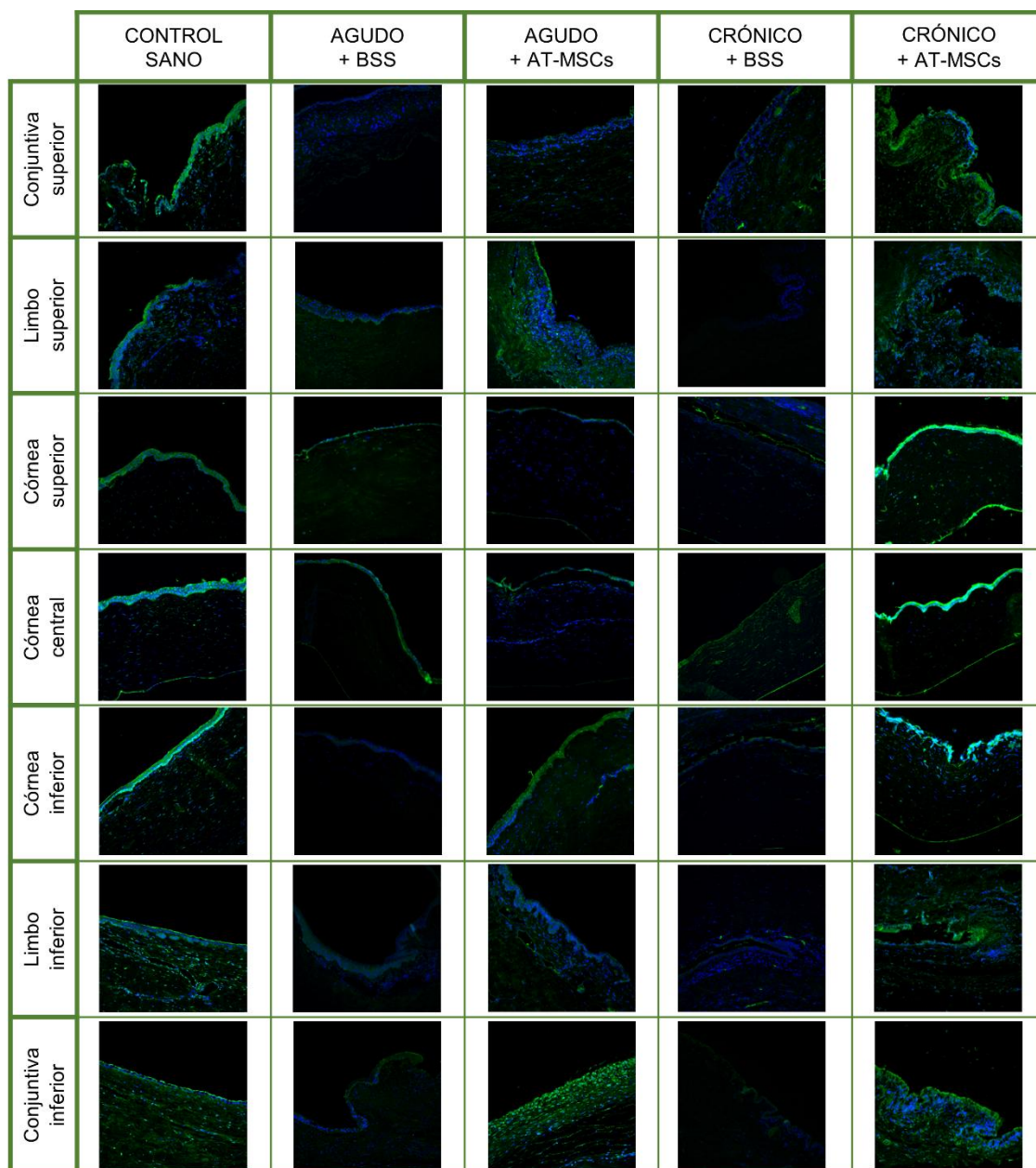


Figura 4. **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF).** Imágenes representativas de los tejidos de la superficie ocular de los cinco grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (CONTROL SANO) (n=3); tejidos del modelo agudo de deficiencia de células madre limbo-corneales (LSCD) inyectados con BSS (AGUDO + BSS) (n=4) o con una suspensión de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs) (AGUDO + AT-MSCs) (n=4); tejidos del modelo crónico de LSCD inyectados subconjuntivalmente con BSS (CRÓNICO + BSS) (n=3) o con una suspensión de AT-MSCs (CRÓNICO + AT-MSCs) (n=3). En las imágenes se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con un fluoróforo nuclear (DAPI) y en verde la proteína EGF. Imágenes tomadas con un microscopio invertido de fluorescencia a un aumento de 20X. La barra de la escala indica 100 μ m.

Los resultados obtenidos del estudio de la expresión de PDGF-B demostraron una baja intensidad de fluorescencia y, por ende, de la expresión de dicho marcador en los controles sanos. Esta baja intensidad de fluorescencia se mantuvo en los tejidos oculares de los modelos agudo y crónico inyectados con BSS. En cambio, se observó un aumento en la intensidad de fluorescencia en los tejidos oculares de los conejos de los modelos agudo y crónico inyectados con AT-MSCs,

en comparación con los resultados obtenidos en tejidos oculares sanos y en los de aquellos inyectados con BSS. En los tejidos del modelo agudo tratado con AT-MSCs este aumento de expresión se observó principalmente en el epitelio y estroma limbares (tanto superior como inferior) y en el epitelio corneal. En el caso de los tejidos del modelo crónico tratado con AT-MSCs, se observó un aumento de la expresión de PDGF-B en el epitelio corneal y conjuntival y en el epitelio limbar inferior, en comparación con tejidos del modelo crónico tratado con BSS. En estos mismos tejidos, también se observó un aumento de su expresión en el estroma conjuntival superior e inferior y en el estroma corneal superior e inferior con respecto a los controles sanos (*Figura 5*).

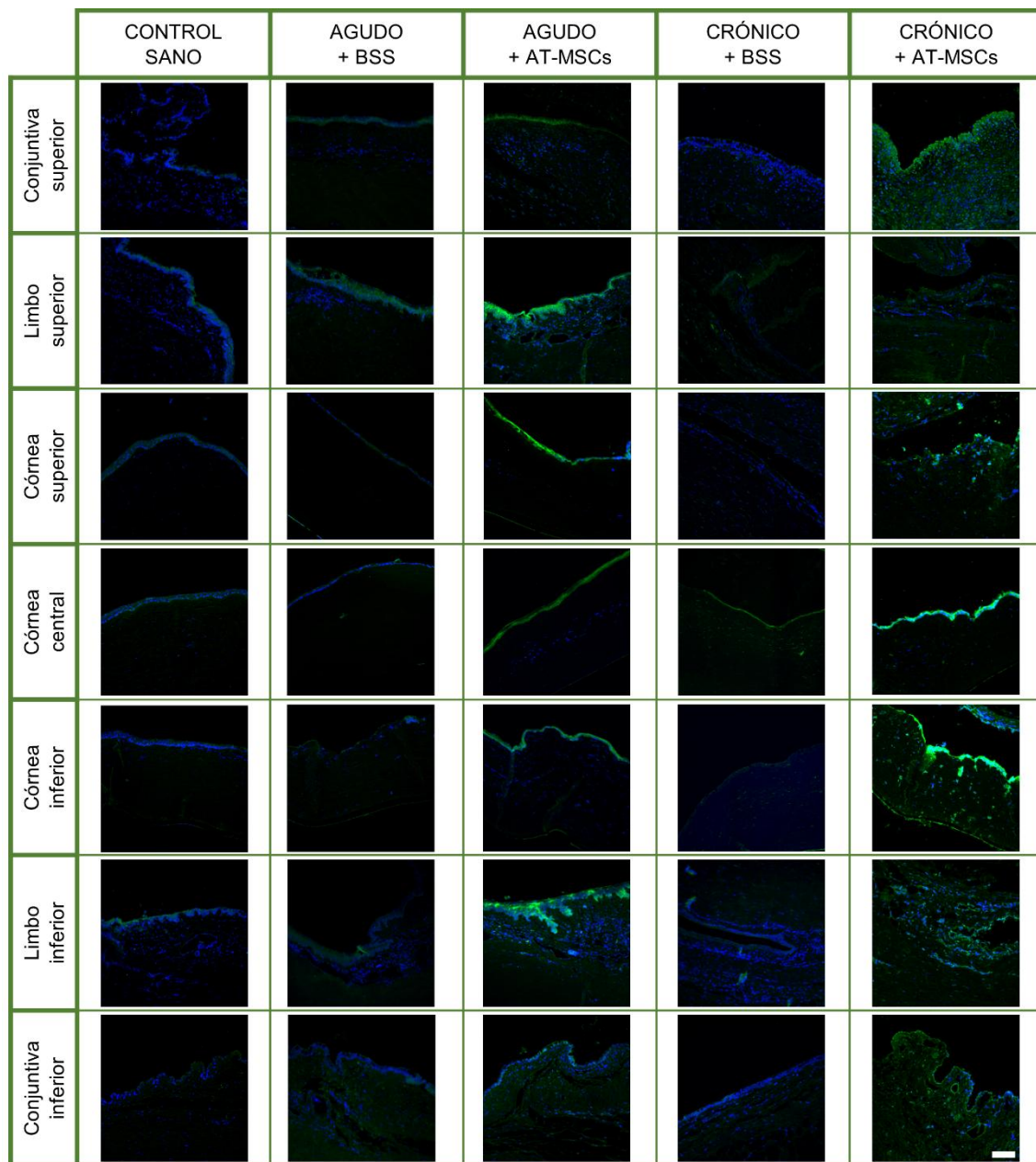


Figura 5. **Imágenes de inmunofluorescencia de la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B).** Imágenes representativas de los tejidos de superficie ocular de los cinco grupos experimentales analizados: tejidos oculares sanos (CONTROL SANO) (n=3); tejidos del modelo agudo de deficiencia de células madre limbo-corneales (LSCD) inyectados con BSS (AGUDO + BSS) (n=4) o con una suspensión de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (AT-MSCs) (AGUDO + AT-MSCs) (n=4); tejidos del modelo crónico de LSCD inyectados subconjuntivalmente con BSS (CRÓNICO + BSS) (n=3) o con una suspensión de AT-MSCs (CRÓNICO + AT-MSCs) (n=3). En las imágenes se pueden diferenciar en azul los núcleos teñidos con un fluoróforo nuclear (DAPI) y en verde la proteína PDGF-B. Imágenes tomadas con el microscopio invertido de fluorescencia a un aumento de 20X. La barra de la escala indica 100 μ m.

4.3. Prueba preliminar para estudiar la expresión de receptores de factores de crecimiento en AT-MSCs

Para determinar el efecto de la exposición a medios condicionados por células HCEs sometidas a un estímulo proinflamatorio sobre la expresión de receptores de membrana relacionados con la migración y quimiotracción de las AT-MSCs (EGF-R, PDGFR-B, VEGFR y

NRP-1), se llevó a cabo una prueba preliminar mediante citometría de flujo. Para cada marcador se cuantificó el porcentaje de células positivas y la FMI. Dado que este estudio se realizó como prueba preliminar, los resultados se presentan de manera descriptiva y no fueron sometidos a análisis estadístico.

Se observó un aumento en el porcentaje de células positivas para EGF-R con respecto a las poblaciones control (incubadas con medio de cultivo completo de AT-MSCs), en todas las condiciones experimentales estudiadas, excepto en la condición de incubación en medio DMEM/F-12 sin FBS, donde el porcentaje pasó a ser del 59,2 % frente al 82,1 % del control (*Figura S1 A-E*). En el caso del PDGFR-B, se observó que el 96,5 % de la población celular era positiva para este receptor en condiciones de cultivo estándar, manteniéndose este porcentaje en niveles similares en las células expuestas a medio DMEM/F-12, tanto sin FBS como con FBS, con un 99 % y un 95,8 % de células positivas, respectivamente. Sin embargo, este porcentaje disminuyó cuando las células fueron expuestas a medios condicionados por las células HCE sometidas a un estímulo proinflamatorio. Esta reducción fue mayor cuando el medio condicionado contenía FBS (DMEM/F-12 condicionado con FBS), donde el porcentaje de células positivas alcanzó un valor de 60,2 %, en comparación con el 90,2 % observado con el medio condicionado sin FBS (DMEM/F-12 condicionado sin FBS) (*Figura S1 F-J*). En cuanto al VEGFR, solamente el 2,62 % de las poblaciones celulares incubadas en condiciones control fueron positivas para este receptor, manteniéndose este porcentaje cercano al 2 % en el resto de condiciones experimentales (*Figura S1 K-Ñ*). Por último, el porcentaje de células positivas para la NRP-1 se mantuvo próximo 99,9 % en todas las condiciones experimentales (*Figura S1 O-S*).

Por otro lado, se observó que la FMI para EGF-R aumentó en todas las condiciones de cultivo en comparación con el control, excepto en las células incubadas con DMEM/F-12 sin FBS, donde disminuyó hasta 813,8, frente al valor de 1.448,2 observado en el control (*Figura 6A*). La FMI de PDGFR-B se mantuvo en niveles similares en las células incubadas en condiciones control (1.905,95) y en medio DMEM/F-12 sin FBS (1.988,3). Sin embargo, se observó una gran disminución de la FMI de este receptor cuando las células fueron expuestas a medios condicionados por células HCE sometidas a un estímulo proinflamatorio, alcanzando valores de 1.181,7 en presencia de FBS (DMEM/F-12 condicionado con FBS) y de 504,8 en ausencia del mismo (DMEM/F-12 condicionado sin FBS) (*Figura 6B*). En cuanto al VEGFR, el valor de la FMI se mantuvo cercano al del control cuando las células fueron incubadas con medio DMEM/F-12 con FBS (26,7 frente a 26,3, respectivamente). Sin embargo, estos valores disminuyeron hasta valores negativos cuando las células fueron incubadas con medio DMEM/F-12 sin FBS y con los medios condicionados con las HCE en condiciones proinflamatorias, tanto en presencia como en ausencia de FBS (*Figura 6C*). En el caso de la NRP-1, se observó una ligera disminución de la FMI en las células incubadas con DMEM/F-12 sin FBS (20.794,8), en

comparación con el valor observado en las células incubadas en condiciones control (23.296,2). Sin embargo, este valor aumentó hasta 30.849,5 cuando las células fueron incubadas con el medio condicionado con las células HCE en ausencia de FBS. En presencia de FBS en el medio DMEM/F-12, la FMI de NRP-1 se mantuvo en niveles similares a los observados en las células incubadas en condiciones control (23.421,1), aunque se detectó una ligera disminución cuando el medio DMEM/F-12 estaba condicionado por las células HCE sometidas a condiciones proinflamatorias (21.085) (Figura 6D).

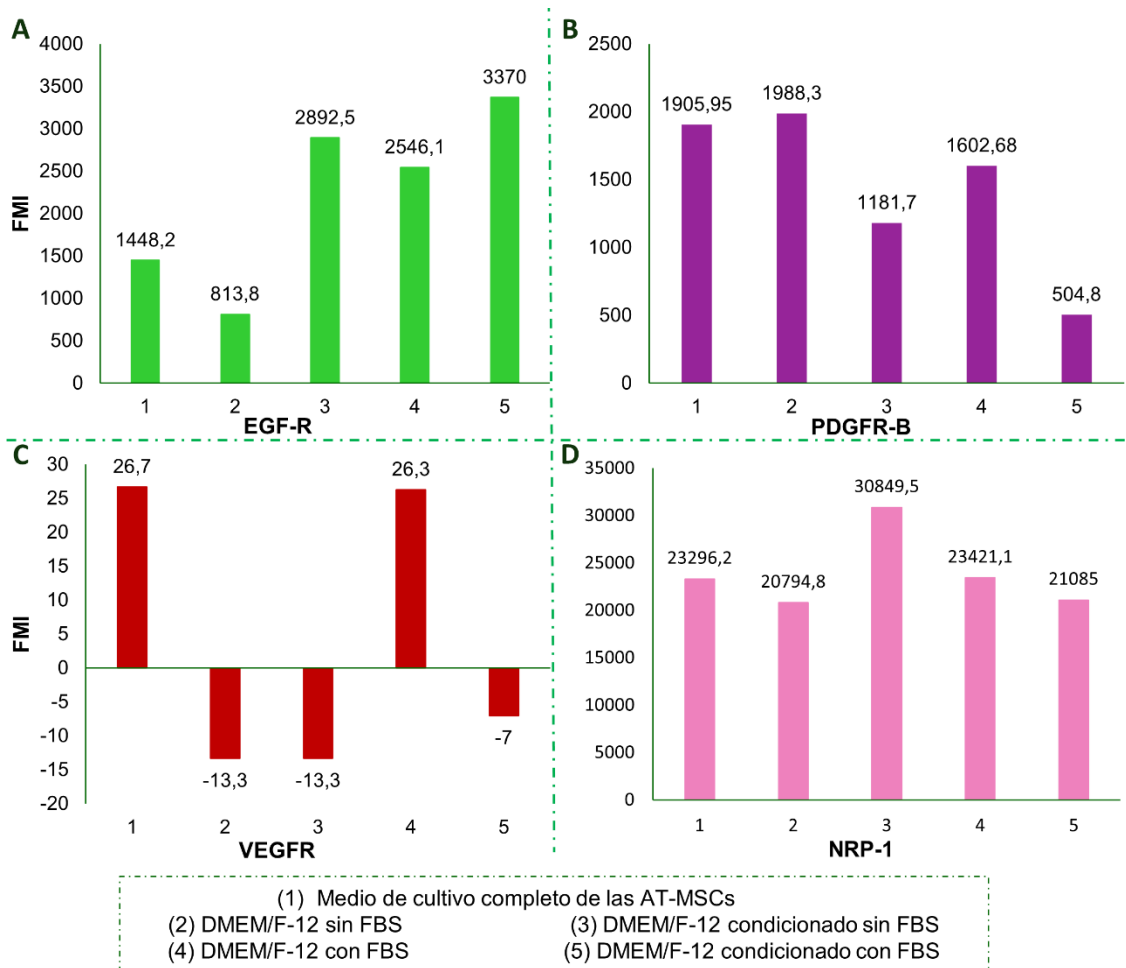


Figura 6. **Gráficas representativas de la intensidad media de fluorescencia (FMI).** Se muestran las gráficas con los valores de FMI para cada uno de los marcadores: EGF-R (A), PDGFR-B (B), VEGFR (C) y NRP-1 (D) en cada una de las condiciones a estudio: Medio de cultivo completo de las AT-MSCs (1), DMEM/F-12 sin FBS (2), DMEM/F-12 condicionado sin FBS (3), DMEM/F-12 con FBS (4) y DMEM/F-12 condicionado con FBS (5).

5. DISCUSIÓN

Las AT-MSCs han ganado una gran relevancia en el ámbito de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa a causa de su fácil obtención y el gran número de propiedades que tienen: capacidad de autorrenovación y diferenciación a distintos tipos celulares, capacidad inmunomoduladora y antiinflamatoria, su habilidad para migrar a tejidos dañados o incluso, secretar vesículas extracelulares que logren reparar el daño tisular. Es por ello que son utilizadas en terapias para distintas patologías tales como la osteoartritis, la atrofia muscular espinal, la

enfermedad de injerto contra huésped o la LSCD [36].

En el presente trabajo se ha estudiado la expresión de factores de crecimiento que podrían estar involucrados en la migración y quimiotracción de las AT-MSCs inyectadas subconjuntivalmente en un modelo animal de LSCD desarrollado en conejo. Se eligió el conejo como modelo animal debido a que el tamaño de su ojo es idóneo para ciertos procedimientos quirúrgicos y permite un mejor examen de la superficie ocular. Además, su vida media permite realizar estudios relacionados con sintomatología crónica, típica de las enfermedades oculares [37]. Es por ello que el conejo es uno de los modelos animales más utilizados en el estudio de enfermedades oculares y, en concreto, la LSCD [18,38].

El estudio inmunohistoquímico frente VEGF-A en tejidos sanos reveló una expresión uniforme de este marcador en todo el epitelio corneal, el epitelio limbar, el entorno de las células caliciformes de la conjuntiva y en los vasos sanguíneos del estroma conjuntival. Esta expresión se vio incrementada en los tejidos dañados del modelo experimental de LSCD (tanto en el modelo agudo como en el crónico tratados únicamente con BSS), acompañada de la presencia de signos característicos de inflamación y neovascularización. Estos resultados eran esperables, dado el papel que se sabe que VEGF-A desempeña en el desarrollo y mantenimiento de los vasos sanguíneos y linfáticos [39,40], así como su conocida expresión en células inflamatorias como macrófagos y células T [41]. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Philipp W. et al. (2000) [42], quienes estudiaron la expresión de VEGF en el epitelio corneal en condiciones normales y en condiciones de inflamación y vascularización corneal. Aunque la expresión de VEGF-A fue mayor en los tejidos dañados del modelo agudo que en los controles sanos, sus niveles fueron similares en los tejidos tratados con BSS y con AT-MSCs, lo que sugiere que una única semana de evolución postratamiento sería insuficiente para observar los efectos de las AT-MSCs. En cambio, en el modelo crónico, se observó una disminución de la expresión de VEGF-A en los tejidos de los animales tratados con AT-MSCs, alcanzando niveles similares a los observados en los tejidos sanos. Esta reducción podría atribuirse a un mayor tiempo de evolución postratamiento, que habría favorecido la disminución de la presencia de infiltrados inflamatorios y de neovasos, en concordancia con las propiedades antiinflamatorias y anti-angiogénicas que las AT-MSCs han mostrado en ciertas patologías [43,44].

En concordancia con estudios previos [45], los ensayos de inmunofluorescencia mostraron una expresión basal de EGF en el epitelio corneal de los tejidos oculares sanos. Asimismo, se detectó la expresión de este factor de crecimiento en los epitelios limbares y conjuntivales sanos, lo cual concuerda con estudios previos donde se vio una expresión de EGF en células epiteliales en otros epitelios escamosos estratificados no queratinizados [46,47]. En el modelo de LSCD inyectado con BSS, la expresión de EGF se redujo tanto a tiempo corto como a tiempo largo. Aunque este resultado fue inesperado, podría estar provocado por el procedimiento de

desepitelización y limbectomía empleado durante la inducción de la LSCD en los conejos [48]. Como era de esperar, la expresión de EGF volvió a aumentar hasta alcanzar niveles similares a los de los tejidos sanos en los animales tratados con AT-MSCs, en línea con el papel que tiene este factor de crecimiento en la regeneración tisular y la curación de heridas [49]. Este efecto fue más evidente en el modelo crónico, probablemente como consecuencia de la reducción de la inflamación y del mayor tiempo transcurrido desde la aplicación del tratamiento hasta la toma de muestras.

La expresión de PDGF-B observada en los controles sanos fue prácticamente nula, lo que concuerda con resultados previamente publicados por Antoniades et al. (1991) sobre la falta de expresión de PDGF-B en células epiteliales [50]. En contraste, se observó que la expresión de este factor de crecimiento aumentó ligeramente en el estroma conjuntival de las muestras tisulares de los conejos con daño tratados con BSS, posiblemente asociado a su función esencial en la angiogénesis [51], un proceso involucrado en la neovascularización característica de la LSCD [11,18]. Sin embargo, se observó un notable aumento en la expresión de PDGF-B en los epitelios corneales, limbares y conjuntivales de los conejos tratados con AT-MSCs. Esto podría ser consecuencia de la capacidad regenerativa y de curación de heridas de este factor de crecimiento [20,52]. También podría ser resultado de la respuesta a la presencia de AT-MSCs en el entorno, cuyo aumento podría estimular la migración celular hacia la región dañada, así como intervenir en la regulación del crecimiento y la división celulares [29,49].

El ensayo preliminar realizado mediante citometría de flujo demostró la expresión constitutiva de EGF-R, PDGFR-B y NRP-1 en la superficie de las AT-MSCs, así como la baja expresión de VEGFR en condiciones de cultivo estándar, como ya se había demostrado en estudios previos [21,31,53]. Al cultivar las AT-MSCs en medio DMEM/F-12 sin suplementos, se vio reducida la expresión de todos los receptores estudiados, a excepción del PDGFR-B, lo que podría deberse a la falta de crecimiento de las células asociado con la ausencia de FBS en el medio de cultivo. Sin embargo, la exposición de las AT-MSCs a un microambiente proinflamatorio (medio condicionado) indujo un incremento en la expresión de EGF-R y NRP-1, que podría estar causado por la activación de vías asociadas a las propiedades antiinflamatorias de las AT-MSCs [54,55]. No obstante, en estas mismas condiciones, se observó una disminución en la expresión de PDGFR-B, lo que resultó inesperado dada su conocida implicación en la promoción de la mitosis [29], así como en la migración y la quimiotracción de las AT-MSCs [20].

Los elevados niveles de VEGF-A detectados mediante inmunofluorescencia en los tejidos dañados (modelo de LSCD tratado con BSS), podrían respaldar un posible incremento en la expresión de PDGFR-B en la superficie de las AT-MSCs que lograran migrar hasta el foco de la lesión, ya que otros estudios han reportado una relación entre el aumento de VEGF-A y una mayor expresión de este receptor [31]. Por tanto, se podría esperar que las AT-MSCs inyectadas en el

modelo de LSCD tengan un aumento más acusado de la expresión de PDGFR-B, dado el aumento observado de VEGF-A en los tejidos oculares. La discrepancia entre lo esperado y los resultados obtenidos tras exponer a las células a un microambiente inflamado *in vitro* podría deberse a la variabilidad inherente a este ensayo preliminar, a la heterogeneidad de la población celular, o a las limitaciones del modelo *in vitro* para reproducir la complejidad del entorno tisular dañado. Por todo ello, sería necesario validar estos resultados incrementando el número de pruebas experimentales.

Por otro lado, la presencia de FBS en el medio DMEM/F-12 produjo un aumento, tanto en el porcentaje de células positivas como de la FMI, de EGF-R en la superficie de las AT-MSCs, lo que podría estar causado por la presencia de diferentes proteínas y factores de crecimiento en el FBS [56]. Este efecto, en cambio, no se observó en PDGFR-B, VEGFR o NRP-1. En condiciones inflamatorias, tanto en presencia como en ausencia de FBS, se mantuvo el incremento de EGF-R y la disminución en la expresión de PDGFR-B. Esta tendencia contrapuesta, podría deberse a la variabilidad inherente a una prueba meramente preliminar. A diferencia de lo observado en condiciones inflamatorias en ausencia de FBS, la cantidad de NRP-1 disminuyó en las células incubadas con medio condicionado suplementado con FBS. Una posible explicación de este resultado sería la presencia de factores de crecimiento u otras proteínas en el FBS que podrían activar mecanismos de retroalimentación negativa, saturando los receptores y causando una disminución en su síntesis para evitar una respuesta exacerbada.

A pesar de que las AT-MSCs representan una alternativa terapéutica eficaz para los pacientes con LSCD [23,26], se necesita mayor investigación para comprender plenamente los mecanismos mediante los cuales estas células ejercen sus efectos terapéuticos. Para lograr valorar su verdadero potencial, será necesario realizar estudios adicionales en los que se incremente el tamaño muestral y se estudie la expresión de los receptores de los factores de crecimiento en distintos tiempos de exposición a un entorno inflamatorio. Asimismo, sería relevante estudiar otra serie de moléculas, como ciertas quimiocinas involucradas en la migración y quimotración de las AT-MSCs. Por último, dada la importancia del microambiente generado por estas células mediante la liberación de factores solubles y vesículas extracelulares, futuras investigaciones podrían enfocarse en estudiar y caracterizar el secretoma de las AT-MSCs expuestas a condiciones inflamatorias, debido a su posible relación con el potencial terapéutico observado.

6. CONCLUSIONES

- El análisis de los tejidos oculares en el modelo de LSCD indica que la administración subconjuntival de AT-MSCs modula de forma diferencial la expresión de factores de crecimiento, aumentando EGF y PDGF-B y disminuyendo VEGF-A, especialmente a largo plazo. Estos resultados sugieren que el efecto terapéutico de las AT-MSCs se potencia con

el tiempo, posiblemente por una mayor integración celular y la reducción progresiva del microambiente inflamatorio.

- El estudio preliminar de la expresión de los receptores de factores de crecimiento mostró que las AT-MSCs expresan de forma constitutiva EGF-R, PDGFR-B y NRP-1, pero no VEGF-R. La alteración de esta expresión tras la exposición a un microambiente inflamatorio *in vitro* respalda la hipótesis de que estas células no solo emiten señales regenerativas, sino que también actúan como sensores del entorno tisular, adaptando su respuesta a los estímulos locales.

7. LIMITACIONES

El trabajo realizado tiene una serie de limitaciones que se han de tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos.

Existe una gran variabilidad entre los modelos *in vivo* del trabajo y, además, existe un bajo tamaño muestral (n= 3 en los grupos de sanos y crónicos y n= 4 en los grupos de los agudos), lo que se deberá tener presente en futuros estudios que requieran obtener resultados estadísticamente significativos. De igual modo, la enfermedad ha sido inducida en el modelo *in vivo*, sin ser igual que lo ocurrido en el humano; también se tiene que tener en cuenta que la evolución de la misma no es igual en todas las especies y, por tanto, los resultados no pueden ser del todo extrapolables al humano.

Por otro lado, el carácter preliminar del ensayo mediante CF llevado a cabo para estudiar la expresión de los receptores superficiales de las AT-MSC, conlleva la necesidad de tener que realizar más ensayos. Se deberán realizar estudios a distintos tiempos de exposición de las AT-MSCs al medio condicionado de las HCE inflamadas, así como aumentar el tamaño muestral para lograr obtener resultados estadísticamente significativos. Además, las células utilizadas procedieron de un mismo donante, siendo necesaria la repetición del estudio en células procedentes de distintos donantes con el fin de conocer si existe variabilidad. Por último, al tratarse de una prueba preliminar, se utilizaron células de pases elevados (pase 13) y, dado que en clínica se utilizarían células de pases bajos (pases entre 3 y 5), convendría repetir este ensayo en condiciones lo más parecidas a su posible futuro uso como tratamiento.

8. FINANCIACIÓN

Este TFG ha sido financiado por el proyecto de investigación titulado “Células madre mesenquimales nano-ingenierizadas para mejorar la eficacia de los trasplantes de células madre a la superficie ocular”, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2019-105525RB-100/AEI/10.13039/501100011033). Además, ha contado con el apoyo de una Beca de Colaboración de Estudiantes en Departamentos Universitarios del Ministerio de Educación, Formación Profesional y Deportes, concedida para el curso académico 2024-2025.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lee WB, Mannis MJ. Historical Concepts of Ocular Surface Disease. *Ocular Surface Disease: Cornea, Conjunctiva and Tear Film*, Elsevier; 2013, p. 3–10. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2876-3.00001-8>.
- [2] Sridhar M. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* 2018;66:190. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_646_17.
- [3] Ana Cristina Villaro Gumpert. Ojo. *Histología para estudiantes*. 1st ed., Editorial médica Panamericana; 2021, p. 643–72.
- [4] Downie LE, Bandlitz S, Bergmanson JPG, Craig JP, Dutta D, Maldonado-Codina C, Ngo W, Siddireddy JS, Wolffsohn JS. CLEAR - Anatomy and physiology of the anterior eye. *Contact Lens and Anterior Eye* 2021;44:132–56. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2021.02.009>.
- [5] Dziasko MA, Armer HE, Levis HJ, Shortt AJ, Tuft S, Daniels JT. Localisation of Epithelial Cells Capable of Holoclone Formation In Vitro and Direct Interaction with Stromal Cells in the Native Human Limbal Crypt. *PLoS One* 2014;9:e94283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094283>.
- [6] Shortt AJ, Secker GA, Munro PM, Khaw PT, Tuft SJ, Daniels JT. Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. *Stem Cells* 2007;25:1402–9. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0580>.
- [7] DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* 2011;37:588–98. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>.
- [8] Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 1986;103:49–62. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.1.49>.
- [9] Cotsarelis G, Cheng S-Z, Dong G, Sun T-T, Lavker RM. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell* 1989;57:201–9. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90958-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90958-6).
- [10] Haagdorens M, Van Acker SI, Van Gerwen V, Ní Dhubbghaill S, Koppen C, Tassignon M-J, Zakaria N. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. *Stem Cells Int* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9798374>.
- [11] Le Q, Xu J, Deng SX. The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul Surf* 2018;16:58–69. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.11.002>.
- [12] Deng SX, Borderie V, Chan CC, Dana R, Figueiredo FC, Gomes JAP, Pellegrini G, Shimmura S, Kruse FE. Global Consensus on Definition, Classification, Diagnosis, and Staging of Limbal Stem Cell Deficiency. *Cornea* 2019;38:364–75. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001820>.
- [13] Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *New England Journal of Medicine* 2010;363:147–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905955>.
- [14] Calonge M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M. Goals and Challenges of Stem Cell-Based Therapy for Corneal Blindness Due to Limbal Deficiency. *Pharmaceutics* 2021;13:1483. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091483>.
- [15] Ramachandran C, Basu S, Sangwan VS, Balasubramanian D. Concise Review: The Coming of Age of Stem Cell Treatment for Corneal Surface Damage. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:1160–8. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0064>.
- [16] López-Paniagua M, Galindo S, Calonge M, Pérez I, Herreras JM, de la Mata A, Nieto-Miguel T. Mesenchymal Stem Cells for Regeneration of the Ocular Surface. *Essentials in Ophthalmology*, 2023, p. 211–24. https://doi.org/10.1007/978-3-031-32408-6_15.
- [17] TomyTomcy A, Sindhu ER. Mesenchymal stem cells- an excellent therapeutic agent for cancer. *Asia Pac J Clin Oncol* 2024;20:7–15. <https://doi.org/10.1111/ajco.13969>.
- [18] Galindo S, de la Mata A, López-Paniagua M, Herreras JM, Pérez I, Calonge M, Nieto-Miguel T. Subconjunctival injection of mesenchymal stem cells for corneal failure due to limbal stem cell deficiency: state of the art. *Stem Cell Res Ther* 2021;12:60. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02129-0>.
- [19] Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 2011;20:5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>.
- [20] Liu J, Gao J, Liang Z, Gao C, Niu Q, Wu F, Zhang L. Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Res Ther* 2022;13:429. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02985-y>.
- [21] Baek SJ, Kang SK, Ra JC. In vitro migration capacity of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells reflects their expression of receptors for chemokines and growth factors. *Exp Mol Med* 2011;43:596. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.10.069>.

- [22] Vincent LG, Choi YS, Alonso-Latorre B, del Álamo JC, Engler AJ. Mesenchymal stem cell durotaxis depends on substrate stiffness gradient strength. *Biotechnol J* 2013;8:472–84. <https://doi.org/10.1002/biot.201200205>.
- [23] Calonge M, Pérez I, Galindo S, Nieto-Miguel T, López-Paniagua M, Fernández I, Alberca M, García-Sancho J, Sánchez A, Herreras JM. A proof-of-concept clinical trial using mesenchymal stem cells for the treatment of corneal epithelial stem cell deficiency. *Translational Research* 2019;206:18–40. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.11.003>.
- [24] Sikora B, Skubis-Sikora A, Prusek A, Gola J. Paracrine activity of adipose derived stem cells on limbal epithelial stem cells. *Sci Rep* 2021;11:19956. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99435-1>.
- [25] Galindo S, Herreras JM, López-Paniagua M, Rey E, de la Mata A, Plata-Cordero M, Calonge M, Nieto-Miguel T. Therapeutic Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Corneal Failure Due to Limbal Stem Cell Niche Damage. *Stem Cells* 2017;35:2160–74. <https://doi.org/10.1002/stem.2672>.
- [26] Boto de los Bueis A, Vidal Arranz C, Del Hierro-Zarzuelo A, Díaz Valle D, Méndez Fernández R, Gabarrón Hermosilla MI, Benítez del Castillo JM, García-Arranz M. Long-Term Effects of Adipose-Derived Stem Cells for the Treatment of Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Curr Eye Res* 2024;49:345–53. <https://doi.org/10.1080/02713683.2023.2297342>.
- [27] Li Y, Li D, You L, Deng T, Pang Q, Meng X, Zhu B. dCas9-Based PDGFR- β Activation ADSCs Accelerate Wound Healing in Diabetic Mice through Angiogenesis and ECM Remodeling. *Int J Mol Sci* 2023;24:5949. <https://doi.org/10.3390/ijms24065949>.
- [28] Periasamy R, Elshaer SL, Gangaraju R. CD140b (PDGFR β) Signaling in Adipose-Derived Stem Cells Mediates Angiogenic Behavior of Retinal Endothelial Cells. *Regen Eng Transl Med* 2019;5:1–9. <https://doi.org/10.1007/s40883-018-0068-9>.
- [29] Hye Kim J, Gyu Park S, Kim W-K, Song SU, Sung J-H. Functional Regulation of Adipose-Derived Stem Cells by PDGF-D. *Stem Cells* 2015;33:542–56. <https://doi.org/10.1002/stem.1865>.
- [30] Baer PC, Schubert R, Bereiter-Hahn J, Plöcker M, Geiger H. Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. *Eur J Cell Biol* 2009;88:273–83. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.12.001>.
- [31] Ball SG, Bayley C, Shuttleworth CA, Kieley CM. Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochemical Journal* 2010;427:29–40. <https://doi.org/10.1042/BJ20091512>.
- [32] Okuyama H, Krishnamachary B, Zhou YF, Nagasawa H, Bosch-Marce M, Semenza GL. Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 in Bone Marrow-derived Mesenchymal Cells Is Dependent on Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:15554–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602003200>.
- [33] Jung E, Ou S, Ahn SS, Yeo H, Lee YH, Shin SY. The JNK-EGR1 signaling axis promotes TNF- α -induced endothelial differentiation of human mesenchymal stem cells via VEGFR2 expression. *Cell Death Differ* 2023;30:356–68. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-01088-8>.
- [34] Khan S, Villalobos MA, Choron RL, Chang S, Brown SA, Carpenter JP, Tulenko TN, Zhang P. Fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor play a critical role in endotheliogenesis from human adipose-derived stem cells. *J Vasc Surg* 2017;65:1483–92. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.04.034>.
- [35] Enríquez-de-Salamanca A, Calder V, Gao J, Galatowicz G, García-Vázquez C, Fernández I, Stern ME, Diebold Y, Calonge M. Cytokine responses by conjunctival epithelial cells: An in vitro model of ocular inflammation. *Cytokine* 2008;44:160–7. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.07.007>.
- [36] Fernández-Garza LE, Barrera-Barrera SA, Barrera-Saldaña HA. Mesenchymal Stem Cell Therapies Approved by Regulatory Agencies around the World. *Pharmaceuticals* 2023;16:1334. <https://doi.org/10.3390/ph16091334>.
- [37] Loiseau A, Raïche-Marcoux G, Maranda C, Bertrand N, Boisselier E. Animal Models in Eye Research: Focus on Corneal Pathologies. *Int J Mol Sci* 2023;24:16661. <https://doi.org/10.3390/ijms242316661>.
- [38] Kethiri AR, Raju E, Bokara KK, Mishra DK, Basu S, Rao CM, Sangwan VS, Singh V. Inflammation, vascularization and goblet cell differences in LSCD: Validating animal models of corneal alkali burns. *Exp Eye Res* 2019;185:107665. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.05.005>.
- [39] Stevenson W, Cheng S-F, Dastjerdi MH, Ferrari G, Dana R. Corneal Neovascularization and the Utility of Topical VEGF Inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs Bevacizumab (Avastin). *Ocul Surf* 2012;10:67–83. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2012.01.005>.
- [40] Penha FM, Masud M, Khanani ZA, Thomas M, Fong RD, Smith K, Chand A, Khan M, Gahn G, Melo GB, Khanani AM. Review of real-world evidence of dual inhibition of VEGF-A and ANG-2 with faricimab in NAMD and DME. *Int J Retina Vitreous* 2024;10:5. <https://doi.org/10.1186/s40942->

- 024-00525-9.
- [41] Hoshino M, Nakamura Y, Hamid QA. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001;107:1034–8. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.115626>.
 - [42] Philipp W, Speicher L, Humpel C. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in inflamed and vascularized human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2514–22.
 - [43] Salari V, Mengoni F, Del Gallo F, Bertini G, Fabene PF. The Anti-Inflammatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Epilepsy: Possible Treatments and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* 2020;21:9683. <https://doi.org/10.3390/ijms21249683>.
 - [44] Javan MR, Khosrojerdi A, Moazzeni SM. New Insights Into Implementation of Mesenchymal Stem Cells in Cancer Therapy: Prospects for Anti-angiogenesis Treatment. *Front Oncol* 2019;9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00840>.
 - [45] Wilson SE, Chen L, Mohan RR, Liang Q, Liu J. Expression of HGF, KGF, EGF and Receptor Messenger RNAs Following Corneal Epithelial Wounding. *Exp Eye Res* 1999;68:377–97. <https://doi.org/10.1006/exer.1998.0603>.
 - [46] Sakai Y, Nelson KG, Snedeker S, Bossert NL, Walker MP, McLachlan J, DiAugustine RP. Expression of epidermal growth factor in suprabasal cells of stratified squamous epithelia: implications for a role in differentiation. *Cell Growth Differ* 1994;5:527–35.
 - [47] Calabro A, Orsini B, Renzi D, Papi L, Surrenti E, Amorosi A, Herbst H, Milani S, Surrenti C. Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor- α and their receptor in the human oesophagus. *Histochem J* 1997;29:745–58. <https://doi.org/10.1023/A:1026469219190>.
 - [48] Kinoshita S, Adachi W, Sotozono C, Nishida K, Yokoi N, Quantock AJ, Okubo K. Characteristics of the Human Ocular Surface Epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2001;20:639–73. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00007-6).
 - [49] Berlanga-Acosta J, Gavilondo-Cowley J, Barco-Herrera DG del, Martín-Machado J, Guillen-Nieto G. Epidermal Growth Factor (EGF) and Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) as Tissue Healing Agents: Clarifying Concerns about their Possible Role in Malignant Transformation and Tumor Progression. *J Carcinog Mutagen* 2011;02. <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000115>.
 - [50] Antoniadou HN, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Kiritsy CP, Lynch SE. Injury induces in vivo expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor mRNAs in skin epithelial cells and PDGF mRNA in connective tissue fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991;88:565–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.2.565>.
 - [51] Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals* 2010;3:572–99. <https://doi.org/10.3390/ph3030572>.
 - [52] Ahangar P, Mills SJ, Cowin AJ. Mesenchymal Stem Cell Secretome as an Emerging Cell-Free Alternative for Improving Wound Repair. *Int J Mol Sci* 2020;21:7038. <https://doi.org/10.3390/ijms21197038>.
 - [53] Ryu Y-J, Cho T-J, Lee D-S, Choi J-Y, Cho J. Phenotypic Characterization and In Vivo Localization of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cells* 2013;35:557–64. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0112-z>.
 - [54] Bosseboeuf E, Chikh A, Chaker AB, Mitchell TP, Vignaraja D, Rajendrakumar R, Khambata RS, Nightingale TD, Mason JC, Randi AM, Ahluwalia A, Raimondi C. Neuropilin-1 interacts with VE-cadherin and TGFBR2 to stabilize adherens junctions and prevent activation of endothelium under flow. *Sci Signal* 2023;16. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abo4863>.
 - [55] Rayego-Mateos S, Rodrigues-Diez R, Morgado-Pascual JL, Valentijn F, Valdivielso JM, Goldschmeding R, Ruiz-Ortega M. Role of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and Its Ligands in Kidney Inflammation and Damage. *Mediators Inflamm* 2018;2018:1–22. <https://doi.org/10.1155/2018/8739473>.
 - [56] Seth D, Shaw K, Jazayeri J, Leedman PJ. Complex post-transcriptional regulation of EGF-receptor expression by EGF and TGF- α in human prostate cancer cells. *Br J Cancer* 1999;80:657–69. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690407>.

ANEXOS

ANEXO I – Resultados de citometría de flujo

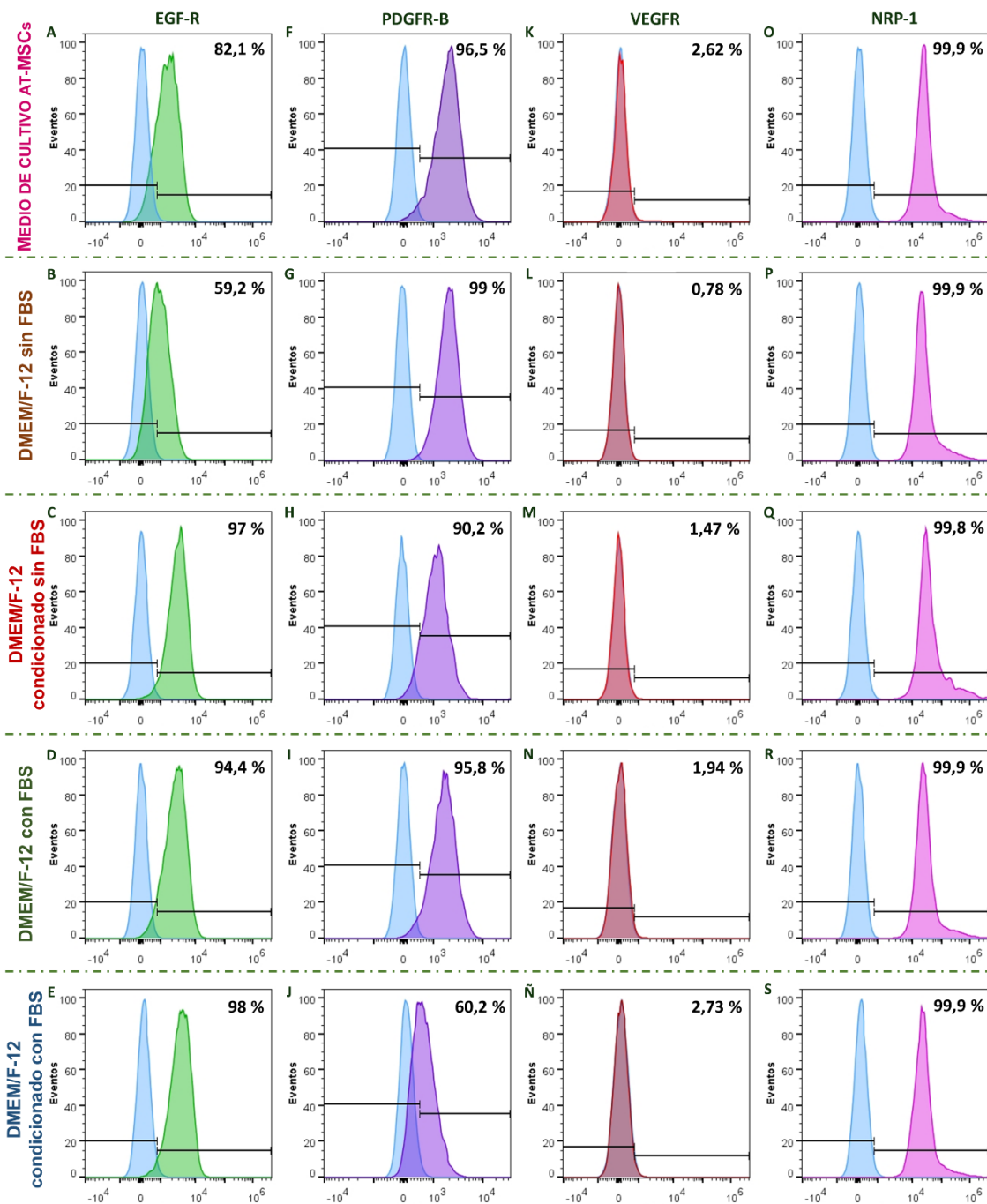


Figura S1. Porcentaje de células positivas que expresan EGF-R, PDGFR-B, VEGFR y NRP-1 en AT-MSCs analizados mediante citometría de flujo (CF). Se muestran los histogramas de las poblaciones celulares estudiadas y el porcentaje de células positivas para cada proteína analizada en la prueba preliminar realizada. Cada color corresponde a una proteína: VERDE, EGF-R (A-E); MORADO, PDGFR-B (F-J); ROJO, VEGFR (K-Ñ) y ROSA, NRP-1 (O-S). Siendo el AZUL el control de células sin teñir. Además, se muestran los resultados de las cinco condiciones experimentales: Medio de cultivo de las MSCs (Control) (A, F, K, O), medio DMEM/F-12 sin FBS (B, G, L, P), medio condicionado de las HCE sin FBS (DMEM/F12 condicionado sin FBS) (C, H, M, Q), medio DMEM/F-12 suplementado con FBS (DMEM/F-12 con FBS) (D, I, N, R) y medio condicionado de las HCE suplementado con FBS (DMEM/F12 condicionado con FBS) (E, J, Ñ, S).