

Efecto de la sobreexpresión de TSG-6 o CXCR4 en la capacidad migratoria, inmunomoduladora y prorregenerativa de células madre mesenquimales en un modelo *in vitro* de inflamación de epitelio corneal

E. González de la Parte^{1,2}, J.N. Figueroa-Haro^{3,4}, B. Marceñido^{3,4}, C. García Vázquez^{3,5}, S. Galindo de la Rosa^{3,4,6}, A. Enríquez-de-Salamanca^{3,4,7}, M. Álvarez-Bardón³, M. López-Paniagua,^{3,4,6} M. Calonge^{3,5,7}, A. López Miguel,^{3,5,7} T. Nieto-Miguel,^{3,4,6,7} A. de la Mata.^{3,4,7,8}

1. Máster en Investigación Biomédica y Terapias Avanzadas, Univ. de Valladolid, esthergdelaparte@gmail.com; 2. Grado en Ingeniería Biomédica, Univ. de Valladolid; 3. Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Univ. de Valladolid; 4. Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), España; 5. Departamento de Cirugía, Oftalmología, Otorrinolaringología y Fisioterapia, Univ. de Valladolid; 6. Departamento de Biología Celular, Genética, Histología y Farmacología, Univ. de Valladolid; 7. Unidad de Excelencia del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Univ. de Valladolid; 8. Departamento de Pediatría, Inmunología, Obstetricia y Ginecología, Nutrición y Bromatología, Psiquiatría e Historia de la Ciencia, Univ. de Valladolid.

Resumen

*El síndrome de insuficiencia límbica es una patología de la superficie ocular que provoca ceguera corneal por pérdida de células madre limbares. El trasplante de células madre mesenquimales (MSCs) ha demostrado una eficacia parcial en su tratamiento gracias a su capacidad inmunomoduladora, migratoria y regenerativa. Dicha eficacia se ha tratado de potenciar en este trabajo mediante la modificación genética de MSCs humanas de tejido adiposo con CXCR4 o TSG-6. La transducción de las MSCs no alteró su inmunofenotipo ni su capacidad de diferenciación multilinaje. Ensayos de migración y regeneración epitelial en modelos *in vitro* de inflamación demostraron la mejora en la capacidad regenerativa y migratoria de las MSCs gracias a la sobreexpresión de TSG-6 o CXCR4. El análisis de sobrenadantes mediante Luminex reveló que IL-6, MCP-1, RANTES y VEGF-A podrían estar implicados en la modulación de la efectividad del tratamiento.*

1. Introducción

La **córnea** es una estructura transparente que cubre la parte anterior del ojo, cuyo epitelio presenta alta tasa de renovación. El **limbo** es la zona de transición entre la córnea y la esclera/conjuntiva, en cuya parte más basal se localizan las células madre del epitelio limbar (LESC), encargadas de regenerar el epitelio corneal. La **LSCD o deficiencia de células madre limbares** es la pérdida o disfunción de las LESC, o su nicho, la cual impide la regeneración del epitelio corneal, causando dolor, inflamación, opacidad corneal, y una pérdida de visión [1, 2, 3]. Se han utilizado distintas **terapias** para tratar la LSCD, aunque la pérdida permanente de LESCs impide la cura definitiva [4]. Las terapias con células madre mesenquimales (MSCs), o con sus secretomas, se han consolidado como un tratamiento prometedor gracias a su capacidad de migrar hacia los tejidos dañados y a sus propiedades inmunomoduladoras y regenerativas [4, 5, 6], mediadas principalmente a través de la secreción de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento [5, 7]. A pesar de que estudios previos han demostrado que el trasplante de MSCs favorece la regeneración del epitelio corneal, el tratamiento no logra resolver por completo algunos de los signos clínicos característicos de la LSCD.

1.1. Justificación del estudio

Con el objetivo de mejorar el tratamiento de la LSCD, en este trabajo se ha tratado de potenciar la capacidad migratoria, inmunomoduladora y regenerativa de MSCs [6] modificándolas genéticamente para sobreexpresar el gen estimulado por el factor de necrosis tumoral α -6 (TSG-6), una proteína prorregenerativa y antiinflamatoria [8]; y el receptor de quimiocinas C-X-C tipo 4 (CXCR4), esencial para la migración hacia tejidos dañados [9]. Para evaluar estos efectos y dilucidar los posibles mecanismos moleculares subyacentes, se emplearon modelos celulares de cierre de herida epitelial y de migración celular en un modelo *in vitro* de inflamación de epitelio corneal.

2. Hipótesis y objetivos

Hipótesis: La sobreexpresión de TSG-6 o CXCR4 en MSCs mejora su capacidad regenerativa y migratoria modulando la secreción de algunas citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en un modelo *in vitro* de inflamación de epitelio corneal.

Objetivo general: Evaluar el efecto de la sobreexpresión de TSG-6 y CXCR4 en MSCs sobre la capacidad migratoria, inmunomoduladora y regenerativa en un modelo *in vitro* de inflamación de epitelio corneal.

OE1. Sobreexpresar TSG-6 y CXCR4 en MSCs y analizar el mantenimiento de su inmunofenotipo y su capacidad de diferenciación multilinaje.

OE2. Estudiar el efecto de la sobreexpresión de TSG-6 y CXCR4 en la capacidad regenerativa y migratoria de las MSCs en un modelo *in vitro* de inflamación corneal.

OE3: Identificar moléculas implicadas en las respuestas del epitelio corneal tras el tratamiento *in vitro* con MSCs modificadas para sobreexpresar TSG-6 o CXCR4.

3. Materiales y métodos

Los **procedimientos** de este trabajo fueron aprobados por la Comisión de Investigación del IOBA y el C.E.I.M del Área de Salud de Valladolid Este (PI21-2180).

3.1. Modificación genética de las MSCs

Se utilizaron MSCs humanas de tejido adiposo de la colección de muestras biológicas nº1417 del Registro Nacional de Biobancos. Para su modificación genética para sobreexpresar TSG-6 o CXCR4 (MSCs-TSG-6 o MSCs-CXCR4, respectivamente), se transdujeron con 25 multiplicidades de infección de los vectores lentivirales EF1a-TSG6-IRES2mCherry-IRESpuromicina o EF1a-CXCR4-IRES2mCherry-IRESneomicina (GeneCopoeia).

3.2. Estudio del inmunofenotipo de las MSCs

Se analizó la **expresión de los marcadores** determinados por la ISCT [6] en todos los tipos de MSCs (pase 7-8, n = 5) con el citómetro de flujo Cytek Aurora CS. Se prepararon las muestras siguiendo el kit de caracterización de MSCs “Human MSC Analysis Kit” (BD Biosciences), y se analizó el porcentaje de expresión de cada marcador utilizando el software FlowJo.

Se realizaron 3 ensayos de **diferenciación** siguiendo el kit “Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification” (R&D Systems). Tras ello, las MSCs (pase 7) se permeabilizaron, bloquearon e incubaron con 10 µg/ml de los anticuerpos primarios: anti-agrecano (condrocitos), anti-osteocalcina (osteocitos) y FABP4 (adipocitos). Se incubaron con el anticuerpo secundario “Alexa Fluor 488 (IgG donkey anti-mouse o anti-goat”, y se observaron en el microscopio Leica CTR6000.

3.3. Ensayo de migración

Se analizó la migración de MSCs (pase 6-7, n = 3) hacia epitelio corneal en un modelo de inflamación *in vitro*. Se sembraron 25.000 células/cm² de la línea de epitelio corneal humano (HCEs). Cuando alcanzaron confluencia, se retiró el FBS del medio y tras 24h, se renovó con otro con 25 ng/ml de TNF-α durante 2h. Se sembraron 40.000 células/cm² de las distintas MSCs en Transwells de 0,8 µm de tamaño de poro sobre las HCEs. Tras 18h, las MSCs se fijaron, se marcaron con Hoechst (Invitrogen) y se visualizaron en el microscopio Leica CTR6000. En MatLab se desarrolló un programa para la cuantificación semi automática de las células que migraron por campo.

3.4. Ensayo de cierre de herida

Se analizó el cierre de herida *in vitro* de epitelio corneal. Se simuló la herida sembrando 25.000 HCEs/cm² a ambos lados de insertos Culture-Insert 2-well 24 (Ibidi) y se incubaron hasta confluencia. Se retiró el FBS del medio de cultivo, se sembraron los Transwells de 0,4 µm de tamaño de poro con las distintas MSCs (pase 7-8) y tras 24h se renovó el medio de las HCEs añadiendo 25 ng/ml de TNF-α durante 2h. Tras 2h, se retiraron los insertos, se colocaron los Transwells con las MSCs y se tomaron imágenes cada 2h con un microscopio Nikon Eclipse TS100. Para cuantificar el porcentaje de cierre, se utilizaron la inteligencia artificial SAM (Meta) e ImageJ.

3.5. Análisis de proteínas en los sobrenadantes

Se cultivaron HCEs en pocillos hasta confluencia. Se sincronizaron y se sembraron las MSCs en Transwells de

0,4 µm de tamaño de poro. Tras 24h, se prepararon los co-cultivos, se indujo la inflamación con TNF-α (25 ng/ml), se incubaron durante 24h y se recogieron los sobrenadantes para analizar la secreción de IL-6, MCP-1, RANTES y VEGF-A con el kit “MILLIPLEX® Human Cytokine / Chemokine / Growth Factor Panel A” (Merck) mediante xPONENT - xMAGPIX (Luminex Corporation). La concentración proteica (pg/ml) se determinó con los softwares Bead View y Belysa.

3.6. Análisis estadístico

Para los ensayos de migración, cierre de herida y Luminex, se realizaron tests ANOVA representando la media de cada condición ± el error estándar de la media. Se estableció *: p ≤ 0,05; **: p ≤ 0,01 y ***: p ≤ 0,001.

4. Resultados

4.1. Análisis del inmunofenotipo de las MSCs

Las MSCs expresaron los marcadores exigidos por la ISTC [6] (*Figura 1*) y se diferenciaron a adipocitos, osteocitos y condrocitos (*Figura 2*) manteniendo de forma la sobreexpresión de CXCR4 y TSG-6, observada gracias a la expresión de mCherry.

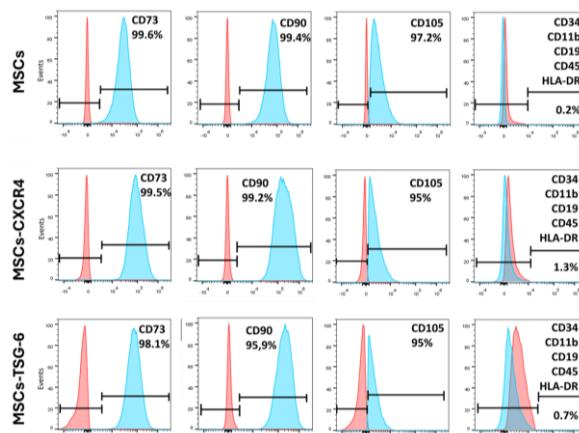


Figura 1: Expresión de marcadores mediante citometría de flujo para MSCs (arriba), MSC-CXCR4 (medio) y MSC-TSG-6 (abajo). Rojo: controles de isotipo; azul: muestras.

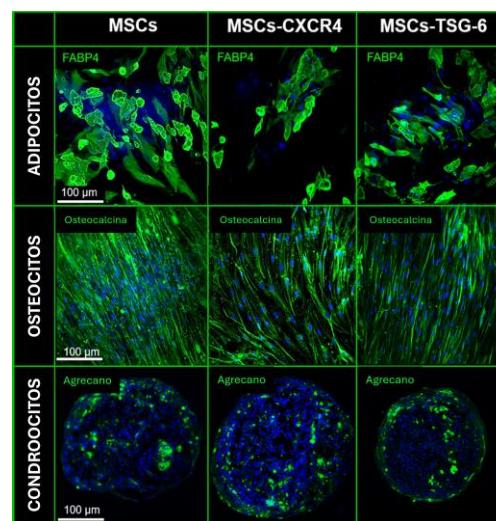


Figura 2: Estudio de diferenciación: imágenes representativas de inmunofluorescencia para detectar FAB4, osteocalcina y agrecano en MSCs, MSCs-CXCR4 y MSCs-TSG6.

4.2. Migración celular

En **condiciones estándar**, la migración de las MSCs modificadas fue significativamente mayor que la de las MSCs control. En **condiciones inflamatorias**, las MSCs-TSG-6 mostraron una migración significativamente mayor que el resto de MSCs. Comparando cada tipo celular, únicamente aumentó significativamente la migración de las MSC-TSG-6 al inducir la inflamación con TNF- α respecto a condiciones estándar (*Figura 3*).

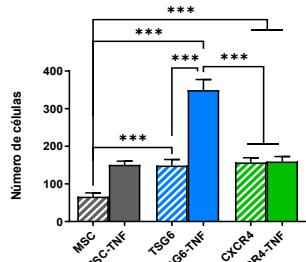


Figura 3: Comparación de la migración de MSCs, MSC-TSG-6 (TSG6) y MSC-CXCR4 (CXCR4) en condiciones normales (barras rayadas) y con TNF- α (barras coloreadas) (media ± sd).

4.3. Capacidad regenerativa

En **condiciones estándar** (*Figura 4A*), el tratamiento con MSCs-TSG-6 mejoró significativamente el cierre de herida epitelial respecto a la herida sin tratamiento. En **condiciones de inflamación** (*Figura 4B*), todas las MSCs mejoraron el cierre de herida, observándose un efecto mayor en las MSC-TSG-6.

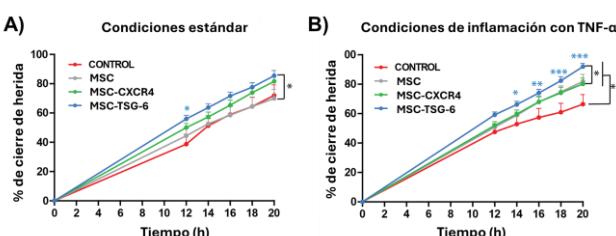


Figura 4: Porcentaje de cierre de herida de las HCEs sin tratamiento (rojo); o tratado con MSCs (gris), MSCs-TSG-6 (azul) o MSCs-CXCR4 (verde) a lo largo del tiempo en condiciones A) estándar, B) inflamatorias con TNF- α .

4.4. Análisis de proteínas en los sobrenadantes

La secreción de IL-6 aumentó significativamente en los co-cultivos con TNF- α . Tanto en condiciones estándar como inflamatorias, la secreción de IL-6 en MSCs fue significativamente menor que en HCEs. La secreción de IL-6 aumentó significativamente en MSCs-TSG-6 co-cultivadas respecto a MSCs, y con MSCs-CXCR4 respecto a ambas (*Figura 5A*). Tras añadir TNF- α , la MCP-1 aumentó significativamente con MSCs respecto a las HCEs. La mínima secreción se obtuvo con MSCs-TSG-6, aunque sin diferencias significativas entre MSCs (*Figura 5B*). RANTES aumentó significativamente en todos los cultivos al añadir TNF- α . El co-cultivo con MSCs-CXCR4 tuvo la mayor secreción, superando significativamente la de las HCEs (*Figura 5C*). VEGF-A aumentó significativamente tras la inflamación, observándose un aumento significativo en el co-cultivo con MSCs-CXCR4 respecto a las HCEs (*Figura 5D*).

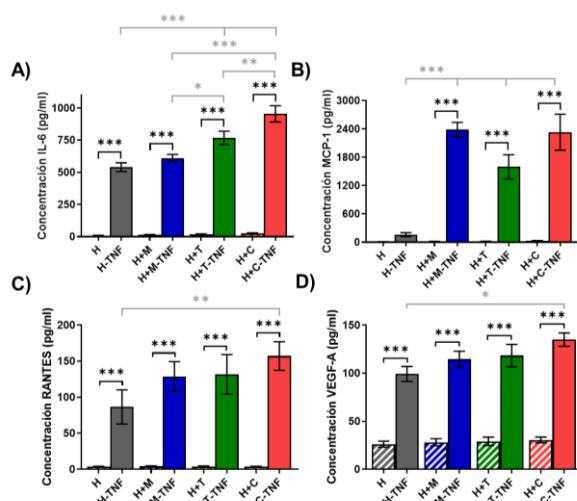


Figura 5: Resultados en pg/ml de A) IL-6, B) MCP-1 C) RANTES, D) VEGF-A secretada por HCE (gris), o co-cultivadas (H+) con MSCs (M, azul), MSCs-TSG-6 (T, verde) y MSCs-CXCR4 (C, rosa) en condiciones estándar (barras rayadas) e inflamatorias (TNF, coloreadas). Media ± SEM. Diferencias significativas: *: $p\leq 0,05$, **: $p\leq 0,01$ y ***: $p\leq 0,001$, entre mismo cultivo (negro) o entre distintos cultivos (gris).

5. Discusión

Las MSCs se plantean como un potencial tratamiento en la LSCD debido a sus propiedades antiinflamatorias y regenerativas. Recientemente se ha probado la aplicación de sus secretomas, evitando la diferenciación y proliferación descontrolada del trasplante celular [5]. Dicho secretoma presenta proteínas moduladoras de la capacidad migratoria y regenerativa de las MSCs [8, 9]. Tras la modificación genética, las células mantuvieron el **inmunofenotipo** de MSCs, su capacidad de **adherencia** al plástico *in vitro* y su capacidad de **diferenciación** a adipocitos, osteocitos y condrocitos; cumpliendo, por tanto, los criterios establecidos por la ISCT [6].

En los ensayos de **migración**, la bibliografía indica que la expresión de **CXCR4** debería potenciar esta capacidad [9], efecto que sólo se observó en condiciones estándar. Tras la estimulación con TNF- α , la ausencia de diferencias en la capacidad migratoria podría explicarse por una mayor expresión endógena de CXCR4 en las MSCs, o a que las MSCs-CXCR4, tras la modificación genética, ya hubieran alcanzado la máxima expresión del receptor, sin que ello se tradujera en un efecto adicional bajo condiciones inflamatorias. Este efecto podría deberse también a la ausencia en el secretoma de SDF-1, principal ligando de interacción con CXCR4 [9]. Las **MSCs-TSG-6** mostraron la mayor capacidad de migración, probablemente por su relación con factores inflamatorios [8]. Este efecto podría estar relacionado con la secreción de **RANTES**, que promueve la expresión de moléculas proinflamatorias en epitelio dañado [11]. Esta molécula se secretó en las HCEs tras la estimulación con TNF- α , lo que pudo mejorar la migración de las MSCs hacia dichas células [11]. De hecho, es posible que la sobreexpresión de CXCR4 en las MSCs pudiesen mejorar su migración de manera independiente de RANTES, lo que podría explicar la mayor concentración de esta molécula en los sobrenadantes en comparación con el resto de MSCs.

El estudio final fue el de **cierre de herida epitelial corneal**. Diversos estudios han demostrado la regeneración sin cicatrices mediada por exosomas de células que sobreexpresan **TSG-6** [8], como las utilizadas en este trabajo. Por otro lado, la sobreexpresión de **CXCR4** no afectó a la regeneración, lo que puede deberse a la ausencia de expresión de CXCL12 en HCEs con pase elevado [12]. Por tanto, cabría esperar que el cierre de herida se acelerara en presencia de MSCs que secretan niveles elevados de la citoquina prorregenerativa **IL-6** [7]. No obstante, este factor podría no haber sido el principal causante del efecto, dado que los valores máximos de IL-6 no se detectaron en las MSCs-TSG-6 que, sin embargo, fueron las que mostraron mayor efecto regenerativo. **MCP-1**, una proteína proinflamatoria secretada por MSCs tras añadir TNF- α , también pudo influir en los resultados, dado que las MSCs-TSG-6 atenuaron su secreción hasta niveles prorregenerativos [5, 8]. Además, el **VEGF-A** pudo favorecer el cierre de herida al ser un agente que estimula la síntesis proteica. De hecho, la sobreexpresión de CXCR4 favorece el cierre de heridas debido a la secreción de VEGF-A, tal y como se observó en el presente trabajo [9]. Sin embargo, el mayor efecto en la regeneración de la herida de epitelio corneal se observó en los tratamientos con las MSCs-TSG-6, por lo que dicho efecto pudo deberse a la propia expresión de TSG-6, o a moléculas secretadas no analizadas en este trabajo.

6. Conclusiones y líneas futuras

- Es posible sobreexpresar CXCR4 y TSG-6 en MSCs mediante modificación genética, manteniendo el fenotipo establecido por la ISTC.
- En el modelo de inflamación corneal, la migración de las MSCs-TSG-6, en parte mediada por RANTES, aumentó en comparación con las MSCs control, a diferencia de la migración de las MSC-CXCR4, que aumentó únicamente en condiciones estándar.
- La capacidad regenerativa de las MSCs-TSG-6 mediada por IL-6, MCP-1 y VEGF-A mejora la regeneración epitelial corneal en presencia de TNF- α .
- Las MSCs modificadas para sobreexpresar CXCR4 o TSG-6 presentan un potencial terapéutico que, de forma conjunta, podrían mejorar la migración hacia epitelio corneal dañado para mediar en los procesos inflamatorios y regenerativos.

En conjunto, los resultados obtenidos sientan las bases para futuros ensayos *in vitro* con los que poder explicar los procesos biológicos subyacentes. En fases posteriores, estos hallazgos deberán corroborarse *ex vivo* e *in vivo*, para confirmar su relevancia y poder trasladarlos a la práctica clínica y mejorar el tratamiento de la LSCD.

Financiación

Este estudio ha sido subvencionado por la Junta de Castilla y León a través del proyecto "CLU-2023-1-04 Unidad de Excelencia del IOBA" de la Univ. de Valladolid y cofinanciado por FEDER. Los resultados son parte de las actuaciones "PID2021-125142OA-I00" y "PID2019-105525RB-100" financiadas por MICIU/AEI /10.13039/501100011033 y /10.13039/501100011033.

Referencias

- [1] T. Kittipibul, C.P. Dalin, A. Masoudi, J. Zheng, y cols., "Advances in the Diagnosis and Management of Limbal Stem Cell Deficiency." *Cornea* vol. 44, no. 4 pp. 405-411, Abril 2025, doi:10.1097/ICO.0000000000003775
- [2] H. H. Dao, T. H. Nguyen, D. H. Hoang, B. D. Vu y cols., "Manufacturing exosomes for wound healing: Comparative analysis of culture media," *PLoS One*, vol. 19, no. 11, e0313697, 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0313697.
- [3] D.-Q. Li y S. C. G. Tseng, "Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface," *J. Cell Physiol.*, vol. 163, no.1, pp.61-79, Abril 1995, doi: 10.1002/jcp.1041630108.
- [4] M. Calonge, T. Nieto-Miguel, A. de la Mata, S. Galindo y cols., "Goals and Challenges of Stem Cell-Based Therapy for Corneal Blindness Due to Limbal Deficiency." *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, pp. 1483. Septiembre 2021, doi:10.3390/pharmaceutics13091483
- [5] H. S. Ong, A. K. Riau, G. H. F. Yam, N. Z. B. M. Yusoff y cols., "Mesenchymal stem cell exosomes as immunomodulatory therapy for corneal scarring," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 8, 7456, Abril 2023, doi: 10.3390/ijms24087456.
- [6] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller y I. Slaper-Cortenbach y cols., "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, Agosto 2006, doi: 10.1080/14653240600855905.
- [7] B. Burja, A. Barlič, A. Erman, K. Mrak-Poljšak, y cols., "Human mesenchymal stromal cells from different tissues exhibit unique responses to different inflammatory stimuli," *Curr. Res. Transl. Med.*, vol. 68, no. 4, pp. 217–224, Agosto 2020, doi: 10.1016/j.retram.2020.05.006.
- [8] J. Y. Oh, G. W. Roddy, H. Choi, R. H. Lee y cols., "Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, no. 39, pp. 16875-16880, Agosto 2010, doi: 10.1073/pnas.1012451107.
- [9] L. A. Marquez-Curtis y A. Janowska-Wieczorek, "Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis," *Biomed. Res. Int.*, p. 561098, Diciembre 2013, doi: 10.1155/2013/561098
- [10] L. H. Pham, N. B. Vu y P. Van Pham, "The subpopulation of CD105 negative mesenchymal stem cells show strong immunomodulation capacity compared to CD105 positive mesenchymal stem cells," *Biomed Res. Ther.*, vol. 6, no. 4, pp. 3131–3140, Abril 2019, doi: 10.15419/bmrat.v6i4.538.
- [11] F. Yuan, R. Zhang, J. Li, Q. Lei y cols., "CCR5-overexpressing mesenchymal stem cells protect against experimental autoimmune uveitis: insights from single-cell transcriptome analysis," *J. Neuroinflammation*, vol. 21, no. 1, Mayo 2024, doi: 10.1186/s12974-024-03134-3.
- [12] C. Hu, X. Yong, C. Li, M. Lü y cols., "CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair," *J. Surg. Res.*, vol. 183, no. 1, pp. 427–434, 2013, doi: 10.1016/j.jss.2013.01.019