Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Área de Conocimiento de Oftalmología

Tesis Doctoral

Plasma Rico en Factores de Crecimiento. Desarrollo y Estandarización de su Aplicación por Vía Oftálmica

Ana Cristina Riestra Ayora

Oviedo, junio de 2016

Trabajo de investigación realizado por Dña. Ana Cristina Riestra Ayora bajo la dirección del Dr. D. Jesús Merayo Lloves, para optar al grado de doctor por la Universidad de Oviedo dentro del programa de doctorado en "Investigación en cirugía y especialidades médico-quirúrgicas".

Instituto Universitario Fernández-Vega

Universidad de Oviedo

Programa de Doctorado en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

Área de Conocimiento de Oftalmología

Tesis Doctoral

Plasma Rico en Factores de Crecimiento. Desarrollo y Estandarización de su Aplicación por Vía Oftálmica

Ana Cristina Riestra Ayora

Oviedo, junio de 2016

Trabajo de investigación realizado por Dña. Ana Cristina Riestra Ayora bajo la dirección del Dr. D. Jesús Merayo Lloves, para optar al grado de doctor por la Universidad de Oviedo dentro del programa de doctorado en "Investigación en cirugía y especialidades médico-quirúrgicas".

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. Desarrollo y Estandarización de su Aplicación por Vía Oftálmica	Inglés: Plasma Rich in Growth Factors. Development and Standardization of the Ophthalmic Application.
2.- Autor	
Nombre: Ana Cristina Riestra Ayora	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Investigación en cirugía y especialidades médico-quirúrgicas.	
Órgano responsable: Dpto. de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas.	

RESUMEN (en español)

En el presente trabajo de investigación se aborda el problema no resuelto de los pacientes oftalmológicos que necesitan regenerar tejidos oculares. El abordaje médico de este problema se ha intentado desde hace años con derivados hemáticos, como el suero autólogo, por su composición similar a la de la lágrima. Más recientemente, se ha vivido un auge en la aplicación de derivados plaquetarios, conocidos como plasmas ricos en plaquetas (PRP), en diversas áreas de la medicina, entre ellas la oftalmología, debido al papel de las plaquetas en la reparación y regeneración tisular. Las plaquetas constituyen un importante reservorio de factores de crecimiento claves en la cicatrización tisular. Muchas citoquinas presentes en el plasma y las plaquetas han sido identificadas como esenciales para el mantenimiento de la superficie ocular y por ello resulta atractivo su empleo en oftalmología. Diversos estudios clínicos muestran su potencial efectividad en el tratamiento de patologías de la superficie ocular. Sin embargo, existe una falta de estandarización y adecuación de las preparaciones de PRP para su aplicación ocular, en el presente trabajo se utiliza un PRP estandarizado, el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). El PRGF es un PRP en el que se induce la degranulación plaquetaria por adición de cloruro cálcico. El PRGF ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* aumentar la proliferación y migración de células epiteliales y la velocidad de cierre de heridas corneales. El grupo de investigación ha optimizado el procedimiento de obtención y acondicionamiento del PRGF para su aplicación ocular, obteniendo como consecuencia un sistema cerrado con marcado CE que cumple con todos los requerimientos galénicos y regulatorios para su administración por vía oftálmica.

En el presente trabajo se ha estudiado la composición del colirio de PRGF, así como su estabilidad a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación. Por otro lado se ha caracterizado el efecto biológico del PRGF sobre cultivos celulares de fibroblastos oculares y sobre su diferenciación a miofibroblastos, mecanismo fisiopatológico causante de opacidad o *haze* corneal. Por último se ha evaluado la aplicación del PRGF a la expansión *ex vivo* de células madre epiteliales limbares, como suplemento del medio de cultivo celular y como matriz o *scaffold* para su cultivo y trasplante.

Los resultados del presente trabajo muestran que en el colirio de PRGF se logra una concentración plaquetaria que produce un aumento de los niveles de los principales de factores de crecimiento. Su conservación durante 6 meses congelado y posteriormente durante 72 horas refrigerado o a temperatura ambiente no reduce la concentración de estos factores de crecimiento ni su efecto biológico sobre la proliferación de células corneales. Además, el presente trabajo realiza aportaciones originales sobre el papel del PRGF en el aumento de la proliferación y migración de fibroblastos corneales y conjuntivales y previene y revierte la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo que posee importantes implicaciones en el manejo de diferentes patologías que tienen en común la fibrosis o cambio del tejido normal a procesos cicatrizantes que comprometen la función, como fibrosis subepiteliales, opacidades corneales, o presencia tejido cicatricial en zonas como la malla trabecular o en la retina.

Como aportación original en terapias avanzadas se ha constatado que la tecnología PRGF permite un abordaje totalmente autólogo aumentando su seguridad y eficiencia; en aplicaciones como:Suplemento del medio de cultivo celular aumentando la proliferación y la capacidad clonogénica de las células epiteliales limbares preservando un estado indiferenciado, fundamental para el éxito del trasplante.Andamiaje o matriz en ingeniería tisular, permitiendo la adhesión y proliferación de células epiteliales limbares manteniendo sus características fenotípicas y permitiendo el crecimiento e implantación celular. Por último la membrana de PRGF presenta

FOR-MAT-VOA-010-BIS

unas características mecánicas y manejabilidad adecuadas para su uso quirúrgico en el tratamiento de patologías de la superficie ocular. Con el presente trabajo de investigación se demuestra posible desarrollar e industrializar el Plasma Rico en Factores de Crecimiento para su aplicación oftálmica en medicina regenerativa y terapias avanzadas aplicadas a la superficie ocular y córnea.

RESUMEN (en Inglés)

In the current research work, it is tackled the non-resolved issue of the ophthalmological patients that need to regenerate ocular tissues. The medical approach to this problem has been tried, since years, with hematic derivatives, such as autologous serum, by it composition, similar to the tear. More recently, a boom has been lived in the application of platelet derivatives, known as plasma rich in platelets (PRP), in several areas of medicine, among them, the ophthalmology, due to the role of the platelets in the tissue reparation and regeneration. The platelets constitute and important reservoir of growth factors which are key to the tissue wound healing. Many cytokines present in the plasma and platelets have been identified as essential for the keeping of the ocular surface and hence it is attractive for it use in ophthalmology.

Several clinical studies show its potential effectiveness in the treatment of pathologies of the ocular surface like dry eye, epithelial defects or corneal ulcers. However, there is a lack of standardization and adequacy in the preparations of PRP for its ocular application, in the current work, standardized PRP is used: Plasma rich in Growth Factors (PRGF).

PRGF is a PRP that does not contain leukocytes, and in which platelet degranulation is induced by calcium chloride addition. PRGF has shown, in in vitro and in vivo studies, to increase the proliferation and migration of epithelial cells and the quickness in corneal wounds healing.

The research group has optimized the collection and conditioning of PRGF for it ocular application, obtaining as a consequence a closed system registered by the EC, which complies with all the galenic requirements and regulations for its ophthalmic administration.

In the current work, the composition of the PRGF eye drops has been studied, as well as it stability in different times under different conditions of conservation. On the other hand, it has characterized the biological effect of PRGF on cellular culture of ocular of fibroblasts and it differentiation to myofibroblast, physiopathological mechanism causing corneal haze. Lastly, it has been evaluated the application of PRGF to the ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells, as a supplement of the cell culture medium, and as a scaffold for its culture and transplant. The results of the present work show that in the PRFG eye drops, it is achieved a platelet concentration that produce an increase in the levels of the main growth factors implied in the corneal regeneration. Its conservation during 6 months, frozen, and subsequently during 72 hours refrigerated or at room temperature, does not reduce the concentration of these growth factors nor its biological effect on the proliferation of corneal cells.

Furthermore, the present work carries out original contributions on the role of PRGF in the increase of the proliferation and migration of corneal and conjunctival fibroblast and in the prevention and reversion of its differentiation to myofibroblasts, which posseses important implications in the handling of different pathologies that have in common the subepithelial fibrosis, the corneal opacities, or presence of scar tissue in areas like the trabecular meshwork or in the retina. As an original contribution in advance therapies, it has been determined that PRGF technology allows a totally autologous approach, augmenting its security and efficiency, in applications such as: Supplement of the cell culture medium, augmenting the proliferation and clonogenic capacity of the limbo epithelial cells, preserving an indifferenced status, key to the success of the transplant. Scaffold or matrix in tissue engineering, allowing the adhesion and proliferation of limbo epithelial cells, keeping its phenotypic characteristics and allowing the cell growth and implantation. Finally, and as a practical application in ophthalmic surgery, the PRGF membrane presents some mechanical characteristics and adequate manageability for its surgery use in the treatment of ocular surface pathologies, until now treated with amniotic membrane implantation. With the current research work, it is proved possible to develop and industrialize the plasma rich in growth factors for its ophthalmic application in regenerative medicine and advanced therapies applied to the ocular surface and the cornea.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO-QUIRÚRGICAS.

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT 6
MOTIVACIÓN, ESTRUCTURACIÓN Y RESUMEN EJECUTIVO 10
INTRODUCCIÓN 13
1. Superficie ocular. 13
2. Anatomía corneal. 13
3. Anatomía conjuntival. 14
4. Limbo esclerocorneal. 16
5. Fisiología de la regeneración corneal. 17
6. Opacificación corneal por fibrosis 18
7. Insuficiencia límbica. 19
8. Derivados hemáticos en oftalmología. 25
9. Plasma Rico en Factores de Crecimiento. 31
JUSTIFICACIÓN 34
HIPÓTESIS 36
OBJETIVOS 37
MATERIAL Y MÉTODO 38
1. Desarrollo de las formulaciones oftálmicas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y de los kits necesarios para su elaboración estandarizada. 38
1.1. Preparación del colirio de PRGF. 38
1.2. Preparación de la membrana de PRGF. 39
2. Caracterización de la composición del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y su estabilidad biológica a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación. 40
2.1. Preparación de PRGF. 40
2.2. Condiciones de conservación. 40
2.3. Contaje de plaquetas y leucocitos. 40
2.4. Determinación de la concentración de factores de crecimiento. 40
2.5. Células y métodos de cultivo. 40
2.6. Ensayo de proliferación celular. 41
2.7. Ensayo de esterilidad. 41
2.8. Análisis estadístico. 41
3. Determinación del efecto biológico del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la proliferación, migración y diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos oculares. 42

3.1. Preparación de PRGF y suero autólogo. 42
3.2. Determinación de la composición. 42
3.3. Células y métodos de cultivo. 42
3.4. Caracterización celular. 42
3.5. Ensayo de proliferación celular. 43
3.6. Ensayo de migración celular. 43
3.7. Ensayo de diferenciación a miofibroblastos. 44
3.8. Análisis estadístico. 45
4. Caracterización de la membrana de Plasma Rico en Factores de Crecimiento. 46
4.1. Preparación de la membrana de PRGF. 46
4.3. Apariencia macroscópica y manejabilidad. 46
4.4. Caracterización mecánica. 46
4.5. Ultraestructura. 47
5. Evaluación la aplicabilidad del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en terapias avanzadas mediante el desarrollo de un método de cultivo de células madre epiteliales limbares totalmente autólogo. 48
5.1. PRGF como suplemento del medio de cultivo celular. 48
5.1.1. Preparación de PRGF líquido. 48
5.1.2. Células y método de cultivo. 48
5.1.3. Proliferación celular. 49
5.1.4. Caracterización celular. 49
3.2. Membrana de PRGF como matriz para el cultivo y trasplante de células madre epiteliales limbares. 50
5.1.5. Preparación de la membrana de PRGF. 50
5.1.6. Cultivo celular sobre las membranas. 51
5.1.7. Expresión de marcadores. 51
5.2. Análisis estadístico. 51
RESULTADOS 52
1. Desarrollo de las formulaciones oftálmicas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y de los kits necesarios para su elaboración estandarizada. 52
2. Caracterización de la composición del Plasma Rico en Factores de Crecimiento y su estabilidad biológica a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación. 54
2.1. Análisis de la composición. 54

2.2. Efecto sobre la proliferación celular. 55
2.3. Ensayo de esterilidad. 56
3. Determinación de efecto biológico del Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la proliferación, migración y diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos oculares. 57
3.1. Composición del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento. 57
3.2. Efecto del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre cultivos celulares de fibroblastos. 57
3.2.1. Caracterización celular. 57
3.2.2. Proliferación celular. 57
3.2.3. Migración celular. 58
3.2.4. Diferenciación a miofibroblastos. 60
4. Caracterización de la membrana de Plasma Rico en Factores de Crecimiento. 67
4.1. Apariencia y manejabilidad 67
4.2. Caracterización mecánica. 67
4.3. Ultraestructura. 70
5. Evaluación la aplicabilidad del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en terapias avanzadas mediante el desarrollo de un método de cultivo de células madre epiteliales limbares totalmente autólogo. 72
5.1. PRGF como suplemento del medio de cultivo celular. 72
5.1.1. Proliferación celular. 72
5.1.2. Caracterización celular. 74
5.2. Membrana de PRGF como matriz para el cultivo y trasplante de células madre epiteliales limbares. 78
DISCUSIÓN 79
CONCLUSIONES 87
BIBLIOGAFÍA 88
ÍNDICE DE ABREVIATURAS 98
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS 101
GLOSARIO 104
CRÉDITOS 106

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se aborda el problema no resuelto de los pacientes oftalmológicos que necesitan regenerar tejidos oculares y trata de contestar a la pregunta de investigación ¿es posible regenerar la superficie ocular? El abordaje médico de este problema se ha intentado desde hace años con derivados hemáticos, como el suero autólogo, por su composición similar a la de la lágrima. Más recientemente, se ha vivido un auge en la aplicación de derivados plaquetarios, conocidos como plasmas ricos en plaquetas (PRP), en diversas áreas de la medicina, entre ellas la oftalmología, debido al papel de las plaquetas en la reparación y regeneración tisular. Las plaquetas constituyen un importante reservorio de factores de crecimiento claves en la cicatrización tisular. Muchas citoquinas presentes en el plasma y las plaquetas han sido identificadas como esenciales para el mantenimiento de la superficie ocular y por ello resulta atractivo su empleo en oftalmología.

Diversos estudios clínicos muestran su potencial efectividad en el tratamiento de patologías de la superficie ocular como ojo seco, defectos epiteliales o úlceras corneales. Sin embargo, existe una falta de estandarización y adecuación de las preparaciones de PRP para su aplicación ocular, en el presente trabajo se utiliza un PRP estandarizado, el Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF).

El PRGF es un PRP que no contiene leucocitos, en el que se induce la degranulación plaquetaria por adición de cloruro cálcico. El PRGF ha demostrado en estudios *in vitro* e *in vivo* aumentar la proliferación y migración de células epiteliales y la velocidad de cierre de heridas corneales.

El grupo de investigación ha optimizado el procedimiento de obtención y acondicionamiento del PRGF para su aplicación ocular, obteniendo como consecuencia un sistema cerrado con marcado CE que cumple con todos los requerimientos galénicos y regulatorios para su administración por vía oftálmica.

En el presente trabajo se ha estudiado la composición del colirio de PRGF, así como su estabilidad a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación. Por otro lado se ha caracterizado el efecto biológico del PRGF sobre cultivos celulares de fibroblastos oculares y sobre su diferenciación a miofibroblastos, mecanismo fisiopatológico causante de opacidad o *haze* corneal. Por último se ha evaluado la aplicación del PRGF a la expansión *ex vivo* de células madre epiteliales limbares, como suplemento del medio de cultivo celular y como matriz o *scaffold* para su cultivo y trasplante.

Los resultados del presente trabajo muestran que en el colirio de PRGF se logra una concentración plaquetaria que produce un aumento de los niveles de los principales de factores de crecimiento implicados en la regeneración corneal. Su conservación durante 6 meses congelado y posteriormente durante 72 horas

refrigerado o a temperatura ambiente no reduce la concentración de estos factores de crecimiento ni su efecto biológico sobre la proliferación de células corneales.

Además, el presente trabajo realiza aportaciones originales sobre el papel del PRGF en el aumento de la proliferación y migración de fibroblastos corneales y conjuntivales y previene y revierte la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos, lo que posee importantes implicaciones en el manejo de diferentes patologías (quemaduras, inflamación, traumatismos….) que tienen en común la fibrosis o cambio del tejido normal a procesos cicatrizantes que comprometen la función, como fibrosis subepiteliales, opacidades corneales, o presencia tejido cicatricial en zonas como la malla trabecular o en la retina.

Como aportación original en terapias avanzadas se ha constatado que la tecnología PRGF permite un abordaje totalmente autólogo aumentando su seguridad y eficiencia; en aplicaciones como:

Suplemento del medio de cultivo celular aumentando la proliferación y la capacidad clonogénica de las células epiteliales limbares preservando un estado indiferenciado, fundamental para el éxito del trasplante.

Andamiaje o matriz en ingeniería tisular, permitiendo la adhesión y proliferación de células epiteliales limbares manteniendo sus características fenotípicas y permitiendo el crecimiento e implantación celular.

Por último y como aplicación práctica en cirugía oftálmica la membrana de PRGF presenta unas características mecánicas y manejabilidad adecuadas para su uso quirúrgico en el tratamiento de patologías de la superficie ocular hasta ahora tratadas mediante implante de membrana amniótica.

Con el presente trabajo de investigación se demuestra posible desarrollar e industrializar el Plasma Rico en Factores de Crecimiento para su aplicación oftálmica en medicina regenerativa y terapias avanzadas aplicadas a la superficie ocular y córnea.

ABSTRACT

In the current research work, it is tackled the non-resolved issue of the ophthalmological patients that need to regenerate ocular tissues and it tries to answer the research question: Is it possible to regenerate the ocular surface? The medical approach to this problem has been tried, since years, with hematic derivatives, such as autologous serum, by it composition, similar to the tear. More recently, a boom has been lived in the application of platelet derivatives, known as plasma rich in platelets (PRP), in several areas of medicine, among them, the ophthalmology, due to the role of the platelets in the tissue reparation and regeneration. The platelets constitute and important reservoir of growth factors which are key to the tissue wound healing. Many cytokines present in the plasma and platelets have been identified as essential for the keeping of the ocular surface and hence it is attractive for it use in ophthalmology.

Several clinical studies show its potential effectiveness in the treatment of pathologies of the ocular surface like dry eye, epithelial defects or corneal ulcers. However, there is a lack of standardization and adequacy in the preparations of PRP for its ocular application, in the current work, standardized PRP is used: Plasma rich in Growth Factors (PRGF)

PRGF is a PRP that does not contain leukocytes, and in which platelet degranulation is induced by calcium chloride addition. PRGF has shown, in in vitro and in vivo studies, to increase the proliferation and migration of epithelial cells and the quickness in corneal wounds healing

The research group has optimized the collection and conditioning of PRGF for it ocular application, obtaining as a consequence a closed system registered by the EC, which complies with all the galenic requirements and regulations for its ophthalmic administration.

In the current work, the composition of the PRGF eye drops has been studied, as well as it stability in different times under different conditions of conservation. On the other hand, it has characterized the biological effect of PRGF on cellular culture of ocular of fibroblasts and it differentiation to myofibroblast, physiopathological mechanism causing corneal haze. Lastly, it has been evaluated the application of PRGF to the ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells, as a supplement of the cell culture medium, and as a scaffold for its culture and transplant.

The results of the present work show that in the PRFG eye drops, it is achieved a platelet concentration that produce an increase in the levels of the main growth factors implied in the corneal regeneration. Its conservation during 6 months, frozen, and subsequently during 72 hours refrigerated or at room temperature, does not reduce the concentration of these growth factors nor its biological effect on the proliferation of corneal cells.

Furthermore, the present work carries out original contributions on the role of PRGF in the increase of the proliferation and migration of corneal and conjunctival fibroblast and in the prevention and reversion of its differentiation to myofibroblasts, which posseses important implications in the handling of different pathologies (burns, inflammations, traumatisms…) that have in common the subepithelial fibrosis, the corneal opacities, or presence of scar tissue in areas like the trabecular meshwork or in the retina.

As an original contribution in advance therapies, it has been determined that PRGF technology allows a totally autologous approach, augmenting its security and efficiency, in applications such as:

Supplement of the cell culture medium, augmenting the proliferation and clonogenic capacity of the limbo epithelial cells, preserving an indifferenced status, key to the success of the transplant.

Scaffold or matrix in tissue engineering, allowing the adhesion and proliferation of limbo epithelial cells, keeping its phenotypic characteristics and allowing the cell growth and implantation.

Finally, and as a practical application in ophthalmic surgery, the PRGF membrane presents some mechanical characteristics and adequate manageability for its surgery use in the treatment of ocular surface pathologies, until now treated with amniotic membrane implantation.

With the current research work, it is proved possible to develop and industrialize the plasma rich in growth factors for its ophthalmic application in regenerative medicine and advanced therapies applied to the ocular surface and the cornea.

MOTIVACIÓN, ESTRUCTURACIÓN Y RESUMEN EJECUTIVO

La transparencia corneal es un factor crítico en el normal funcionamiento del sistema visual. El daño corneal secundario a cirugías o patologías desencadena un complejo sistema de cicatrización encaminado a proteger la córnea y restablecer su estructura y función. Sin embargo, este proceso en ocasiones resulta en pérdida de la transparencia corneal y disminución de la visión. La opacidad corneal es mediada por multitud de factores de crecimiento y otras citoquinas producidas por células epiteliales y estromales, glándulas lagrimales y nervios entre otros. La gravedad y persistencia de esta opacidad depende en gran medida de la presencia de miofibroblastos y la matriz extracelular desorganizada producida por estos en la córnea (1, 2). Uno de los principales retos en el tratamiento de las patologías de la córnea es lograr la regeneración de tejido corneal normal y evitar la fibrosis (3).

Otra entidad clínica causante de pérdida de la transparencia corneal es la insuficiencia límbica. En este caso se produce una disfunción en las células madre epiteliales situadas en el limbo esclerocorneal. Como consecuencia el epitelio corneal es sustituido por epitelio conjuntival comprometiendo la trasparencia de la córnea (4).

Las alternativas terapéuticas convencionales para el restablecimiento de la superficie ocular incluyen lágrimas artificiales, oclusión de puntos lagrimales, lentes de contacto terapéuticas y el manejo de la patología de los anejos oculares. Entre las opciones farmacológicas cabe destacar el uso de ciclosporina tópica, que ha mostrado efectos beneficiosos sobre el epitelio corneal como consecuencia de su acción antiinflamatoria, (5) y más recientemente los denominados agentes regenerativos análogos de glicosaminoglicanos, que mimetizan el heparán sulfato restableciendo la arquitectura de la matriz extracelular (6). Dentro de los abordajes quirúrgicos se incluyen las queratoplastias y el trasplante de membrana amniótica por sus efectos sobre la inflamación y epitelización (7).

En el tratamiento de la insuficiencia límbica la terapia celular es cada vez más utilizada. En concreto, la expansión *ex vivo* de células madre epiteliales autólogas posee una serie de ventajas sobre otras modalidades de trasplante de limbo. La terapia celular se encuadra dentro de las denominadas terapias avanzadas, teniendo la consideración de medicamentos a efectos regulatorios. De hecho, el primer medicamento con células madre aprobado en Europa está indicado para el tratamiento de la insuficiencia límbica (8). Pese a las recomendaciones de las agencias reguladoras de evitar el uso de productos de origen animal en la

producción de estas terapias, muchos tratamientos basados en células incluyen sustancias xenogénicas poco adecuadas para el uso clínico (9-11).

El uso de derivados hemáticos en oftalmología surge de la necesidad de un sustituto lagrimal que, además de proporcionar hidratación, aporte otra serie de componentes esenciales para el mantenimiento y regeneración de la superficie ocular. Tradicionalmente se ha utilizado el suero autólogo por su capacidad de lubricación y su composición, similar a la de la lágrima (12). Sin embargo, en los últimos años se ha evolucionado a la aplicación de derivados plaquetarios en diversas áreas de la medicina, como la cirugía oro-facial o la cirugía ortopédica, por su papel sobre la reparación y la regeneración tisular (13).

Las plaquetas constituyen un importante reservorio de factores de crecimiento y otras proteínas, principalmente almacenados en los gránulos-α de su citoplasma (14). Muchos de estos factores de crecimiento han sido identificados como esenciales en el mantenimiento de la superficie ocular (15). Por ejemplo, el factor de crecimiento nervioso se encuentra en fases de investigación clínica para el tratamiento de úlceras neurotróficas, sin embargo su uso está limitado por los altos costes asociados a la producción de terapias biológicas (16).

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) es un plasma rico en plaquetas totalmente autólogo que es activado con cloruro cálcico, de forma que los factores de crecimiento y otras sustancias, que participan en la reparación y regeneración tisular, son secretadas por exocitosis de los gránulos-α plaquetarios al medio. Además, el PRGF no contiene leucocitos, ya que aumentan el nivel de determinadas citoquinas, incluyendo interleuquinas (IL-6, IL-1β) y el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), con efectos pro-inflamatorios (17).

El PRGF ha demostrado propiedades regenerativas en diversos estudios clínicos de distintas especialidades médicas (18). Además en estudios pre-clínicos el PRGF ha demostrado aumentar la proliferación y migración de células epiteliales corneales en modelos *in vivo* e *in vitro* (19, 20).

Recientemente el plasma autólogo, sus fracciones, componentes y derivados han recibido la consideración de medicamento por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Como consecuencia son exigibles una serie de garantías de calidad en estos productos.

En el año 2011 nuestro grupo de investigación comenzó un proyecto en colaboración con el Biotechnology Institute (BTI) de Vitoria para el desarrollo y estandarización de un protocolo para la aplicación oftálmica del PRGF, de acuerdo a los requisitos galénicos y normativos.

Fruto de esta colaboración ha surgido un kit cerrado para la obtención y aplicación oftálmica de PRGF, tanto en forma de colirio como de membrana, que cumple con todos los estándares de calidad exigidos para los medicamentos de uso humano tanto en Europa como en Estados Unidos.

El trabajo de investigación realizado se focaliza en el desarrollo para la aplicación oftálmica del PRGF desde los estudios básicos de sus componentes y estudios farmacológicos de estabilidad. Además como aplicación práctica se ha realizado el desarrollo de diferentes productos para aplicación oftálmica como son los tratamientos tópicos con colirio de PRGF, las aplicaciones quirúrgicas en forma de membrana y las aplicaciones en terapias avanzadas (ingeniería tisular).

El trabajo de investigación sigue el método científico pero para su mejor comprensión se ha dividido en 4 partes:

La primera presenta el estado actual del tema en las necesidades de regeneración de la superficie ocular y las generalidades sobre del PRGF y derivados hemáticos. En esta parte se plantean también la justificación, la hipótesis de trabajo y los objetivos.

En la segunda se caracteriza la composición del colirio de PRGF y su estabilidad referida a la concentración de distintos factores de crecimiento. Así mismo se establece el efecto biológico del colirio de PRGF sobre fibroblastos, tanto en su proliferación, migración como sobre su diferenciación a miofibroblastos.

En la tercera se caracteriza la membrana de PRGF; su mecánica, manejabilidad y ultraestructura.

Por último se valora la aplicabilidad de la tecnología PRGF al desarrollo de un método de cultivo y trasplante de células epiteliales corneales para el tratamiento del déficit limbar. Eliminando de esta forma todos los compuestos de origen alogénico o xenogénico, poco adecuados para un medicamento de terapias avanzadas.

INTRODUCCIÓN

1. Superficie ocular.

La superficie ocular es una unidad anatomofuncional constituida por elementos funcionales, como la inervación aferente y eferente y otros como película lagrimal, glándula lagrimal, párpados y tres epitelios estratificados no queratinizados: corneal, conjuntival y limbar. Sus funciones son refractivas y protectoras.

2. Anatomía corneal.

La córnea es un tejido altamente diferenciado que permite la refracción y trasmisión de la luz, siendo la lente más potente de todo el dióptrico ocular. Posee un espesor aproximado de 500µm. Tradicionalmente se han distinguido cinco capas que conforman la córnea: Epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio.

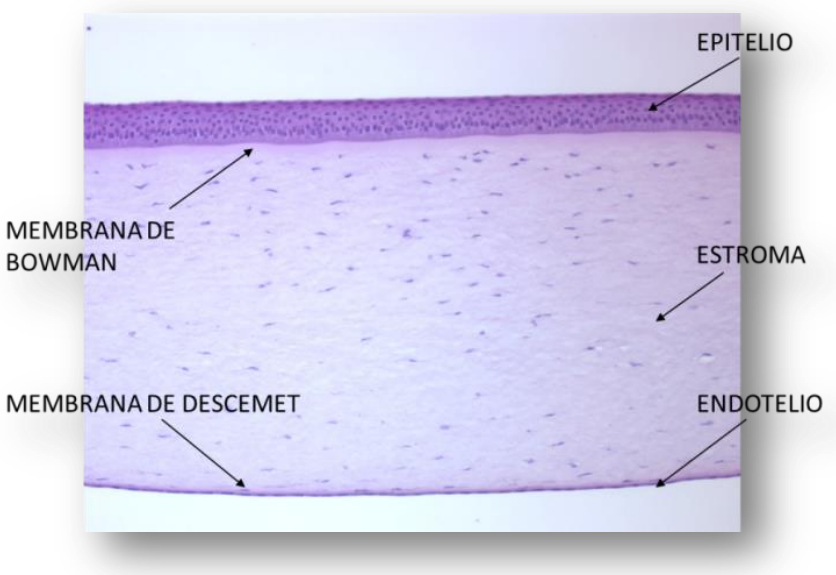

Figura 1. Corte transversal de la córnea dónde se aprecian sus distintas capas. Tinción hematoxilina-eosina, 40 aumentos.

El **epitelio corneal** es un epitelio escamoso poliestratificado no queratinizado con un espesor de 50-56µm. A nivel central está compuesto por 5-7 capas de células llegando a alcanzar 8-10 capas a nivel periférico.

Se pueden distinguir distintos tipos celulares agrupados por estratos; células escamosas planas o apicales, células intermedias o alares y células basales.

Las más superficiales conforman dos capas de células planas y forma poligonal. La superficie externa de estas células presenta pliegues y microvellosidades. Existen numerosas uniones estrechas a este nivel que conforman una barrera anatómica.

Las células intermedias se disponen en tres capas. Presentan una extensa interdigitación con numerosas uniones desmosómicas que les confieren un aspecto alado. Tienden a aplanarse conforme se acercan a la superficie siendo sus núcleos paralelos a esta.

Las células basales del epitelio corneal componen una única capa de células columnares con núcleos ovales prominentes dispuestos de forma perpendicular a la superficie. Las células basales se adhieren mediante hemidesmosomas a las fibrillas de anclaje de la membrana basal, compuestas por colágeno tipo IV, VII y laminina.

El citoesqueleto de las células epiteliales está constituido por citoqueratinas (CK). Las citoqueratinas propuestas como específicas del epitelio corneal son la CK3 y la CK12. Estas CK están presentes en el epitelio corneal y en las capas suprabasales del epitelio limbar (21) aunque existen datos contradictorios sobre la especificidad de la CK3 como marcador de células epiteliales corneales (22, 23).

La **capa de Bowman** es una membrana acelular de 8-10μm de espesor situada bajo el epitelio.

El **estroma** constituye el 90% del grosor de la córnea; mide en torno a 500-540μm en la zona central y 700μm en la periferia. Está formado por agua, un 78%, fibras de colágeno (98% tipo I y 2% tipo V), proteoglicanos y queratocitos. Las fibras de colágeno se distribuyen en láminas paralelas entre las que se sitúan los queratocitos, fibroblastos especializados que sintetizan el colágeno, y los proteoglicanos que forman la matriz. A nivel del estroma se pueden encontrar células del sistema inmune como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos que se ven aumentados en casos de inflamación.

La capa más interna está constituida por la **membrana de Descemet** y el **endotelio**; una monocapa de células hexagonales y aplanadas, responsables de mantener la hidratación óptima del estroma corneal y por tanto su trasparencia.

3. Anatomía conjuntival.

La **conjuntiva** es una membrana mucosa que reviste la cara posterior de los párpados y la parte anterior del globo ocular.

Se pueden diferenciar tres porciones: la conjuntiva bulbar, la conjuntiva que tapiza los fondos de saco y la conjuntiva tarsal. Histológicamente está compuesta por un epitelio y un tejido fibrovascular denominado sustancia propia o estroma.

El epitelio conjuntival está constituido por tres capas. La más interna es una monocapa de células cuboideas. La capa intermedia está compuesta por células columnares, presentes sólo en los fórnices y en el limbo. A medida que se aproximan a la superficie las células se aplanan, formando un epitelio no queratinizado. A nivel de la conjuntiva tarsal las células son cuboideas y más planas en el limbo, debido a la presión mecánica.

Las células caliciformes constituyen entre un 5-20% de las células epiteliales conjuntivales, poseen una morfología redondeada con un núcleo aplanado y mucina en su interior. La mucina tipo 5AC (MUC5AC) es específica de células caliciformes. Son más numerosas en la conjuntiva tarsal y bulbar.

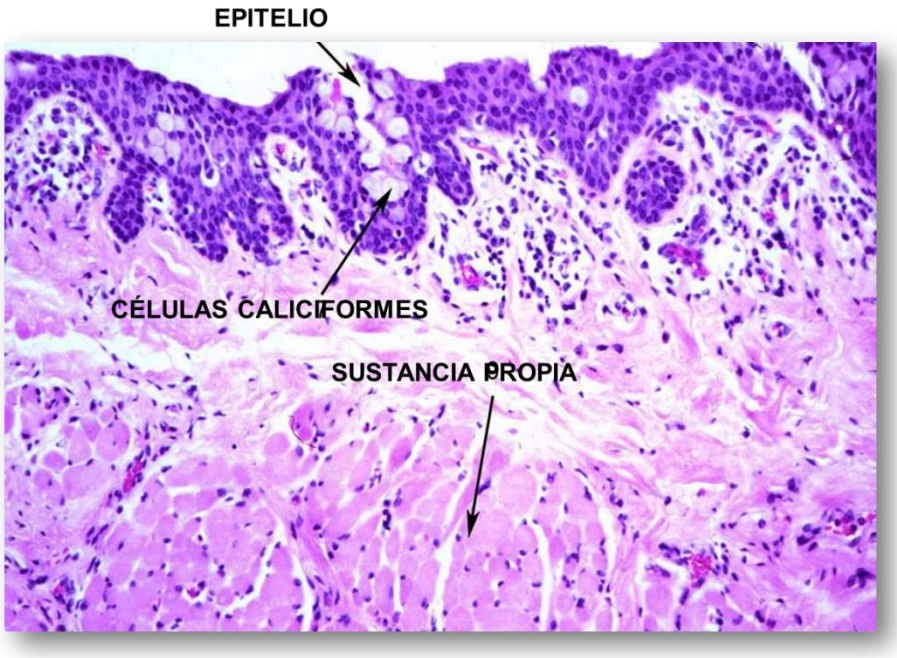

Figura 2. Corte histológico del fornix conjuntival en el que se distingue epitelio, células caliciformes y sustancia propia. Tinción hematoxilina-eosina, 400 aumentos.

Se consideran marcadores de epitelio conjuntival MUC1, MUC5AC y las citoqueratinas CK7, CK13 y CK19 (22, 23).

El estroma conjuntival consta de dos capas, la más superficial linfoide, y la más profunda, que es fibrosa. En la capa superficial hay presencia de linfocitos, la mayoría linfocitos T que interactúan con las células epiteliales a través de

citoquinas y factores de crecimiento. En condiciones normales estas células son escasas, aumentando en casos de inflamación.

4. Limbo esclerocorneal.

El término limbo denota el margen entre dos tipos de tejidos. El limbo esclerocorneal corresponde a la zona de transición, trasparente y altamente vascularizada e inervada, entre córnea, conjuntiva bulbar y esclerótica. El epitelio corneal aumenta de grosor en el limbo presentando alrededor de 12 capas de células. En su zona basal el epitelio presenta proyecciones en el estroma subyacente clínicamente visibles y conocidas como empalizadas de Vogt.

A nivel del limbo existen dos tipos de células madre: células madre limbares mesenquimales (LMSCs de sus siglas en inglés), localizadas en el estroma limbar (24) y células madre epiteliales limbares (LESC), situadas en las regiones basales del epitelio limbar que corresponden con las empalizadas de Vogt (25).

El papel de las LMSCs no es bien conocido, se cree que actúan regulando el nicho de las LESC (26).

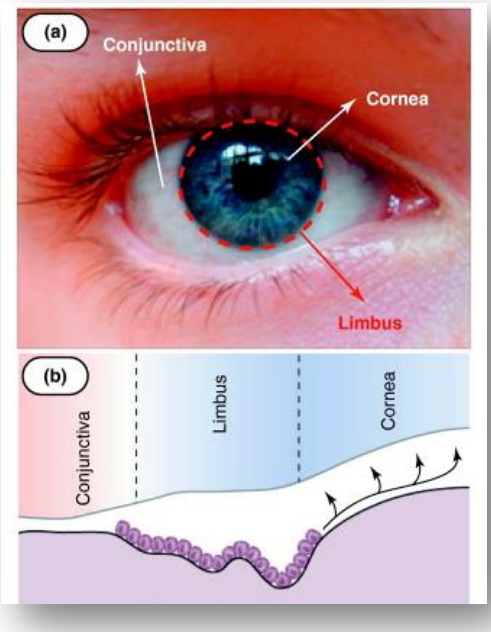

Figura 3. Localización del limbo esclerocorneal (a). Diagrama de la localización del limbo y de la migración de las células madre epiteliales limbares al epitelio corneal (b). Adaptado de (27).

Las LESC presentan un alto potencial proliferativo y carecen de marcadores de citoqueratina 3 y 12, siendo por tanto fenotípicamente indiferenciadas. De la

misma manera no presentan otros marcadores de diferenciación corneal como conexina 43 o involucrina.

El factor de transcripción p63 ha sido identificado como un marcador potencial de LESC (28, 29). Se expresa de forma consistente en las células basales de los epitelios estratificados y se considera un marcador potencial de células madre también en tejidos no oculares. En el epitelio corneal la expresión de la isoforma ΔNp63α se restringe a células con un alto potencial regenerativo situadas en la capa basal del limbo. Existen estudios recientes que relacionan el porcentaje de células limbares que tiñen intensamente en el injerto, conocidas como "*p63-bright*", con el éxito del trasplante (30).

Existen otros marcadores de células madre propuestos para la identificación de LESC como CK14 (34), CK15 (35) o N-cadherina (36).

El nicho limbar es la región que alberga las LESC proporcionándoles protección frente a agresiones externas y un ambiente idóneo para el mantenimiento de la homeostasis. Su ubicación protegida por los párpados y en interdigitaciones hacia el estroma confiere protección mecánica y la presencia de melanocitos protege a las células madre de la radiación ultravioleta. Además la vascularización e inervación del nicho limbar asegura el aporte de nutrientes y factores de crecimiento.

Se ha sugerido que las células madre limbares son mantenidas y controladas por factores extrínsecos e intrínsecos presentes en el nicho limbar. En el nicho se encuentran distintos factores de crecimiento y otras citoquinas implicadas en los mecanismos de control de las células limbares. Muchos de estos factores (KGF, NGF, bFGF, HGF, IGF1, TGF-β1, TGF-β2) se han identificado en la membrana amniótica humana (AM) además su membrana basal es similar a la del limbo. Todo ello contribuye a mantener el fenotipo indiferenciado de las LESC, lo que impulsa el uso de la AM como matriz para su cultivo *ex vivo*. El trasplante de AM también ha demostrado ser suficiente para restablecer el epitelio normal en casos de déficit limbar parcial, lo que indica que ayuda a expandir las LESC remanentes *in vivo* (37).

5. Fisiología de la regeneración corneal.

El mantenimiento del epitelio corneal depende de las LESC situadas en el epitelio basal del limbo esclerocorneal. Estas células se auto-renuevan y se diferencian a células amplificadoras transitorias, con capacidad proliferativa limitada. Las células amplificadoras transitorias constituyen la mayor población de células proliferativas en el epitelio corneo-limbar.

Según la teoría de Thoft, las LESC localizadas exclusivamente en el epitelio basal del limbo esclerocorneal proliferan lentamente y se diferencian a células amplificadoras transitorias desplazándose de forma horizontal y centrípeta (Y), las células amplificadoras se diferencian a células epiteliales basales, que proliferan y se desplazan verticalmente, (X), dando lugar a células alares. Estas últimas se diferencian a células superficiales (Z). Se estima que cada 7 días se produce un recambio de la superficie corneal (38).

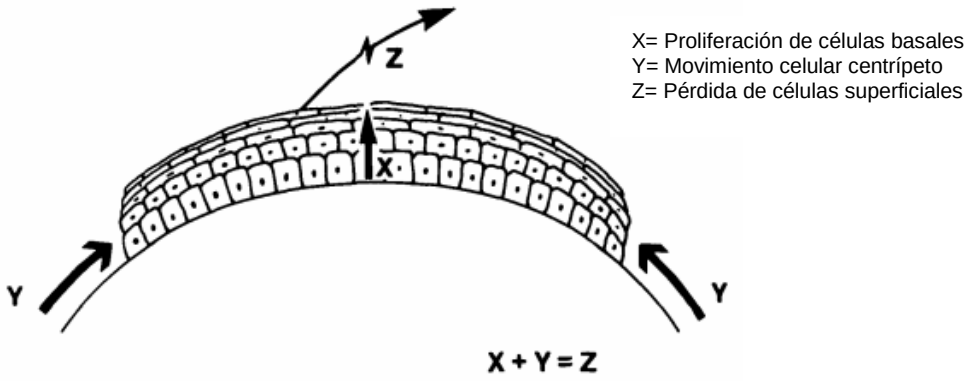

Figura 4. Hipótesis de Thof and Friend sobre la fisiología de la regeneración del epitelio corneal. Adaptado de Thoft and Friend, 1983.

Los queratocitos son las principales células del estroma y las encargadas de su mantenimiento. Entre sus funciones están la síntesis y reabsorción de moléculas de colágeno, glicosaminoglicanos y metaloproteasas, esenciales para el mantenimiento de la homeostasis estromal.

Las células endoteliales no parecen presentar actividad mitótica *in vivo*. El número de células endoteliales disminuye con la edad, la inflamación y otras patologías como la Distrofia de Fuchs. Las células endoteliales remantes cubren el espacio sobrante aumentando su tamaño y perdiendo la forma hexagonal (39).

6. Opacificación corneal por fibrosis

El daño corneal secundario a cirugías o patologías desencadena un complejo sistema de cicatrización encaminado a proteger la córnea y restablecer su estructura y función. Sin embargo, este proceso en ocasiones resulta en pérdida de la transparencia corneal y disminución de la visión. La persistencia tras la cicatrización de miofibroblastos y matriz extracelular desorganizada, producida por estos, produce opacidad corneal (40).

Los miofibroblastos son células fibroblásticas con una estructura y fisiología propias de células de músculo liso. Estas células restablecen la integridad de la córnea tras lesiones profundas por su capacidad de contracción de las heridas, secreción de matriz extracelular y adhesión a estructuras circundantes. La expresión de α actina de músculo liso (α-SMA) es el principal marcador de fibroblastos, aunque en estados tempranos expresan vimentina pero no α-SMA o desmina (41).

Se han asociado varios factores al desarrollo de opacidad corneal, incluyendo la extensión de la lesión, irregularidad de la superficie del estroma o cambios en los proteoglicanos estromales. Sin embargo, la regeneración de la membrana basal epitelial parece ser el factor determinante en la aparición de opacidad.

Anormalidades funcionales y estructurales de la membrana basal del epitelio permiten el paso de cantidades elevadas de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento transformante β, al estroma favoreciendo la diferenciación a miofibroblastos *(41, 42)*.

En la prevención de la opacidad corneal secundaria a queratectomía fotorrefractiva (PRK) se utiliza mitomicina C de forma habitual en virtud de su efecto inhibidor de la proliferación de queratocitos y otras células precursoras de miofibroblastos en el estroma (3).

El tratamiento de las opacidades corneales establecidas consiste en el remplazo del tejido afectado por otro donante.

7. Insuficiencia límbica.

El déficit de células madre limbares (LSCD) es una enfermedad de la superficie ocular causada por un descenso en el número o la función de las LESC que conlleva la imposibilidad de mantener la homeostasis del epitelio corneal.

El epitelio corneal está sometido a un proceso continuo de renovación y regeneración celular. Las células más superficiales se descaman y eliminan en la película lagrimal siendo reemplazadas mediante la proliferación de las LESC. Estas células constituyen además la barrera entre el epitelio corneal y conjuntival. Cuando se ven dañadas de forma significativa se produce la proliferación del epitelio conjuntival sobre la superficie corneal, lo que se conoce como conjuntivalización.

Como consecuencia aparece un epitelio engrosado e inestable, al adherirse menos al estroma, frecuentemente con neovascularización e infiltración de células inflamatorias. Puede acompañarse de dolor crónico por la aparición de defectos epiteliales recurrentes o persistentes, inflamación de la superficie ocular, cicatrización y pérdida de agudeza visual secundaria a la conjuntivalización (43).

7.1. Etiología.

La clasificación etiológica originalmente propuesta por Tseng et al. diferencia entre LSCD adquirida o hereditaria (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación etiológica del déficit limbar.

1. Adquirido	**1. No inmunológico** Quemadura química Quemadura térmica Radiación Uso de lentes de contacto Intervenciones quirúrgicas en el limbo Queratopatía bullosa crónica Tracoma Inducido por fármacos: - Mitomicina C - 5- Fluorouracilo - Conservantes **2. Inmunológico** Síndrome de Stevens Johnson Necrólisis tóxica (Síndrome de Lyell) Penfigoide cicatrizal Pseudopenfigoide Queratitis ulcerativas periféricas (Mooren) Enfermedades alérgicas - Conjuntivitis vernal - Queratoconjuntivitis atópica **3. Idiopático**
2. Hereditario	Aniridia Disqueratosis congénita Síndrome autoinmune poliglandular Xeroderma pigmentoso

También se puede distinguir entre LSCD primario y secundario. El LSCD primario está relacionado con alteraciones del microambiente estromal que comprometen la función celular. Es el caso de la aniridia, la eritroqueratodermia congénita, las queratopatías neurotróficas (neurales e isquémicas) o la limbitis crónica.

La insuficiencia límbica secundaria es más frecuente y está relacionada con factores externos que destruyen las LESC. Pueden diferenciarse causas de destrucción traumática como las causticaciones químicas (constituyen la causa más habitual de insuficiencia límbica), quemaduras, cirugías, uso prolongado de lentes de contacto o tumores queratoconjuntivales y causas de destrucción inflamatoria como en el Síndrome de Stevens-Johnson o el penfigoide ocular cicatricial por ejemplo.

En el déficit de LESC difuso o total la conjuntivalización afecta a 360º de la córnea. Hablaríamos en este caso de insuficiencia límbica total. Cuando sólo afecta a una región del limbo, la conjuntivalización es sectorial y se denomina insuficiencia límbica parcial.

Las manifestaciones clínicas del LSCD varían en función de la gravedad y extensión. Los criterios diagnósticos incluyen la presentación clínica y test diagnósticos que demuestren la existencia de células epiteliales conjuntivales.

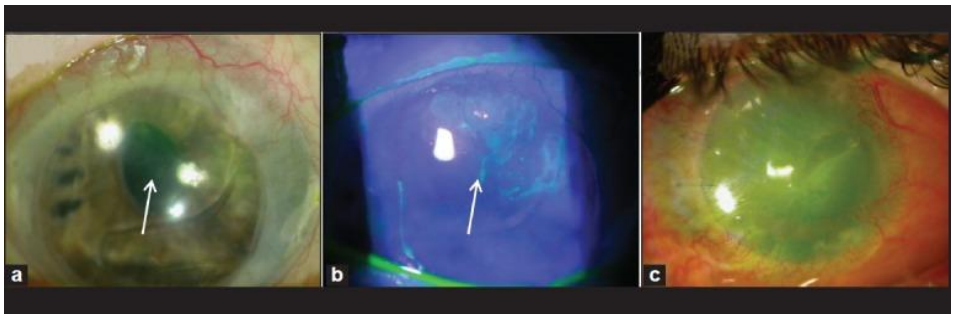

Figura 5. Presentación clínica del déficit de células madres limbares (LSCD). **a** y **b** patrón de la tinción con fluoresceína. **c**, LSCD total con neovascularización corneal y defecto epitelial en un paciente sometido a queratoplastia. Adaptado de Sejpal, Bakhtiari et al. 2013.

7.2. Tratamiento.

7.2.1. Tratamiento médico.

La optimización de la superficie ocular es el primer paso en el manejo del LSCD. En LSCD parciales aumenta la probabilidad de que las células limbares remanentes sobrevivan y en LSCD totales la supervivencia del injerto trasplantado.

Esto implica asegurar un buen control de la inflamación subyacente, una buena lubricación, un cierre palpebral adecuado, y la eliminación de la queratinización y el simblefaron (44).

Normalmente la superficie ocular de pacientes con LSCD está expuesta a múltiples agresiones como sequedad ocular, inflamación o toxicidad producida por fármacos. Su tratamiento incluye el uso de lubricantes, antiinflamatorios (ciclosporina, corticoesteroides), tapones lagrimales, derivados hemáticos o lentes de contacto terapéuticas, así como evitar el uso de conservantes.

7.2.2. Tratamiento quirúrgico.

Cuando el LSCD es unilateral o bilateral parcial y el paciente está asintomático se considera suficiente el seguimiento del paciente.

Las opciones terapéuticas tempranas en caso de LSCD parcial sintomático incluyen el desbridamiento mecánico, conocido como epiteliectomía conjuntival sectorial, y el injerto de AM.

La epitelectomía conjuntival sectorial permite la reepitelizacón a partir del epitelio limbar intacto remanente. La AM por su parte actúa como membrana basal para la epitelización y reduce la angiogénesis y la inflamación corneal (45).

El tratamiento del LSCD total es el trasplante de limbo. Si existe pérdida de trasparencia corneal sería necesario realizar además una queratoplastia para restaurar la visión.

En los casos unilaterales se puede obtener el injerto de limbo del ojo contralateral, denominado injerto conjuntivolimbar autólogo (CLAU). El ojo donante puede sufrir complicaciones como *haze*, pseudopterigium, queratitis filamentosa, aparición de epitelio anormal o depresión corneal.

En el LSCD total bilateral es necesario obtener las células madre limbares de una fuente alogénica. Si el injerto procede de un donante cadáver hablaríamos de un injerto queratolimbar alogénico (LKAL) mientras que si es un donante vivo se trataría de un injerto conjuntivolimbar alogénico (LR-CLAL) (44). En estos casos el riesgo de rechazo es alto por lo que es necesario establecer un tratamiento inmunosupresor. Se ha descrito el uso de queratoprótesis como una alternativa al trasplante alogénico para evitar la inmunosupresión (46).

7.2.3. Terapia celular. Expansión *ex vivo* de células madre.

7.2.3.1. Expansión *ex vivo* de células madre limbares autólogas o alogénicas.

La escasez de limbos junto con la iatrogenia asociada a la donación de tejido limbar, ya sea autólogo o alogénico, ha hecho buscar fuentes alternativas de células madre.

Pellegrini describió por primera vez el uso de LESC cultivadas *ex vivo* para tratar el LSCD en humanos (8). Esta técnica, basada en el trabajo de Rheinwald y Green en piel (47), consiste en tomar una biopsia mínima del ojo sano, en casos unilaterales, o del donante vivo o cadáver, en los bilaterales, y a partir de ella aislar y cultivar las LESC de forma que se obtenga una lámina de células adecuada para el trasplante.

Este procedimiento posee una serie de ventajas teóricas sobre los tratamientos convencionales. Por un lado la biopsia necesaria es significativamente menor, lo que minimiza el riego de complicaciones en el ojo donante e incluso permite tomar una biopsia adicional si fuera necesario. Otra potencial ventaja es la reducción del riesgo de rechazo agudo o crónico por la ausencia de células presentadoras de antígeno en los injertos cultivados.

7.2.3.2. Expansión *ex vivo* de células madre epiteliales autólogas de otras fuentes.

El trasplante de láminas de epitelio mucoso oral cultivado autólogo (COMET) fue descrito por Nakamura y Kinoshita en 2003 para reconstruir la superficie ocular en conejos (48).

Con el uso de epitelio de la mucosa oral como una fuente de células para el tratamiento de LSCD bilateral no existe riesgo de rechazo y por lo tanto, no hay necesidad de inmunosupresión. Además, la mucosa oral expresa CK3 al igual que el epitelio corneal, lo que sugiere que la expresión de genes en el epitelio oral y de la córnea puede ser similar.

Entre las desventajas cabe citar la imposibilidad de utilizar este tejido en enfermedades inmunológicas, como el Síndrome de Stevens-Johnson y el mayor riesgo de neovascularización corneal en los pacientes trasplantados (49).

7.3. Métodos de expansión *ex vivo de* células madre limbares.

La expansión ex vivo de LESC a partir de pequeñas biopsias supone una prometedora alternativa a los tratamientos convencionales. Los métodos de cultivo comúnmente utilizados son el cultivo por explantes y por digestión (50, 51).

En el método de cultivo por explantes la biopsia de tejido donante es colocada sobre un soporte y cultivada hasta la formación de un epitelio adecuado para el trasplante. El método de cultivo por explantes es más sencillo y evita el potencial daño enzimático de las células (52).

En el método de cultivo por digestión se utiliza la enzima dispasa, que digiere el colágeno de la membrana basal separando las células del estroma, y tripsina que rompe las uniones entre células logrando una suspensión de células individuales. Está suspensión es sembrada sobre una capa de células cebadoras y cultivada hasta obtener una lámina de epitelio (50). Más recientemente Chen et al. han descrito un método de aislamiento mediante colagenasa A en el que las células estromales adyacentes permanecen unidas a las LESC de forma que se mantiene en cierta manera el nicho limbal favoreciendo la proliferación, incluso en ausencia de células cebadoras (53).

Aunque ambos métodos consiguen la formación de epitelio corneal, la suspensión celular en presencia de células cebadoras logra una expansión más rápida. Por otro lado las células obtenidas parecen más pequeñas, compactas y uniformes, con mayor número de uniones desmosómicas, esto se puede atribuir al nicho creado por las células cebadoras (50, 51). Sin embargo el patrón de expresión de marcadores (p63, EGFR, K19, integrina β-1, CK3, involucrina y conexina 43) es similar en sendos métodos (51). En un estudio reciente López-Paniagua et al. sugieren que los cultivos obtenidos a partir de suspensiones celulares incluyen un

mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) que los obtenidos por explantes (8% *vs* 1%), asociando este hecho a la presencia un mayor número de células indiferenciadas en estos cultivos (54) . Actualmente existen múltiples variaciones de estos métodos de cultivo de LESC (49, 55).

El co-cultivo con fibroblastos 3T3 ha demostrado ser el método de cultivo de células epiteliales más potente, preservando un mayor número de células indiferenciadas. Las células 3T3 son fibroblastos aislados de embriones de ratón que presentan una alta capacidad proliferativa. Han sido ampliamente utilizados en el cultivo de células epiteliales, especialmente en piel y córnea. Son previamente irradiados o tratados con mitomicina-C para inhibir su crecimiento y se utilizan para reproducir el nicho limbar *in vitro*.

Sin embargo cuentan entre los riesgos conocidos asociados al uso de células cebadoras 3T3 microquimerismo xenogénico, antigenicidad y contaminación con virus o priones. Es más, pueden existir virus desconocidos en las células murinas. Se han considerado distintas alternativas de origen humano al uso de 3T3 murinas, como fibroblastos humanos (56, 57), células mesenquimales de médula ósea (58) o células epiteliales de cordón umbilical (59). Pese a todo el 50% de los protocolos utilizados en la clínica continua utilizando los fibroblastos murinos (60).

Clásicamente los medios de cultivo utilizados para la expansión de LESC han incluido productos de origen animal o recombinante por sus propiedades proliferativas. Generalmente el medio basal es el medio de cultivo modificado de Dulbecco y Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado con suero bovino fetal (FBS), insulina, toxina colérica, triiodotironina (T3), adenina, hidrocortisona y factor de crecimiento epidérmico (EGF).

El cultivo y trasplante de LESC normalmente implica el uso de un soporte o *scaffold*. La AM ha sido utilizada ampliamente en la práctica clínica para el restablecimiento de la superficie ocular incluso, como se ha comentado anteriormente, llegando a restablecer un epitelio normal en casos de LSCD parcial (61).

La AM es la capa más interna de la placenta, consiste en una membrana basal y un estroma avascular. La membrana basal facilita la migración y la adhesión de las células epiteliales y previene la apoptosis. El estroma de la AM contiene factores de crecimiento (62), proteínas antiangiogénicas y antiinflamatorias e inhibidores de varias proteasas (63), de acuerdo con los estudios clínicos publicados acelera la reepitelización y disminuye la inflamación y la cicatrización de la superficie ocular.

La AM ha demostrado inhibir la diferenciación inducida por TGF-β de fibroblastos corneales y limbares a miofibroblastos (64) y reducir el *haze* en un modelo animal de queratectomia por láser (65). Además favorece la proliferación e indiferenciación de las LESC (66).

Por todo lo anterior la AM se postula como un sustrato ideal para el cultivo de LESC (67, 68) habiendo sido utilizada en la clínica para el tratamiento de LSCD con y sin células (52, 61).

Sin embargo, el uso de AM implica altos costes asociados a las pruebas de detección de patógenos, preparación del tejido en una sala blanca y almacenamiento. Presenta además varias desventajas como riesgo de transmisión de enfermedades, falta de transparencia y calidad variable. Además de una acesibilidad limitada. Se han estudiado varias alternativas: fibrina, queratina, colágeno, fibroína, lentes de contacto o polímeros sintéticos entre otras (69-71). Incluso se han ensayado métodos de cultivo sin sustrato (72).

La mayoría de protocolos de cultivo de LESC descritos incluyen productos animales o tejidos humanos, pudiendo por tanto inducir microquimerismo o trasmisión de enfermedades por contaminación con bacterias, virus u otros agentes infecciosos. En una revisión llevada a cabo en el año 2.005 se evidenció que el 95% de los protocolos seguidos en ensayos clínicos publicados hasta esa fecha incluían uno o más derivados animales y uno o más productos alogénicos (60). Las combinaciones de productos animales normalmente incluyen FBS y otros derivados bovinos (como extracto de pituitaria, aprotinina o colágeno), tripsina (origen porcino), toxina colérica y células cebadoras 3T3, de origen murino, irradiadas o tratadas con mitomicina C. Los componentes alogénicos incluyen células epiteliales del limbo esclerocorneal, trombina y fibrinógeno de origen humano y AM.

8. Derivados hemáticos en oftalmología.

8.1. Perspectiva histórica.

El tratamiento de patologías oftalmológicas con derivados hemáticos se remonta a muchos años atrás. Ya en el Papiro de Ebers, 1.534 AC, se cita la aplicación de sangre en los ojos. En 1975 Ralph describe por primera vez el uso de suero autólogo (73) y en 1.984 fue evidenciado su efecto beneficioso en pacientes con queratoconjuntivitis seca por Fox (74). Posteriormente Tsubota demostró que la aplicación de suero autólogo en pacientes con ojo seco asociado a Síndrome de Sjögren no solo mejoraba los síntomas si no que tenía un efecto beneficioso sobre el epitelio (75).

Sin embargo, fue a finales de los años 90 del siglo pasado cuando su uso ganó aceptación y se extendió de forma vertiginosa (75, 76). Desde entonces el suero autólogo ha sido cada vez más utilizado en el tratamiento de las enfermedades de la superficie ocular (12).

El uso de los derivados hemáticos en oftalmología surge de la necesidad de un sustituto lagrimal que además de proporcionar hidratación, aporte otros componentes esenciales para el mantenimiento y la regeneración de la superficie ocular.

La aplicación del suero autólogo como sustituto lagrimal se basa en que su composición es muy similar a la de la lágrima, siendo la concentración de varios de sus componentes equiparable (Tabla 2), con la salvedad de más vitamina A, lisozima, factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y fibronectina y menos Ig A, factor de crecimiento epidérmico y vitamina C en el suero que en la lágrima (12) (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de la composición de lágrima y suero (12, 77-79)

	Lágrima	**Suero**
pH	7,4	7,4
Osmolaridad (mOsm/L)	298	296
EGF (ng/ml)	0,2-0,3 (77) 1,9-9,7(76)	0,5
TGF-β (ng/ml)	2-10	6-33
Vit A (mg/ml)	0,02	46
Fibronectina (µg/ml)	21	205
Lisozima (mg/ml)	1,4	6
SIgA (µg/ml)	1190	2
IGF-I (ng/ml)	157	-
SP (ng/ml)	0,157	0,071
NGF (pg/ml)	468	54

EGF: Factor de crecimiento epidérmico, **TGF-β:** Factor de crecimiento transformante β, **SIgA:** Inmunoglobulina A de superficie, **IGF-I:** Factor de crecimiento similar a insulina, **SP:** Sustancia P, **NGF:** Factor de crecimiento nervioso.

En los últimos años se ha evolucionado del uso del suero autólogo a la utilización de los conocidos como plasmas ricos en plaquetas (PRP) debido al papel de las plaquetas sobre la reparación tisular.

8.2. Importancia de los factores de crecimiento en la superficie ocular.

Las plaquetas constituyen un importante reservorio de factores de crecimiento y otras proteínas (fosfatasa ácida, α1-antitripsina, factores quimiotácticos, fibronectina) claves en la cicatrización y regeneración tisular. La mayoría se encuentran almacenados en los gránulos-α del citoplasma plaquetario (79). Muchas de las citoquinas presentes en plasma y plaquetas son esenciales para el mantenimiento del epitelio de la superficie ocular.

Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF)

Es un potente mitógeno de células epiteliales. La unión del ligando activa el receptor tirosin kinasa (EGFR) produciendo síntesis de DNA, producción de matriz extracelular, incluyendo fibronectina y ácido hialurónico, y proliferación celular. La fosforilación del receptor también conlleva una reorientación del citoesqueleto, lo que promueve la migración celular. La presencia simultánea de distintas moléculas de la matriz extracelular, como fibronectina, aumenta la polarización requerida para la migración direccional y facilita la comunicación cruzada entre integrinas y EGFRs.

Se ha visto que el EGF inhibe la diferenciación terminal de las células epiteliales corneales. *In vivo*, se ha descrito que la aplicación tópica de EGF a concentraciones entre 10-20µg/ml puede mejorar la cicatrización de úlceras corneales. Es probable que este factor de crecimiento tenga un papel importante en el mantenimiento del espesor corneal, siendo también un potente estimulador de la motilidad epitelial corneal (80, 81). Tiene efecto antiapoptótico y ha sido relacionado con la producción de mucina 1 por las células caliciformes (79).

Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β)

La respuesta a TGF-β es habitualmente célula-específica incluyendo producción de matriz extracelular, cambios en la forma celular, regulación del crecimiento y diferenciación. Se cree que TGF-β inhibe el crecimiento de células epileliales, endoteliales y leucocitos y estimula la diferenciación de fibroblastos.

TGF-β induce la proliferación y migración de fibroblastos estromales y modifica la síntesis de matriz extracelular modulando la respuesta tras una lesión. En concreto aumenta el heparán y dermatán sulfato y disminuye el queratán sulfato del estroma en experimentos *in vitro* e *in vivo*, además disminuye su degradación inhibiendo la acción de metaloproteasas y otras enzimas proteolíticas (79).

Se ha visto que la adicción de TGF-β en concentraciones superiores a 1ng/ml aumenta los efectos del EGF sobre el crecimiento de queratocitos *in vitro* por un aumento de la expresión de receptores EGF de alta afinidad. TGF-β parece inhibir ligeramente el efecto de EGF sobre la proliferación y migración de células epitelialiales *in vitro* y en gran medida el crecimiento inducido por factores de crecimiento de queratinocitos y hepatocitos, indicando su actividad en la regulación de la proliferación de las células corneales. Tanto TGF-β1 como TGF-β2 inhiben la proliferación epitelial siendo mayor el efecto de TGF-β2. Pese a su efecto supresor sobre la proliferación celular su efecto global sobre la cicatrización es positivo, siendo su concentración mayor durante los procesos de reparación estromal.

Se cree que TGF-β a las concentraciones presentes en el humor acuoso inhibe la angiogénesis en el segmento anterior, aunque su papel en la vascularización corneal continúa siendo controvertido. Cabe destacar que TGF-β es el principal

responsable de la ACAID (desviación inmunológica asociada a la cámara anterior) (80).

Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF)

Este factor de crecimiento es producido por células estromales y actúa de forma paracrina en el epitelio corneal. La expresión tanto de KGF como de su receptor es mayor en los fibroblatos y células epiteliales limbares en relación con las células centrales, lo que sugiere que modula preferentemente la acción de las células madre. La adicción de KGF a concentraciones entre 10 y 100ng/ml a cultivos de células epiteliales resulta en la síntesis de DNA y en la promoción del crecimiento celular, sin afectar a la motilidad o diferenciación celular. Sin embargo, el efecto sobre la proliferación de queratinocitos es insignificante.

La expresión de niveles bajos mantenidos de KGF en la córnea intacta sugiere también su papel en el mantenimiento del epitelio corneal.

Factor de Crecimiento de Hepatocitos (HGF)

Además de su efecto mitógeno sobre hepatocitos, HGF produce proliferación, motilidad y cambios morfológicos en células epiteliales, endoteliales y melanocíticas.

En la córnea el receptor de HGF se expresa en mayor medida en células epiteliales y de forma menos importante en otros tipos celulares. HGF es producido fundamentalmente por fibroblastos por lo que su acción sobre el epitelio es paracrina.

Al contrario que el KGF la expresión de la proteína y su receptor es mayor en la córnea central que en el limbo. HGF estimula la proliferación de células epiteliales y endoteliales a concentraciones entre 1 y 25ng/ml. HGF está presente también en lágrima a concentraciones de 200pg/ml lo que contribuye al mantenimiento epitelial.

Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF)

El PDGF-BB se produce en el epitelio, dónde se une a la membrana basal. Se ha visto que PDGF-BB estimula la migración de fibroblastos de forma dosis dependiente, y tanto PGF-AA y BB tienen un efecto quimiotáctico sobre células epiteliales en presencia de fibronectina. PDGF media la respuesta de los fibroblastos a TGF-β (80).

También presenta efecto quimiotáctio sobre monocitos y macrófagos y estimula la expresión de otros factores como el TGF-β (81).

Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF)

Sus receptores se expresan en los tres tipos celulares corneales: epiteliales, estromales y endoteliales. Tanto la forma ácida como la básica inducen la mitosis en epitelio, estroma y endotelio. Su alta concentración en la membrana de Descemet refleja su papel en la migración de las células endoteliales durante la cicatrización corneal.

La adición de FGF al cultivo de células estromales incrementa la proliferación y migración (80).

Factor de crecimiento nervioso (NGF)

NGF y su receptor se localizan en todas las capas corneales, en mayor medida en epitelio y endotelio, también se encuentra en humor acuoso. Promueve la proliferación y diferenciación de las células epiteliales a concentraciones de 250ng/ml *in vitro*, sin embargo su efecto es menor que el de otros factores como EGF. NGF también estimula el crecimiento de fibroblastos estromales en cultivo. *In vivo* la aplicación tópica de NGF ha demostrado promover la cicatrización de úlceras neurotróficas (80).

Factor de crecimiento similar a insulina (IGF)

El factor de crecimiento similar a insulina y su receptor se encuentra en epitelio y estroma, donde interviene en la proliferación y diferenciación mediante un mecanismo sinérgico con la sustancia p. IGF tiene un efecto quimiotáctico para fibroblastos y juega un importante papel en la acción de otros factores (79).

En la Tabla 3 se resumen las principales funciones y localización de los receptores en el segmento anterior de los factores de crecimiento más importantes derivados del plasma y las plaquetas.

Tabla 3. Principales factores de crecimiento presentes en el plasma y las plaquetas, localización de su receptor y funciones en el segmento anterior.

	Loc. Receptor	Función
EGF	Epitelio (>limbo)	Síntesis de matriz extracelular (fibronectina y ácido hialurónico) Estimula la proliferación y migración celular Inhibe la diferenciación epitelial terminal Efecto anitapoptótico Aumenta la producción de mucina 1
TGF- β	Epitelio	Inhibe el crecimiento de células epiteliales Estimula la proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos Modifica la síntesis de matriz extracelular (↑heparan y dermatan sulfato y ↓ keratan sulfato) Inhibe la actividad de proteasas y otras enzimas proteolíticas ↑ el efecto del EGF sobre el crecimiento de queratocitos Responsable de la desviación inmunológica asociada a la cámara anterior (ACAID)
KGF	Epitelio (>limbo)	Síntesis de DNA y en la promoción del crecimiento celular
HGF	Epitelio (>córnea central) < Endotelio	Proliferación, motilidad y cambios morfológicos en células epiteliales y endoteliales.
PDGF	Estroma Endotelio	Estimula la proliferación y migración de células endoteliales y fibroblastos PGF media la respuesta de los fibroblastos a TGF-β
FGF	Epitelio Estroma Endotelio	Mitosis en epitelio, estroma y endotelio Migración de las células endoteliales y estromales durante la cicatrización corneal
NGF	Epitelio < Estroma Endotelio	Promueve la proliferación y diferenciación Liberación de neuropéptidos y otros factores de crecimiento.
ILGF	Epitelio Estroma	Proliferación y diferenciación del epitelio Efecto antiapoptótico Aumenta la expresión de integrinas

EGF: Factor de crecimiento epidérmico, **TGF- β**: Factor de crecimiento transformante β, **KGF**: Factor de crecimiento de queratinocitos, **HGF**: Factor de Crecimiento de Hepatocitos, **PDEGF**: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. **FGF**: Factor de crecimiento de fibroblastos, **NGF**: Factor de crecimiento nervioso, **ILGF**: Factor de crecimiento similar a insulina.

Además de los factores de crecimiento otros componentes de los PRP tienen efecto sobre la superficie ocular (Tabla 4).

Tabla 4. Función de otros componentes de los derivados hemáticos sobre la superficie ocular. Adaptado (79).

Vitamina A	Antibacteriana y antoxidante. Epiteliotrófofico (previene la metaplasia escamosa).
Fibronectina	Matriz extracelular. Favorece la migración celular en procesos de reparación.
Anexina 5	Interacciona con ciertas integrinas mimetizando el efecto de la fibronectina. Estimula la producción de urokinasa, lo que facilita la migración celular durante el proceso de reparación.
Albúmina	Efecto antiapoptótico. Disminuye la degradación de citoquinas y factores de crecimiento.
α2- macroglobulina	Neutraliza enzimas proteolíticas (anticolagenasa).
Sustancia P	Favorece la migración y proliferación de células epiteliales.
Inmunoglobulinas	Efecto antimicrobiano.
Lisozima	
Complemento	

Pese a que las propiedades físico-químicas del suero autólogo son similares a las de la lágrima pesenta una serie de limitaciones. En primer lugar el uso del suero autólogo dista mucho de estar estandarizado; en la literatura se han descrito incontables métodos de preparación y aplicación que afectan a la composición de este preparado y a sus resultados clínicos (82).

Además, la elaboración del suero autólogo por técnica abierta en la mayoría de los casos no cumple las exigencias regulatorias actuales (83, 84).

Por último, aunque no menos importante, el suero autólogo incluye citoquinas, como IL-6, IL-1β, factor de necrosis tumoral alfa (FNT-α) y metaloproteasas e hidrolasas derivadas de la degranulación leucocitaria con efectos pro-inflamatorios perjudiciales para la regeneración del tejido ocular (85).

9. Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) pertenece a los citados PRP. A partir de sangre del paciente, mediante centrifugación, se obtiene plasma enriquecido en plaquetas que es activado con cloruro cálcico, de forma que los factores de crecimiento y otras sustancias, que como hemos visto participan en la reparación y regeneración tisular, son secretadas por exocitosis de los gránulos-α plaquetarios al medio. Además, el PRGF no contiene leucocitos, ya que aumentan el nivel de determinadas citoquinas, incluyendo interleuquinas (IL-6, IL-1β) y el factor de necrosis tumoral α (FNT-α), con efectos pro-inflamatorios (17).

Actualmente al no existir un consenso respecto a la terminología y método de preparación de los PRP, existiendo multitud de procedimientos diferentes, la tecnología PRGF-Endoret® (BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, España) ha representado un hito en el desarrollo y uso de estas terapias biológicas en términos de seguridad, eficacia y reproducibilidad.

Otra de las características diferenciales del PRGF es su gran versatilidad, pudiendo obtenerse distintas formulaciones que incluyen: PRGF líquido, coágulo de PRGF y membrana de fibrina (86, 87).

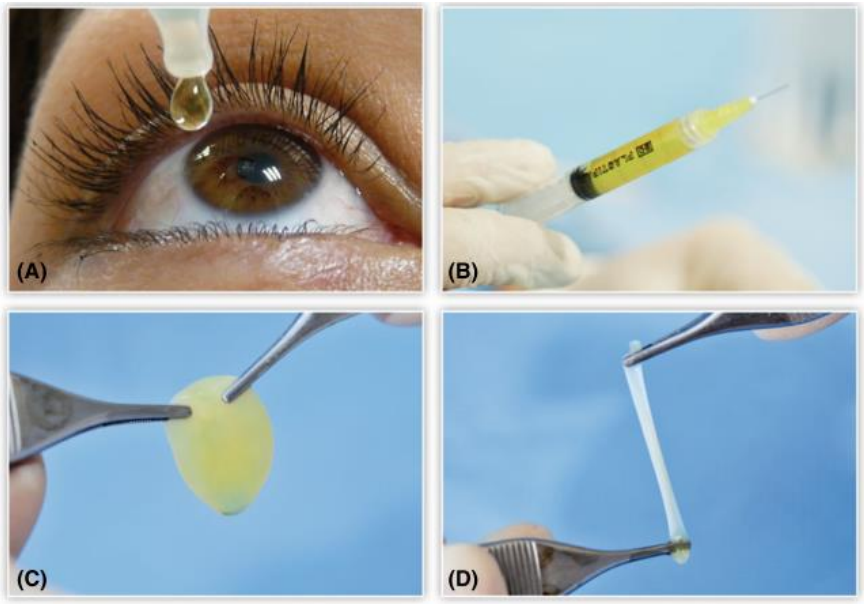

Figura 6. Distintas formulaciones de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). Colirio de PRGF (A), PRGF para inyección (B), coágulo de PRGF (C), membrana de fibrina (D). Adaptado de (81)

Además, el sistema de obtención de PRGF-Endoret® (BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, España) es cerrado con marca CE, por lo que cumple con los requisitos establecidos por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en su resolución sobre el uso terapéutico no sustitutivo del plasma autólogo y sus fracciones (83).

En el ámbito clínico se ha podido comprobar la seguridad y el potencial terapéutico de las distintas formulaciones de PRGF en diferentes áreas de la medicina, como la cirugía oral, la traumatología o la cirugía vascular, a lo largo de más de 15 años (13).

El PRGF proporciona lubricación, aporta una serie de factores de crecimiento y otros con funciones epiteliotróficas, neurotróficas y antimicrobianas y presenta un pH y una osmolaridad similares a los de una lágrima natural, lo que lo convierte en un candidato idóneo para el tratamiento de patologías de la superficie ocular.

El colirio de PRGF ha demostrado ser eficaz y seguro en el tratamiento de patologías de la superficie ocular (88) como síndrome de ojo seco de distintas etiologías (89), enfermedad de injerto contra huésped ocular (90), defectos epiteliales persistentes (91) o úlceras corneales (92). También se ha utilizado la inyección de PRGF adyacente a la glándula lacrimal en el tratamiento del ojo seco severo asociado a Síndrome de Sjögren (85, 93).

La membrana de fibrina autóloga ha resultado útil en el tratamiento de úlceras corneales severas. Varios estudios han evaluado su efecto sola (94) o en combinación con otro tipo de membranas como la membrana amniótica (95) o la membrana de colágeno derivada de pericardio bovino (96) obteniendo un cierre estable de la úlcera corneal sin evidencia de infección, inflamación o dolor.

En los estudios clínicos revisados la incidencia de reacciones adversas es muy baja, siendo de carácter leve de forma general. Sólo se describen dos casos de ojo rojo e inflamación palpebral (88), un caso de aumento de la vascularización, que se resolvió tras la suspensión de preparado y la administración de corticoide tópico (92) y otro de ojo rojo y picor (91).

JUSTIFICACIÓN

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) es un derivado hemático clasificado dentro de los plasmas rico en plaquetas, autólogo que no incluye leucocitos en su composición. Mediante la concentración plaquetaria se aumenta la cantidad de EGF, PDGF y FGF (14) habiendo demostrado múltiples propiedades biológicas en distintos ámbitos de la medicina (13, 18). Estudios recientes muestran su eficacia y seguridad en el tratamiento de patologías de la superficie ocular como el ojo seco o los defectos epiteliales persistentes, incluso en casos refractarios al tratamiento con suero autólogo (89, 91). Sin embargo hasta el momento no se dispone de un procedimiento estandarizado para la obtención y administración del PRGF por vía oftálmica.

Las patologías de la superficie ocular son habitualmente de curso crónico, requiriendo tratamientos de larga duración. Como consecuencia es de gran importancia que los medicamentos utilizados en su manejo mantengan su estabilidad al menos durante varias semanas. En los tratamientos con derivados hemáticos de origen autólogo tampoco se ha de perder de vista la calidad de vida del paciente que debe estar sometido a extracciones de sangre periódicas y los gastos asociados a las extracciones periódicas en los que incurre tanto el paciente como las instituciones sanitarias.

Alargar el periodo de estabilidad del colirio de PRGF a 6 meses aumentaría la seguridad, el coste efectividad y la comodidad de los pacientes.

Otra posible forma de aplicación del PRGF por vía oftálmica es en forma de membrana de fibrina, según los resultados obtenidos en otras especialidades. Es necesario desarrollar la membrana de PRGF para su aplicación en cirugía oftalmológica y caracterizar las propiedades mecánicas, ultraestructura y manejabilidad.

Por último en base al efecto del PRGF sobre la proliferación y migración celular y a su disponibilidad bajo distintas formulaciones se decidió estudiar su aplicabilidad en terapias avanzadas de la córnea..

La mayoría de protocolos utilizados actualmente para el cultivo de LECS incluyen suplementos de origen animal, como el suero bovino fetal, factores de crecimiento recombinantes o fibroblastos murinos, por su efecto sobre la proliferación celular. El uso de estos productos no está exento de riesgos y puede producir microquimerismo xenogénico o trasmisión de enfermedades, siendo, por tanto, su aplicación clínica poco adecuada (60).

Además, en ingeniería tisular es necesario un soporte estructural, o *scaffold*, para el cultivo y trasplante celular. En el cultivo de limbo la AM ha sido el soporte más utilizado, habiendo demostrado efectos positivos sobre la reepitelización y la

inflamación. Sin embargo la AM lleva asociados altos costes de producción, riesgo de transmisión de enfermedades y una limitada disponibilidad.

En el presente trabajo se propone la aplicación de PRGF líquido como único suplemento de un medio de cultivo celular, por su alto contenido en factores de crecimiento y otras citoquinas implicadas en la proliferación celular, y la membrana de PRGF como soporte, ya que facilita a las células proteínas importantes para su adhesión, como la fibronectina plasmática, y contiene factores la proliferación del suero y plaquetarios que pueden aumentar el crecimiento celular.

Por todo lo anterior, es pertinente y queda sobradamente justificado el intentar realizar un trabajo de investigación sobre el desarrollo y estandarización de la aplicación por vía oftálmica del PRGF, como colirio, membrana y producto de terapias avanzadas.

HIPÓTESIS

Es posible desarrollar y estandarizar la preparación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento en forma de colirio, membrana y producto de terapias avanzadas, para su aplicación por vía oftálmica con objeto de favorecer la regeneración de tejidos oculares y evitar la fibrosis.

OBJETIVOS

1. Desarrollar el método de preparación de Plasma Rico en Factores de Crecimiento para su aplicación oftálmica estandarizada en forma de colirio y de membrana.

2. Caracterizar las formulaciones obtenidas; Determinar la composición del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento, su estabilidad biológica a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación y las propiedades mecánicas, utraestructura y aplicabilidad quirúrgica en oftalmología de la membrana de Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

3. Estudiar el efecto biológico del Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la proliferación, migración y diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos oculares.

4. Evaluar la aplicabilidad del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en terapias avanzadas mediante el desarrollo de un método de cultivo de células madre epiteliales limbares totalmente autólogo.

MATERIAL Y MÉTODO

Todas las muestras de origen humano fueron tratadas siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki y del Real Decreto 1716/2011 por el que se establecen los requisitos de tratamiento de las muestras biológicas de origen humano.

1. Desarrollo de las formulaciones oftálmicas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y de los kits necesarios para su elaboración estandarizada.

A partir de la técnica de preparación de PRGF descrita por Anitua et al. se colaboró con BTI Biotechnology Institute, S.L. (Vitoria, España) en la optimización del procedimiento de obtención del PRGF para su aplicación oftálmica en forma de colirio y de membrana de acuerdo a los requisitos galénicos y normativos vigentes.

Para ello se revisó el marco legal actual y los requisitos galénicos de las formas farmacéuticas de aplicación oftálmica. Se implementó el uso de filtros esterilizantes y de envases monodosis para el colirio, así como todas las medidas necesarias para garantizar la trazabilidad.

Las garantías exigibles de calidad se lograron desarrollando un método de obtención de PRGF mediante kits desechables con técnica cerrada. Además, se estableció un control de esterilidad sobre el producto terminado según se establece en la Farmacopea Europea.

Todas las modificaciones realizadas en el proceso de obtención fueron ampliamente ensayadas para garantizar la reproducibilidad del método de preparación en condiciones reales de uso, de forma que la experiencia de utilización redundó en la mejora del proceso.

1.1. Preparación del colirio de PRGF.

El protocolo definitivo de preparación del colirio de PRGF-Endoret® se detalla a continuación:

Se obtienen 81ml de sangre en tubos de 9ml con 0,5ml de citrato sódico 3,8% como anticoagulante. Los tubos se invierten con suavidad varias veces inmediatamente tras la extracción para lograr una apropiada homogenización de la sangre y el anticoagulante. Las muestras de sangre son centrifugadas a 580g y temperatura ambiente (TA) durante 8 minutos, la columna de plasma es pipeteada evitando la serie blanca. El plasma es activado con cloruro cálcico 10% (5µl/ml de plasma) a 37ºC durante 1 hora. Finalmente, el sobrenadante es recogido, filtrado y alicuotado en los dispensadores monodosis.

1.2. Preparación de la membrana de PRGF.

Para la obtención de las membranas de PRGF para aplicación oftálmica, al igual que se ha descrito para el colirio, se extraen 81ml de sangre en tubos de 9ml con 0,5ml de citrato sódico 3,8% como anticoagulante. Las muestras de sangre son centrifugadas a 580g y TA durante 8 minutos, la columna de plasma es pipeteada diferenciando los 2ml más cercanos a la serie roja (F2, fase inferior, rica en plaquetas) del resto (F1, fase superior, pobre en plaquetas) y evitando la serie blanca. Para cada membrana 5ml de F2 son sometidos a filtración esterilizante e incubados en pocillos de 35mm de diámetro con 250µl de cloruro cálcico 10% (50µl/ml) a 37ºC durante 30 minutos. Una vez formados los geles son colocados en un conformador y presionados durante 30 segundos. Se utilizan dos tamices diferentes para obtener membranas de 100 y 500µm de espesor. Las membranas así obtenidas se montan sobre discos de nitrocelulosa para favorecer su manejabilidad.

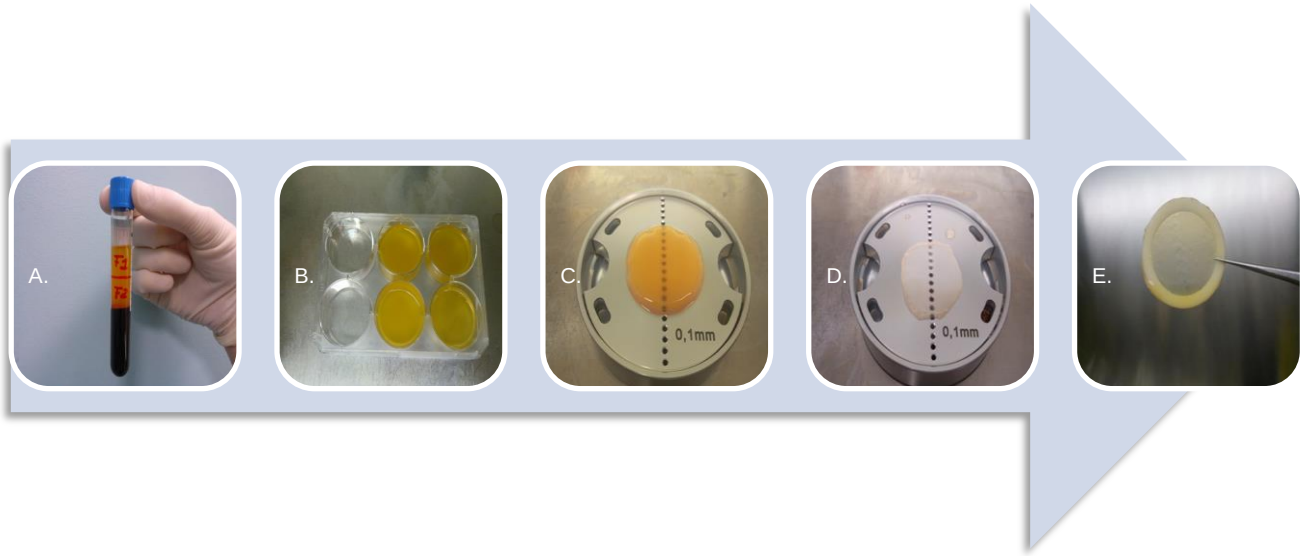

Figura 7. Proceso de preparación de las membranas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). **A**. Tubo citratado con sangre tras la centrifugación. **B**. Formación del gel en los pocillos. **C**. Gel sobre el conformador. **D**. Membrana obtenida tras la conformación. **E**. Membrana montada sobre disco de nitrocelulosa.

2. Caracterización de la composición del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y su estabilidad biológica a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación.

2.1. Preparación de PRGF.

Para la preparación de los colirios de PRGF se extrajo sangre mediante venopunción a voluntarios sanos previa firma del consentimiento informado, tras la explicación de la naturaleza y posibles consecuencias del estudio.

Las muestras de sangre fueron procesadas según el protocolo descrito usando el kit de oftalmología PRGF Endoret® (BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, España).

2.2. Condiciones de conservación.

Las muestras alicuotadas fueron medidas a tiempo 0 (t_0) o conservadas a -20ºC durante 3 (t_3) o 6 meses (t_6). Dos alícuotas de cada donante fueron descongeladas y mantenidas a 4ºC o TA durante las 72 horas anteriores al fin de cada periodo de conservación.

2.3. Contaje de plaquetas y leucocitos.

La concentración de plaquetas y leucocitos fue medida mediante un hemocitómetro (Micros 60; Horiba ABX, Montpelier, France).

2.4. Determinación de la concentración de factores de crecimiento.

Se midieron las concentraciones de PDGF-AB, TGF-β1, VEGF, FGF y EGF utilizando el kit comercial Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISA enzyme-linked immuno-sorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, MN).

2.5. Células y métodos de cultivo.

Para la determinación de la actividad biológica del colirio de PRGF se utilizaron queratocitos humanos primarios (ScienCell Research Laboratories, San Diego, CA). Estas células fueron cultivadas hasta confluencia a 37ºC y 5% de CO_2 en un medio de fibroblastos (ScienCell Research Laboratories) suplementado con 100UI/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina y 2% de suero bovino fetal (FBS, Sigma-Aldrich, MO, USA). Posteriormente las células fueron levantadas mediante incubación con tripsina (TrypLE Select, Gibco-Invitrogen, Grand Island, NY) y teñidas con azul tripán para evaluar la viabilidad celular. Estas células fueron utilizadas en pase 3 en los ensayos de proliferación celular.

2.6. Ensayo de proliferación celular.

Las células fueron sembradas a una densidad de 5.000células/cm^2 en placas de cultivo p96 utilizando medio de cultivo suplementado con 20% de PRGF de cada voluntario y cada condición de conservación (-20ºC y 4ºC o TA) a cada tiempo de estudio (t_0, t_3 y t_6) durante 72 horas. El número de células en cultivo fue estimado mediante el ensayo de proliferación celular CyQUANT®. Brevemente, el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente las placas de cultivo fueron congeladas a -80ºC para lisar las células. Tras la descongelación las muestras fueron incubadas con RNAsa A (1,4Kunitz/ml) disuelta en tampón de lisis celular durante 1 hora a TA. A continuación se añadió el colorante CyQUANT GR a cada muestra, manteniéndolo durante 5 minutos a TA y protegido de la luz. Por último la fluorescencia de las muestras fue medida (Twinkle LB 970; Berthold Technologies) y la cantidad de DNA calculada según una curva de calibración de 7,8 a 500ng/ml.

2.7. Ensayo de esterilidad.

La esterilidad de las muestras fue determinada siguiendo el método de inoculación directa descrito en la Farmacopea Europea. Se utilizaron 2 medios de cultivo enriquecidos, tioglicolato y tripticasa soja, adecuados para la detección de hongos y bacterias aerobias y anaerobias. Un mililitro de cada muestra de PRGF fue sembrado en los medios de cultivo que se incubaron durante 14 días a 32ºC en el caso del tioglicolato y a 22ºC los de tripticasa soja. Los medios fueron examinados visualmente a diario para detectar crecimiento microbiológico. Un aumento en la turbidez del medio fue considerado indicativo de contaminación microbiológica.

2.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa informático IBM SPSS Statistics® 22.0 (IBM, Nueva York, EEUU). Los datos cuantitativos fueron descritos con media y desviación o error estándar y los cualitativos con frecuencias absolutas y porcentajes. Se evaluó la normalidad con los test de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias entre grupos fueron comparadas mediante el análisis de la varianza (ANOVA), previa comprobación de la homocedasticidad y en los casos de no normalidad con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un análisis posterior de Mann-Whitney para comparaciones múltiples entre grupos.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas valores de $p<0,05$ y estadísticamente muy significativas $p<0,01$.

3. Determinación del efecto biológico del colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la proliferación, migración y diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos oculares.

3.1. Preparación de PRGF y suero autólogo.

Para la preparación de los colirios de PRGF y suero autólogo se extrajo sangre mediante venopunción a voluntarios sanos previa firma del consentimiento informado, tras la explicación de la naturaleza y posibles consecuencias del estudio.

La preparación de PRGF se realizó según se ha expuesto previamente (ver apartado 1.1).

Para la preparación del suero autólogo se dejó coagular las muestras de sangre a TA durante 20 minutos. Posteriormente fueron centrifugadas 10 minutos a 2.000g. El suero se aisló de la serie roja mediante un separador de gel, fue pipeteado, filtrado y diluido al 20% con cloruro sódico 0,9%.

Todas las muestras se conservaron a -80ºC hasta su uso.

3.2. Determinación de la composición.

El contaje de plaquetas y leucocitos y la determinación de factores de crecimiento se realizaron según se ha expuesto previamente (ver apartados 2.3 y 2.4).

3.3. Células y métodos de cultivo.

Se utilizaron fibroblastos conjuntivales y queratocitos estromales primarios (ScienCell Research Laboratories, San Diego, CA, USA) que fueron cultivados según se ha expuesto en el apartado 2.5. Estas células fueron utilizadas en pase 4 en todos los experimentos.

3.4. Caracterización celular.

La morfología de los fibroblastos cultivados fue evaluada mediante microscopía de contraste de fases y técnicas de inmunohistóquimica. Se estudió la expresión de colágeno tipo I (Chemicon e Millipore, Billerica, MA, USA), fibronectina y vimentina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) mediante microscopía de fluorescencia. Se evaluó, así mismo, la diferenciación espontánea a miofibrolastos de las células en cultivo por la expresión de α-SMA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondiente (1:200) y los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (1:5.000, Molecular Probes-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) y visualizados mediante microscopía de fluorescencia (Leica DM IRB, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.5. Ensayo de proliferación celular.

Las células fueron sembradas a una densidad de 5.000células/cm^2 en placas de cultivo p96 utilizando medio de cultivo basal suplementado con 0,1% de FBS, como control, 20% de colirio de PRGF o 20% de colirio de suero autólogo durante 72 horas. El número de células en cultivo fue estimado midiendo la cantidad de DNA mediante el ensayo de proliferación celular CyQUANT® (Invitrogen, Carlsbad, CA) según se ha expuesto en el apartado 2.6.

3.6. Ensayo de migración celular.

Para cuantificar la migración celular las células fueron sembradas en el interior de insertos de cultivo (Ibidi, GmbH, Martinsried, Germany) a una densidad de 20.000 células/cm^2 y cultivadas hasta lograr confluencia. Posteriormente el inserto fue retirado dejando un espacio libre de células de 500µm (Figura 8).

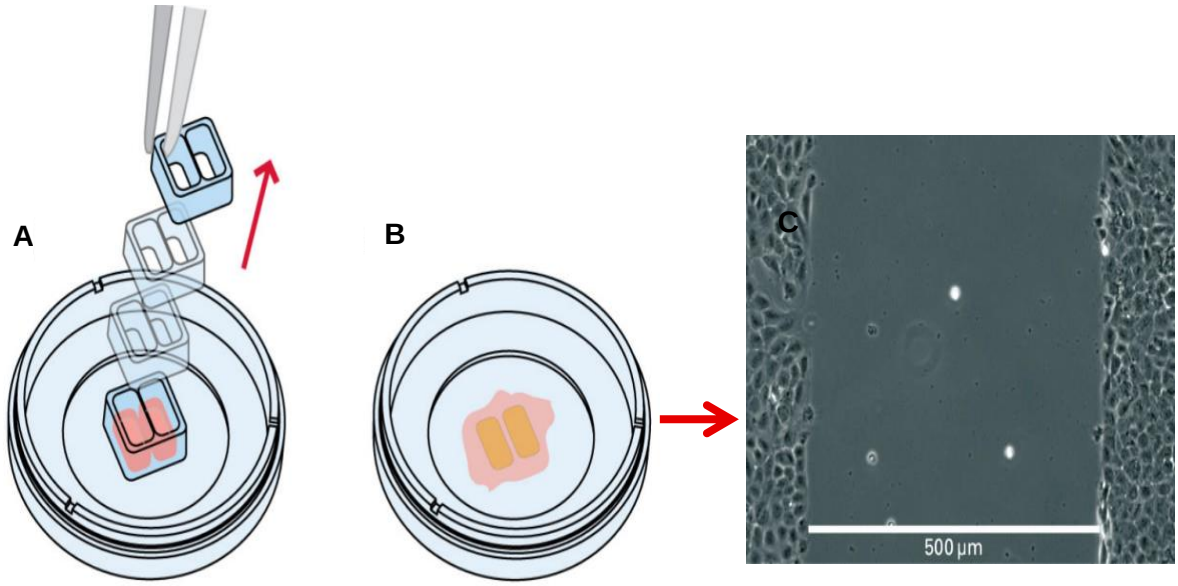

Figura 8. Ensayo de proliferación celular. **A**. Las células fueron sembradas en el interior de los insertos. **B**. Tas retirar el inserto se obtiene un espacio de 500µm entre las células. **C**. Microfotografía obtenida mediante microscopía de contraste de fases del espacio entre las células. Adaptado de www.ibidi.com.

A continuación las células fueron lavadas con PBS e incubadas con medio de cultivo suplementado con 20% PRGF, 20% suero autólogo o FBS durante 22 horas. Tras este tiempo los cultivos fueron incubados durante 10 minutos con Hoechst 33342 en PBS. Para cuantificar el número de células migratorias se tomaron fotografías mediante una cámara acoplada a un microscopio invertido (Leica DFC300 FX and Leica DM IRB, Leica Microsystems). El espacio entre las células y el número de células migratorias fue cuantificado mediante el software ImageJ® (http://rsb.info.nih.gov/ij NIH, Bethesda, MD, USA). Los resultados fueron expresados como número de células por mm^2.

3.7. Ensayo de diferenciación a miofibroblastos.

3.7.1. Estudio de la protección frente a la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1.

Para estudiar el efecto del colirio de PRGF y de suero autólogo sobre la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos se realizaron 2 tipos de ensayos. En el primero se trató de determinar la capacidad de los dos derivados hemáticos para prevenir la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1. Para ello los fibroblastos conjuntivales y los queratocitos estromales fueron tratados con 2,5ng/ml de TGF-β1 (Chemicon-Millipore, Billerica, MA, USA) o 2,5ng/ml de TGF-β1 más 20% de PRGF o suero autólogo durante 72 horas.

3.7.2. Estudio de la reversión de la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1.

Por otro lado para valorar la capacidad de los derivados hemáticos para revertir la diferenciación a miofibroblastos los dos tipos de fibroblastos fueron tratados con TGF-β1 durante 72 horas, posteriormente se retiró el medio y los cultivos fueron lavados con PBS. Finalmente las células fueron incubadas con 2,5ng/ml TGF-β1 y 20% de PRGF o suero autólogo, utilizando FBS como control. Tras 72 horas se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con PBS.

3.7.2.1. Ensayo de proliferación celular.

Para analizar la influencia del TGF-β1 se realizó el ensayo de proliferación según lo descrito previamente.

3.7.2.2. Expresión de marcadores.

Adicionalmente las células fueron sembradas a una densidad de 5.000 células/cm^2 en placas de cultivo p48 para determinar α-SMA y Ki-67, marcador de proliferación celular. Tras realizar los ensayos de protección y reversión de la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1, las células fueron fijadas con metanol durante 10 minutos. Posteriormente se bloquearon con 10% de FBS en PBS durante 30 minutos y fueron incubadas durante 1 hora con los anticuerpos *anti-mouse* de α-SMA (1:800) y *anti-rabbit* de Ki-67 (1:400, Abcam, Cambridge, UK), finalmente las células fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora a TA y los núcleos teñidos con Hoechst 33342 (1:5.000, Molecular Probes-Invitrogen, Grand Island, NY, USA) y visualizados mediante microscopía de fluorescencia (Leica DM IRB). El control isotípico fue realizado sustituyendo los anticuerpos primarios por FBS 10% en PBS.

Finalmente, se analizó la expresión de proteínas de fibrosis α-SMA, desmina y vimentina mediante electrotransferencia (western blot). Para ello los queratocitos estromales y los fibroblastos conjuntivales fueron sembrados a una densidad de

20.000 células/cm^2. Cuando los cultivos alcanzaron la confluencia se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS, posteriormente se realizaron los ensayos de protección y reversión de la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1 y las células fueron lavadas con PBS y lisadas con reactivo de extracción de proteínas (M-PER, Piercenet, Rockford, IL USA) suplementado con inhibidores de fosfatasas e hidrolasas. El lisado fue clarificado mediante centrifugación a 14.000g 10 minutos, posteriormente se recogió el sobrenadante. Para lograr la concentración proteica se utilizaron filtros para centrífuga de concentración de proteínas (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). La concentración de proteínas fue determinada mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA).

Cantidades iguales de proteína fueron reveladas mediante geles de electroforesis TGX (Bio Rad Lab, Hercules, CA, USA) y trasferidas a membranas Trans Blot turbo PVDF (Bio Rad Lab, Hercules, CA, USA). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche desnatada en polvo disuelta en tampón tris-hidroximetil aminometano (TBS) con 0,1% de polisorbato 20 (TBS-T, Bio Rad Lab, Hercules, CA, USA y SigmaeAldrich, St. Louis, MO, USA respectivamente) durante 1 hora a TA. Posteriormente fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes anti-α-SMA, anti-vimentina y anti-desmina (Abcam, Cambridge, UK) durante toda la noche a 4ºC. Al día siguiente fueron lavadas con TBS-T y tratadas durante 1 hora con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Finalmente fueron lavadas nuevamente con TBS-T y reveladas por quimioluminiscencia con substrato usando un analizador de imagen Chemi Doc™ XRS y el software Image Lab (Bio Rad Lab, Hercules, CA, USA).

3.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico aplicado corresponde con lo expuesto en el apartado 2.8.

4. Caracterización de la membrana de Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

4.1. Preparación de la membrana de PRGF.

Para la preparación de la membrana de PRGF se extrajo sangre mediante venopunción de 3 voluntarios sanos (rango de edad 27-40 años) previa firma del consentimiento informado, tras la explicación de la naturaleza y posibles consecuencias del estudio.

Las muestras de sangre fueron procesadas según el protocolo descrito en el punto 1.2 usando el kit de oftalmología PRGF Endoret® (BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, España)

4.2. Preparación de la membrana amniótica.

Las membranas amnióticas fueron obtenidas del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España).

Una vez descongeladas se lavaron con PBS para eliminar el medio de crioconservación. El epitelio fue eliminado mediante digestión con tripsina/EDTA a 37ºC durante 30 minutos bajo agitación y posterior raspado.

4.3. Apariencia macroscópica y manejabilidad.

Se evaluó la apariencia y manejabilidad para uso quirúrgico de todas las membranas preparadas.

4.4. Caracterización mecánica.

Los ensayos mecánicos se llevaron a cabo en el laboratorio del Grupo de Mecánica Estructural y Modelado de Materiales (GEMM) de la Universidad de Zaragoza.

Se evaluó la resistencia mecánica de 5 membranas de PRGF de 100µm, 5 membranas de PRGF 500µm y 5 membranas amnióticas denudadas.

Para determinar las propiedades mecánicas de las muestras se realizaron ensayos uniaxiales de tracción en la máquina de ensayos INSTRON 5848 (Figura 9) con una célula de carga de 5N. La precisión del equipo es 0.0001N en fuerza y de 0.001mm en posición. La velocidad del ensayo fue de 1mm/min. Las muestras se colocaron en un marco de plástico para facilitar su manipulación y transporte. Una vez colocadas en la máquina de ensayo se cortan los laterales del marco de plástico para garantizar que toda la carga es transmitida a través de la muestra.

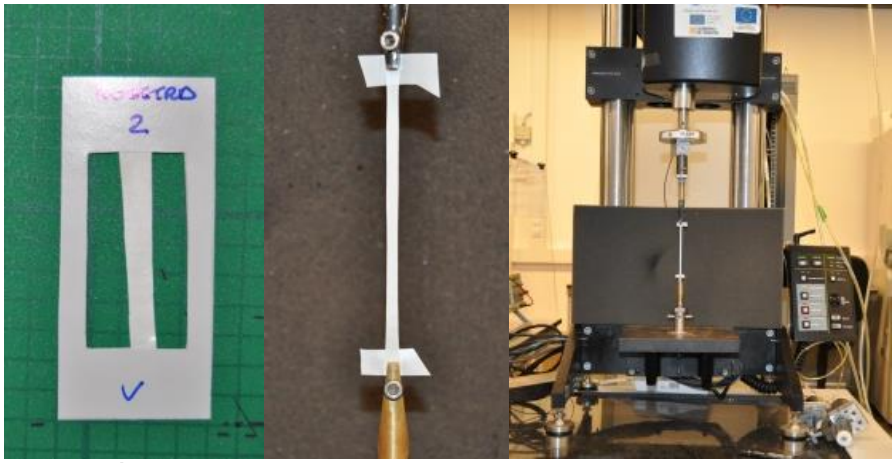

Figura 9. Disposición de las muestras durante el ensayo de resistencia mecánica a la tracción. **A.** Marco de plástico. **B.** Muestra sometida a fuerzas de tracción. **C.** Máquina de ensayos Instron 5848. Imágenes del laboratorio del Grupo de Mecánica Estructural y Modelado de Materiales (GEMM) de la Universidad de Zaragoza.

Los datos de fuerza y desplazamiento obtenidos de la máquina de ensayo de cada muestra se transformaron en valores de tensión y deformación. Se construyó una curva de tensión-deformación que permite homogeneizar los resultados independientemente de las geometrías de las muestras y aportar parámetros característicos de las membranas. También se evaluaron los valores de la tensión a rotura y la deformación a rotura. Una vez obtenidos los valores anteriormente citados de todas las curvas se calculó el promedio y la desviación estándar.

4.5. Ultraestructura.

La ultraestructura de las membranas fue examinada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Las membranas se fijaron con metanol frío a -20ºC durante 10 minutos, posteriormente fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) durante 10 minutos respectivamente y secadas por el método de punto crítico. A continuación se cubrieron con una capa de oro bajo condiciones de vacío y fueron observadas con un microscopio electrónico de barrido JEOL 6610LV (JEOL co., Tokyo, Japan) a un voltaje de aceleración de 20kV.

5. Evaluación la aplicabilidad del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en terapias avanzadas mediante el desarrollo de un método de cultivo de células madre epiteliales limbares totalmente autólogo.

5.1. PRGF como suplemento del medio de cultivo celular.

5.1.1. Preparación de PRGF líquido.

Se extrajo sangre mediante venopunción de 3 voluntarios sanos (rango de edad 27-40 años) previa firma del consentimiento informado, tras la explicación de la naturaleza y posibles consecuencias del estudio.

Las muestras de sangre fueron procesadas según el protocolo descrito en el punto 1.1 usando el kit de oftalmología PRGF Endoret® (BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, España) siendo conservadas a -20ºC hasta su uso como sustituto del FBS en el medio de cultivo celular. La F2 fue alicuotada y congelada a -20ºC hasta su utilización en la realización de membranas según el procedimiento descrito en el apartado 1.2.

5.1.2. Células y método de cultivo.

Las células madre limbares se obtuvieron a partir de 12 anillos esclerocorneales sobrantes de las queratoplastias realizadas en el Instituto Universitario Fernández-Vega (Oviedo, Asturias, España). El rango de edad de los donantes fue de 38-79 años. Todos los anillos fueron mantenidos a 4ºC en medio de mantenimiento Eusol-C (Alchimia, Ponte S.Nicolò, Italy) durante no más de 10 días antes de su utilización para el estudio.

De cada anillo se diseccionó el limbo utilizando microscopio quirúrgico, se cortó y se sembró como explantes de 1-2mm^2 en placas Petri de cultivo celular de 35mm de diámetro con 1ml de cada medio de cultivo, obteniendo de cada donante 5 explantes por grupo. Los cultivos fueron incubados a 37°C, 5% CO_2 y 95% de humedad, cambiando el medio de cultivo dos veces por semana.

Como medio de cultivo se utilizaron los siguientes:

Medio Basal (MB): DMEM/F12 (Life Technologies, CA, USA) suplementado con 100UI/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina (Sigma-Aldrich, MO, USA) y de 10% FBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) **(MBFBS)** o PRGF **(MBPRGF)**.

Medio Clásico (MC): DMEM/F12 (Life Technologies, CA, USA) suplementado con 5µg/ml de insulina, 8,33ng/ml de toxina colérica, 24µg/ml de adenina, 1,3ng/ml de T3, 0,4µg/ml de hidrocortisona, 100UI/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina y 10% de FBS (Sigma-Aldrich, MO, USA) **(MCFBS)** o PRGF **(MCPRGF)**. Estos medios fueron utilizados en los tres primeros días de cultivo, transcurrido este

tiempo se añadieron 10ng/ml de EGF a cada medio (Austral Biologicals, CA, USA).

5.1.3. Proliferación celular.

5.1.3.1. Cuantificación del área de proliferación.

A los 7 días se cuantificó el área de proliferación celular desde el explante. Para ello se realizaron fotografías de dicho área utilizando un microscopio de contraste de fases (Leica DMIL LED) con una cámara incorporada (Leica, Wetzlar, Germany). Posteriormente, se midió el área de crecimiento (mm^2) utilizando el software software ImageJ® (http://rsb.info.nih.gov/ij NIH, Bethesda, MD, USA).

5.1.3.2. Contaje celular.

Tras los 9 días de cultivo las células fueron lavadas con PBS e incubadas en una solución de tripsina y ácido etilendiaminotetraacético 0,25% (EDTA) durante 15 min. Transcurrido ese tiempo se neutralizó la acción de la tripsina-EDTA con medio de cultivo.

La suspensión celular fue centrifugada durante 10 min a 400g, desechando el sobrenadante y resuspendiendo las células en una cantidad de medio de cultivo conocida.

Posteriormente se colocó en una Cámara de Neubauer y se contó el número de células mediante el microscopio de contraste de fases.

5.1.4. Caracterización celular.

5.1.4.1. Análisis morfológico.

Las células fueron examinadas a diario y se tomaron fotografías de los cultivos mediante una cámara EC3 (Leica, Wetzlar, Germany) acoplada al microscopio de contraste de fases Leica DMIL LED (Leica SP2; Wetzlar, Germany).

Los cultivos obtenidos con los distintos medios fueron clasificados de acuerdo a criterios morfológicos. Considerándose óptimos aquellos en que las células presentaban un tamaño pequeño y uniforme con una morfología redondeada u ovalada.

5.1.4.2. Expresión de marcadores.

Tres anillos esclerocorneales fueron procesados de la forma anteriormente descrita y utilizados para la realización de los estudios de inmunohistoquímica. Para ello, los cultivos confluentes fueron fijados con metanol frio durante 10

minutos y lavados con PBS 2 veces durante 5 minutos. Las células fueron permeabilizadas en una solución de Triton X-100 0,3% y lavadas nuevamente en PBS durante 5 minutos. A continuación las muestras fueron incubadas a 4ºC durante toda la noche con anticuerpos primarios de p63-α y CK 3/12 (Millipore, Bedford, MA y Abcam, Cambridge, UK respectivamente) utilizando una dilución 1:100 y suero de cabra 10% como agente bloqueante.

Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario (1:500), lavadas con PBS por tres veces y teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para identificar los núcleos. Se tomaron cinco fotografías (Leica DFC310FX) de campos aleatorios con una magnificación de 200 aumentos.

5.1.4.3. Evaluación de la eficiencia formadora de colonias.

Para la evaluación de la eficiencia formadora de colonias se utilizaron fibroblastos murinos irradiados (3T3), cedidos por el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias (Oviedo, España).

Los 3T3 fueron sembrados en placas de Petri de 35mm de diámetro con una densidad celular de $1x10^5$ células/cm^2 y mantenidos en medio de cultivo (MCFBS) durante 24 horas, lavándose con PBS al final de este periodo.

Posteriormente las células epiteliales limbares en suspensión fueron sembradas por duplicado sobre los 3T3 a una densidad de 1.000 células/cm^2 e incubadas con cada uno de los medios de cultivo estudiados: MBFBS, MBPRGF, MCFBS y MCPRGF durante 12 días a 37ºC, 5% CO_2 y 95% de humedad. El medio de cultivo fue renovado 3 veces a la semana.

Para determinar el número de colonias formadas las células fueron lavadas con PBS, teñidas con rodamina 2% disuelta en paraformaldehído 4% y aclaradas con agua corriente. Se contó el número de colonias obtenidas y se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) mediante la siguiente fórmula:

$$\%UFC = \frac{nº\ de\ colonias}{nº\ de\ células\ sembradas} x\ 100$$

5.2. Membrana de PRGF como matriz para el cultivo y trasplante de células madre epiteliales limbares.

5.2.1. Preparación de la membrana de PRGF.

La preparación de la membrana de PRGF se realizó según lo dispuesto en el apartado 4.1.

5.2.2. Cultivo celular sobre las membranas.

Cuatro anillos corneoesclerales fueron procesados según el procedimiento descrito anteriormente. Una vez confluentes, fueron tripsinizados y cultivados sobre membranas de PRGF con medio de cultivo MBPRGF, a 37ºC, 5%CO_2 y 95% de humedad, cambiándose el medio de cultivo 3 veces a la semana. Los cultivos fueron examinados a diario tomando fotografías mediante una cámara EC3 (Leica, Wetzlar, Germany) acoplada al microscopio de contraste de fases Leica DMIL LED (Leica SP2; Wetzlar, Germany). Así mismo se estudiaron mediante SEM, según el procedimiento anteriormente descrito.

5.2.3. Expresión de marcadores.

Tras 48 horas los cultivos fueron fijados en metanol durante 10 minutos a -20ºC para el análisis inmunohistoquímico. Se utilizaron anticuerpos frente a p63-α y CK3/12 según lo establecido anteriormente.

5.3. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado según lo expuesto en el apartado 2.8.

RESULTADOS

1. Desarrollo de las formulaciones oftálmicas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento y de los kits necesarios para su elaboración estandarizada.

Fruto del trabajo en colaboración con BTI Biotechnology Institute, S.L. (Vitoria, España) ha surgido un kit cerrado y desechable para la obtención y aplicación oftálmica de PRGF (PRGF-Endoret® kit oftalmología), tanto en forma de colirio como de membrana, que disponen de marcado CE otorgado para dicho uso y cumplen con todos los estándares de calidad exigidos para los medicamentos de uso humano tanto en Europa como en Estados Unidos.

Las distintas versiones del Kit PRGF-Endoret® oftalmología fueron validadas en 3.430 preparaciones de colirio de PRGF a lo largo de 5 años para el tratamiento de diversas patologías de la superficie ocular y córnea (Figura 10).

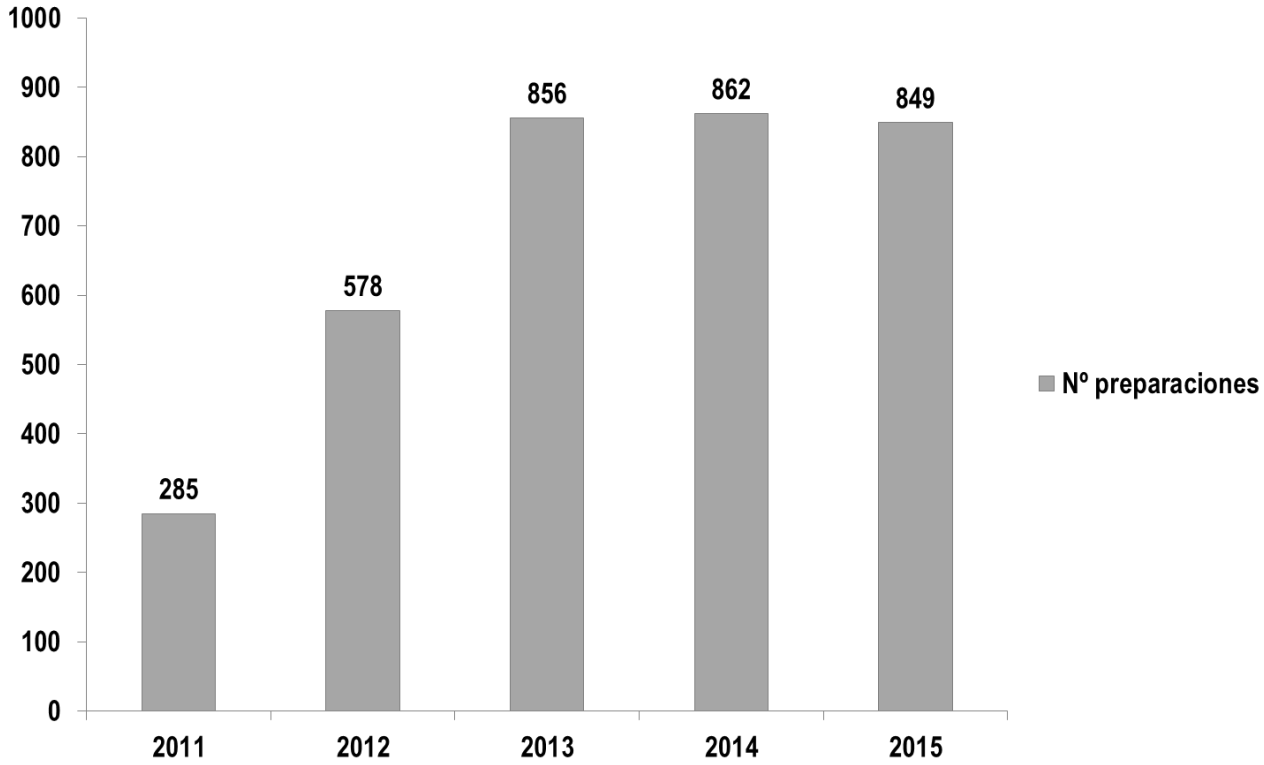

Figura 10. Número de preparaciones de colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento por año.

Se observó crecimiento microbiano en 18 de las preparaciones realizadas (0,5%). Pudiendo clasificarse todos los microorganimos aislados como contaminantes del medio de cultivo no patógenos.

El colirio así obtenido ha mostrado un perfil de seguridad y eficacia adecuado en distintas patologías de la superficie ocular (88, 98).

La membrana de PRGF obtenida según la metodología descrita ha sido aplicada en 15 pacientes para en el tratamiento de diversas patologías en las que se requería regeneración de tejidos oculares. Las indicaciones de la membrana incluyeron causticaciones, defectos epiteliales, úlceras y derretimiento corneal, modulación de la cicatrización en trabeculectomía y cirugía de pterigium y protección de la superficie ocular tras queratoplastias (Figura 11, datos pendientes de publicación).

Figura 11. **A.** Úlcera corneal tórpida de 3 meses de evolución tratada con suero autólogo y agentes regenerativos de la matriz extracelular. **B**. Membrana de PRGF sobre la superficie ocular. **C**. Aspecto de la córnea tras el tratamiento.

En ningún caso se observó contaminación microbiológica, ni ningún otro defecto de calidad en las membranas obtenidas.

2. Caracterización de la composición del Plasma Rico en Factores de Crecimiento y su estabilidad biológica a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación.

2.1. Análisis de la composición.

Las muestras de colirio de PRGF mostraron el doble de concentración de plaquetas que la sangre periférica. Los contajes de plaquetas y leucocitos en sangre periférica y en el colirio de PRGF se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Recuento de plaquetas y leucocitos en sangre periférica y colirio de PRGF.

		Sangre periférica		PRGF		
	Edad	**Plaquetas** ($x10^6$/ml)	**Leucocitos** ($x10^6$/ml)	**Plaquetas** ($x10^6$/ml)	**Leucocitos** ($x10^6$/ml)	**Concentración plaquetaria**
Media±DS	41±12	185±5	6,3±0,5	367±18	0,3±0,1	2,0±0,1
Rango (min-max)	26-59	136-226	3,3-9,4	258-497	0,1-1,0	1,4-3,1

DS: Desviación estándar.

La concentración de factores de crecimiento en el colirio de PRGF fue medida el día de la elaboración y tras 3 (t_3) o 6 meses (t_6) congelado a -20ºC. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 6. Ninguno de los factores de crecimiento medidos muestran un cambio significativo en su concentración durante el periodo de estudio ($p>0,05$). A cada tiempo de estudio (3 y 6 meses) 1 muestra de cada donante fue conservada a 4ºC o TA durante 72 horas. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas ($p>0,05$) en la concentración de factores de crecimiento.

Tabla 6. Concentración de factores de crecimiento en el colirio de PRGF a distintos tiempos y condiciones de conservación.

	PDGF-AB (ng/ml)	**TGF-β1** (ng/ml)	**VEGF** (pg/mL)	**EGF** (pg/ml)	**IGF-1** (ng/ml)	**ANG-1** (ng/ml)	**TSP-1** (ng/ml)
t_0	13,4±4,6	30,8±10,8	215±148	569±141	106±29	29,4±10,8	22,4±9,2
t_3							
-20ºC	15,5±3,6	34,6±6,7	188±87	454±95	111±31	26,8±8,5	19,3±6,0
4ºC	10,6±4,0	31,9±9,4	185±77	474±111	113±31	25,8±7,2	20,2±4,5
TA	14,4±3,0	30,7±7,3	157±59	428±106	123±37	25,8±7,2	21,2±3,8
t_6							
-20C	13,4±4,7	29,7±9,1	251±111	475±113	117±33	30,3±10,9	20,2±5,0
4ºC	11,5±4,4	33,1±13,4	224±122	513±265	118±35	25,2±6,8	20,6±3,8
TA	10,4±3,7	25,4±10,7	191±112	430±126	125±41	24,1±6,5	20,8±3,8

t_0: Día de elaboración. **t_3**: Tras 3 meses a -20ºC. **t_6**: Tras 6 meses a -20ºC. **TA**: Temperatura ambiente. **PDGF**: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. **TGF-β1**: Factor de crecimiento transformante β1. **VEGF**: Factor de crecimiento endotelial vascular. **IGF**: Factor de crecimiento similar a insulina. **ANGF**: Angiopoietina. **TSP**: Trombospondina.

2.2. Efecto sobre la proliferación celular.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el ratio de proliferación de los queratocitos, medido como cantidad de DNA, tras el tratamiento con el colirio de PRGF conservado durante los distintos tiempos y bajo las condiciones de conservación anteriormente definidas (Figura 12). Dichos queratocitos mostraban igualmente una morfología fusiforme similar a la presentada en los cultivos control.

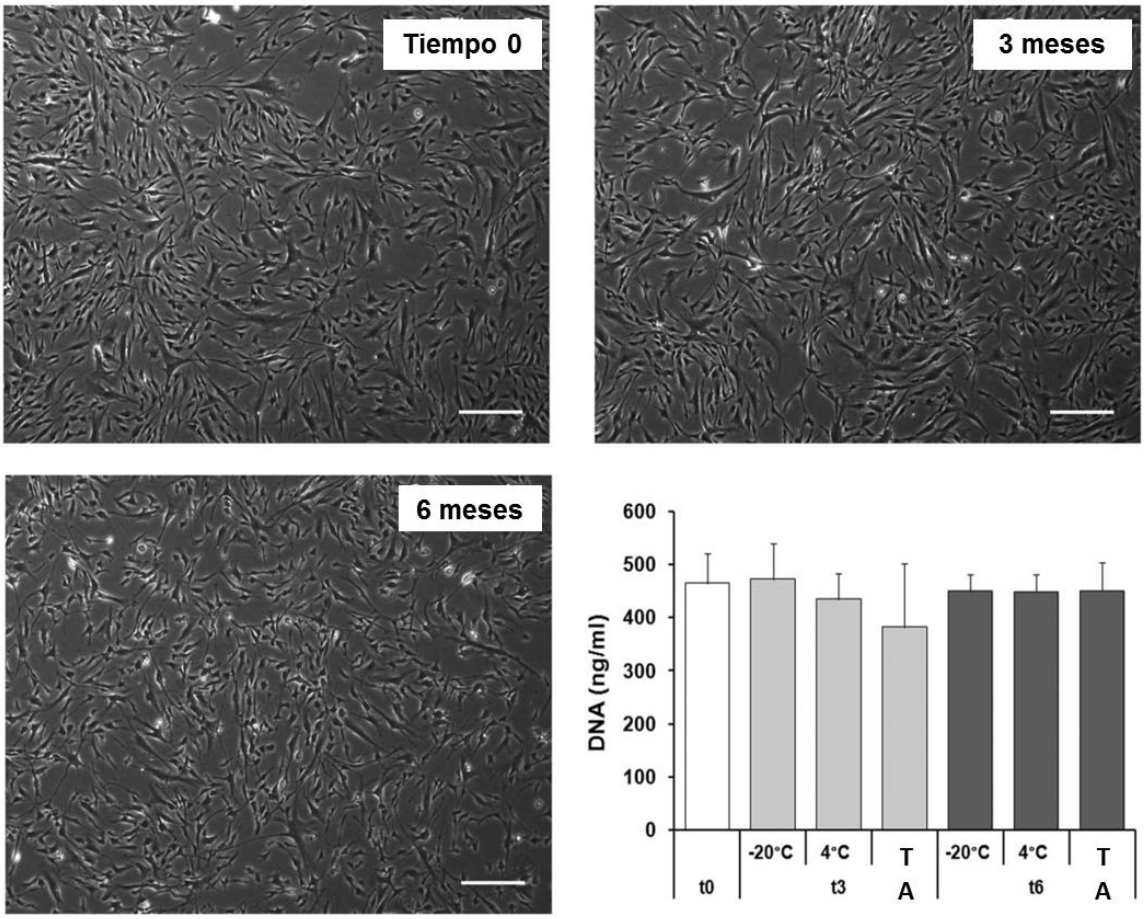

Figura 12. Microfotografía de los queratocitos cultivados con colirio de PRGF recién elaborado (t_0) o conservado 3 y 6 meses (t_3 y t_6) a -20ºC obtenida mediante microscopía de contraste de fases. Línea de escala de 300µm.

2.3. Ensayo de esterilidad.

No se observó crecimiento microbiano en los medios de cultivo enriquecidos tras su incubación durante 14 días.

3. Determinación de efecto biológico del Plasma Rico en Factores de Crecimiento sobre la proliferación, migración y diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos oculares.

3.1. Composición del colirio de PRGF.

El recuento plaquetario y de leucocitos así como la concentración de factores de crecimiento se recogen en la Tabla 7. La concentración de plaquetas en el colirio de PRGF resultó 1,7 veces superior a la medida en suero autólogo. La concentración de todos los factores de crecimiento medidos fue significativamente mayor en el colirio de PRGF respecto al suero autólogo.

Tabla 7. Caracterización del colirio de PRGF y suero autólogo.

	Plaquetas ($x10^6$/ml)	**Leucocitos** ($x10^6$/ml)	**Concentración plaquetaria**	**EGF** (pg/ml)	**PDGF-AB** (ng/ml)	**TGF-β1** (ng/ml)	**VEGF** (pg/ml)	**FGFb** (pg/ml)
PRGF	386	0,1	1,7 x	690±104,1*	14,1±4,9*	25,4±7,2*	81,9±4,2*	9,7±4,7*
Suero autólogo 20%	227	6,4	1,0 x	32,6±15,4	3,3±0,1	6,4±1,7	34,7±13,3	nd

EGF: Factor de crecimiento epidérmico. **PDGF**: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. **TGF-β**: Factor de crecimiento transformante β. **VEGF**: Factor de crecimiento endotelial vascular. **FGF**: Factor de crecimiento de fibroblastos.***** diferencias estadísticamente significativas (p<0,05). **Nd**: No detectable.

3.2. Efecto del colirio de PRGF sobre cultivos celulares de fibroblastos.

3.2.1. Caracterización celular.

Los fibroblastos conjuntivales y los queratocitos estromales cultivados mostraron una morfología fusiforme y alargada. Ambos grupos de células presentaron un fenotipo típico de fibroblastos sin diferenciación espontánea a miofibroblastos, como se confirmó con la expresión de colágeno tipo I, vimentina y fibronectina y la falta de expresión de α-SMA.

3.2.2. Proliferación celular.

La proliferación de ambos tipos celulares se vio aumentada tras el tratamiento con PRGF y suero autólogo 20% comparada con el grupo control (Figura 13). Por otra parte se observaron diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) en la proliferación celular entre los grupos tratados con PRGF y los tratados con suero autólogo (Figura 14).

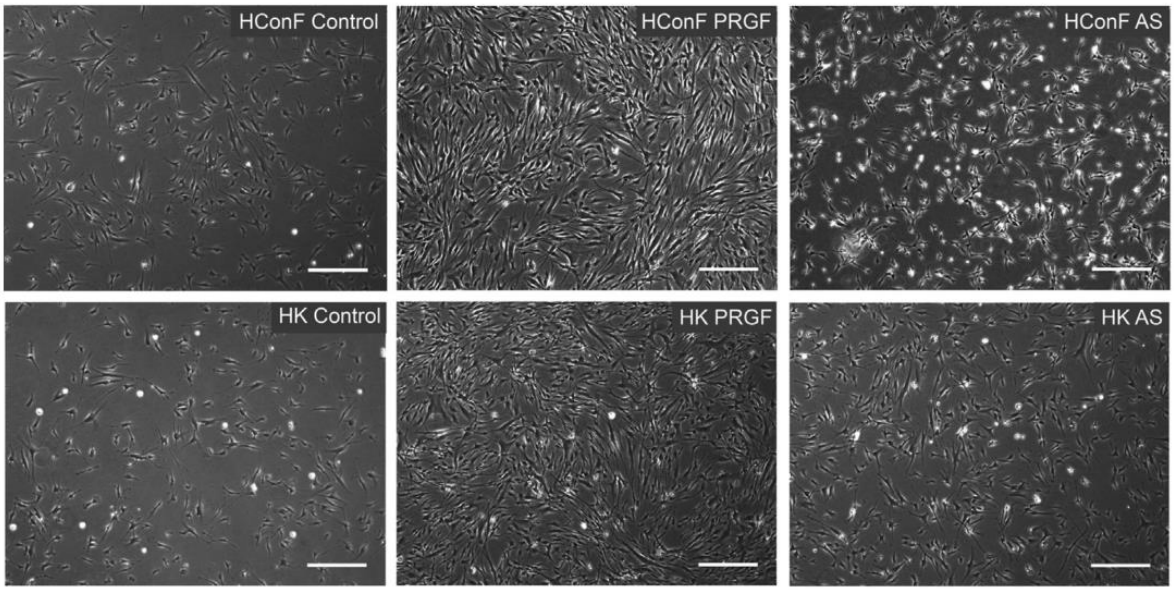

Figura 13. Microfotografías de los cultivos de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) tras 72 horas en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control obtenidas mediante microscopía de contraste de fases. Barra de escala de 400µm.

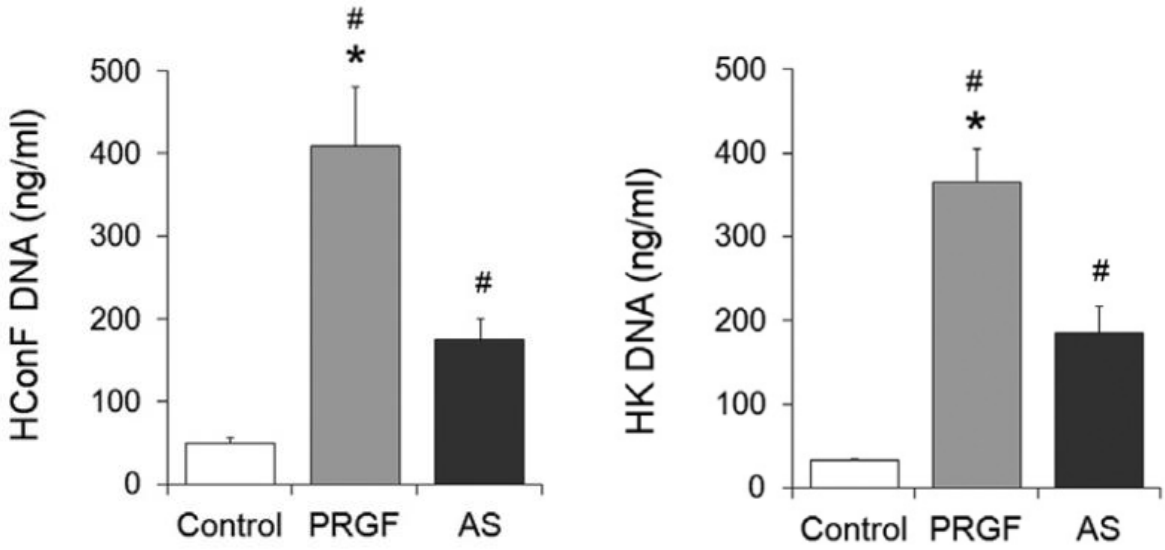

Figura 14. Cuantificación de la proliferación celular mediante determinación de DNA de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo 20% (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control. * Diferencias estadísticamente significativas entre PRGF y AS ($p<0,05$). # Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p<0,05$).

3.2.3. Migración celular.

El tratamiento con PRGF 20% aumenta significativamente la capacidad de proliferación celular tanto en los fibroblastos conjuntivales como en los queratocitos estromales comparado con el suero autólogo 20% ($p<0,05$). El

número de células migratorias resultó significativamente mayor en los cultivos suplementados con PRGF o suero autólogo que en aquellos suplementados con FBS (Figuras 15 y 16).

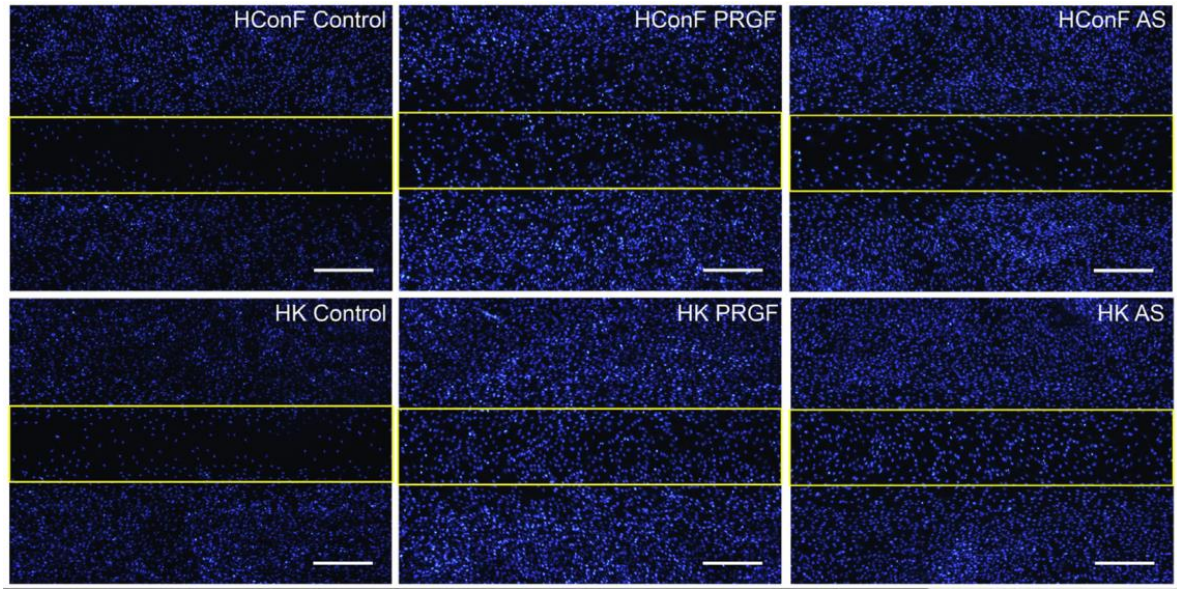

Figura 15. Microfotografías de la proliferación de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) tras 72 horas en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control. Obtenidas mediante inmunofluorescencia Hoechst. Barra de escala de 400µm.

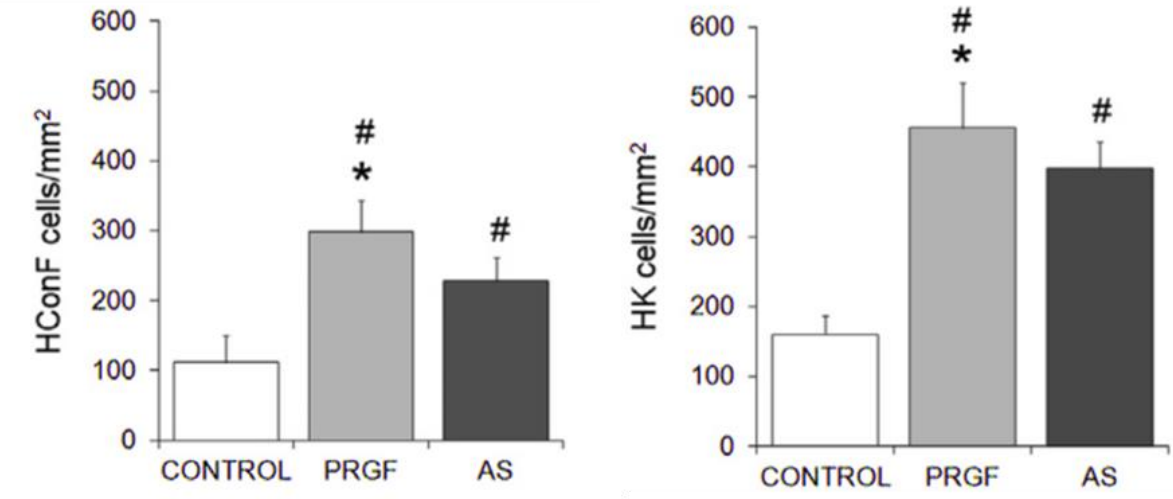

Figura 16. Cuantificación de la migración celular, como número de células por mm^2, de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control.*****Diferencias estadísticamente significativas entre PRGF y AS ($p<0,05$). # Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p<0,05$).

3.2.4. Diferenciación a miofibroblastos.

3.2.4.1. Protección frente a la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1.

Tras 3 días de exposición a 2,5ng/ml de TGF-β1 las células mostraron una menor proliferación en el grupo tratado con TGF-β1 en comparación con aquellas tratadas simultáneamente con PRGF o suero autólogo ($p<0,05$), siendo además la proliferación en las células expuestas a PRGF significativamente mayor que en las expuestas a suero autólogo ($p<0,05$).

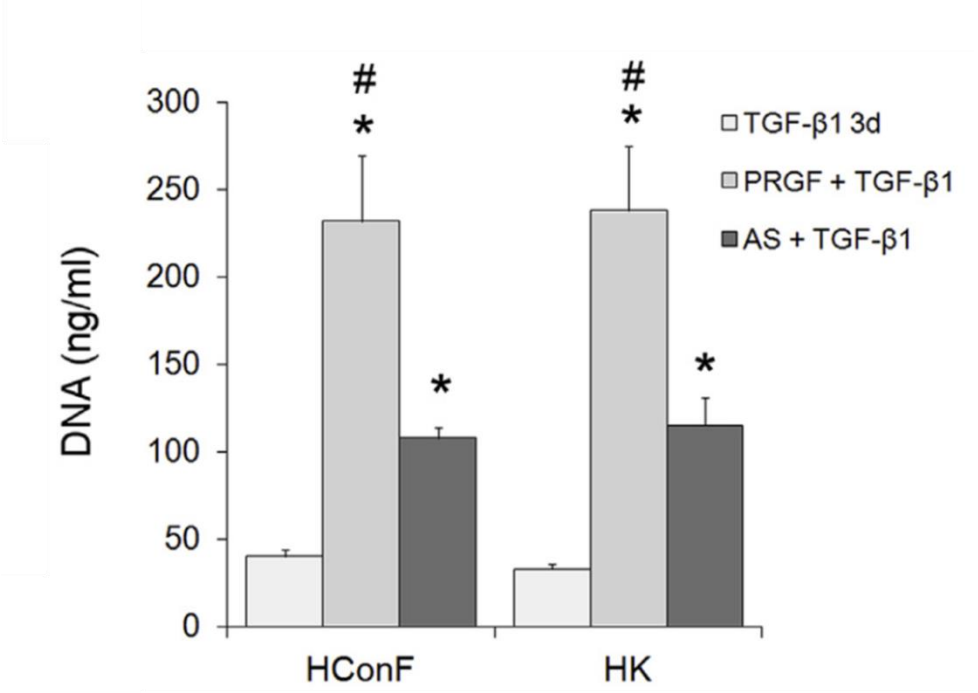

Figura 17. Cuantificación de la proliferación celular, mediante determinación de DNA, en los ensayos de protección frente a la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1 de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) tras 3 días de cultivo en medio suplementado con 2,5ng/ml de TGF-β1 solo o en combinación con PRGF o suero autólogo 20% (AS). *****Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 y TGF-β1 + PRGF o AS ($p<0,05$). #Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 + PRGF y TGF-β1 AS ($p<0,05$).

Los resultados de inmunofluorescencia muestran que la expresión de α-SMA en queratocitos estromales y fibroblastos conjuntivales tratados durante 3 días con 2,5ng/ml de TGF-β1+ 20% PRGF fue menor que en aquellos tratados con 2,5ng/ml de TGF-β1+ 20% AS. Se observa también una mayor expresión del marcador de proliferación celular Ki-67 (Figura 18).

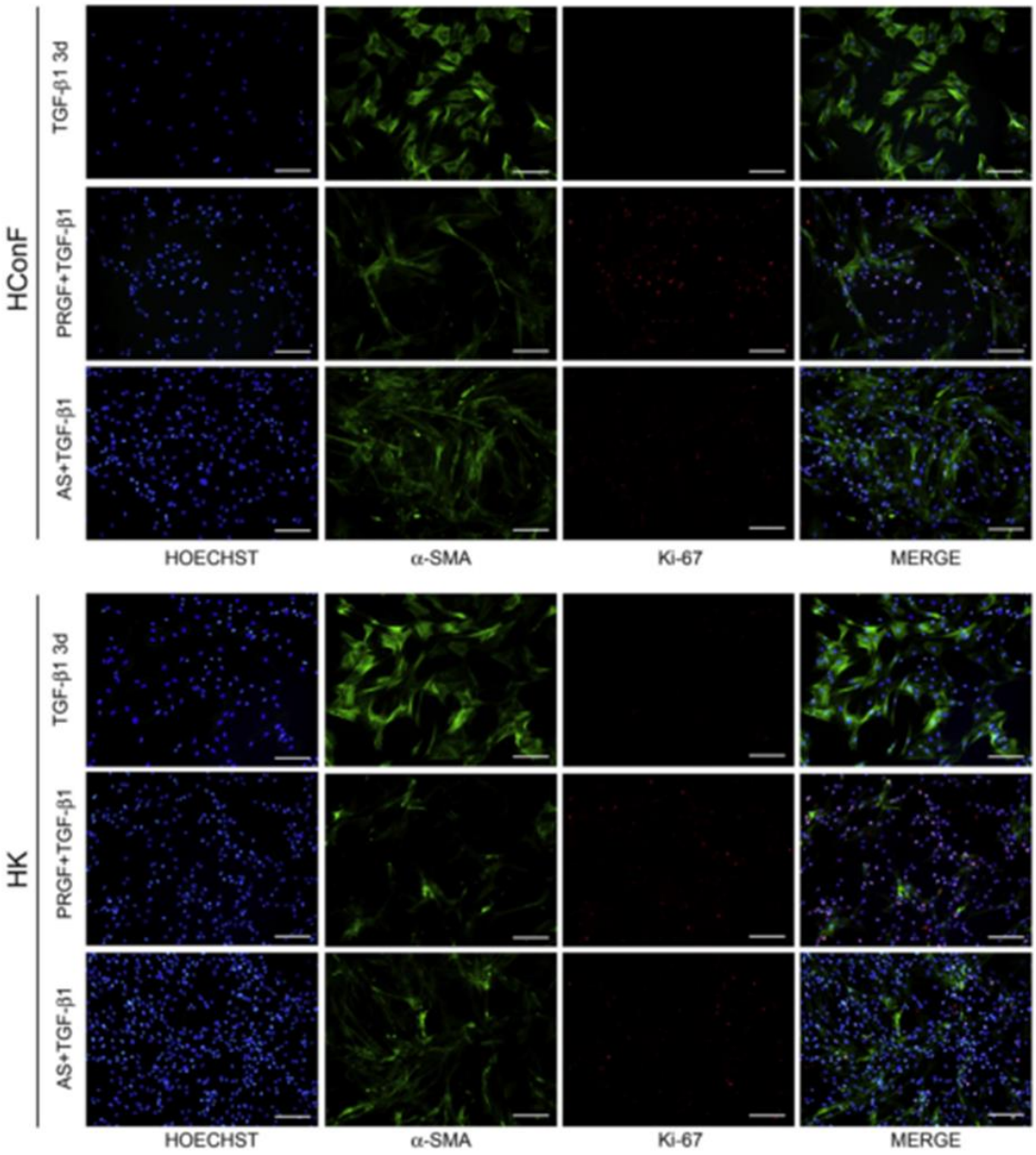

Figura 18. Microfotografías de la expresión de α actina de músculo liso (α-SMA) y Ki-67 en cultivos de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) obtenidas mediante técnicas de inmunoflorescencia en los ensayos de diferenciación a miofibroblastos. Barra de escala de 200µm.

Como se muestra en la Figura 19 los fibroblastos conjuntivales y los queratocitos estromales tratados con 2,5ng/ml de TGF-β1 y 20% de suero autólogo mostraron una mayor expresión de los marcadores de fibrosis α-SMA, desmina y vimentina en comparación con aquellos tratados con 2,5ng/ml de TGF-β1 y 20% de PRGF.

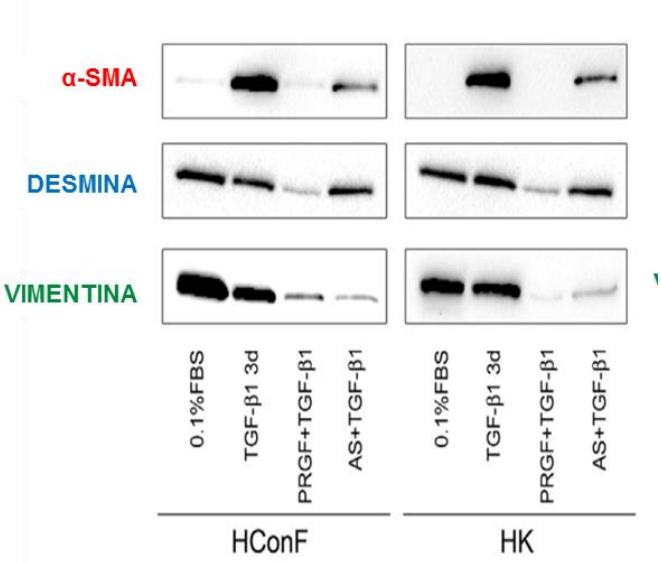

Figura 19. Análisis de la expresión mediante western blot de alfa actina (α-SMA), desmina y vimetina en cultivos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK) tras 3 días de cultivo en medio suplementado con 0,1% de suero bovino fetal (FBS) o 2,5ng/ml de TGF-β1 solo o en combinación con PRGF o suero autólogo 20% (AS).

Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas en el caso de α-SMA y desmina; Las células tratadas con PRGF mostraron una expresión de estas proteínas similar a las células control, no expuestas a TGF-β1, existiendo diferencias estadísticamente significativas con el grupo tratado únicamente con TGF-β1 (Figura 20).

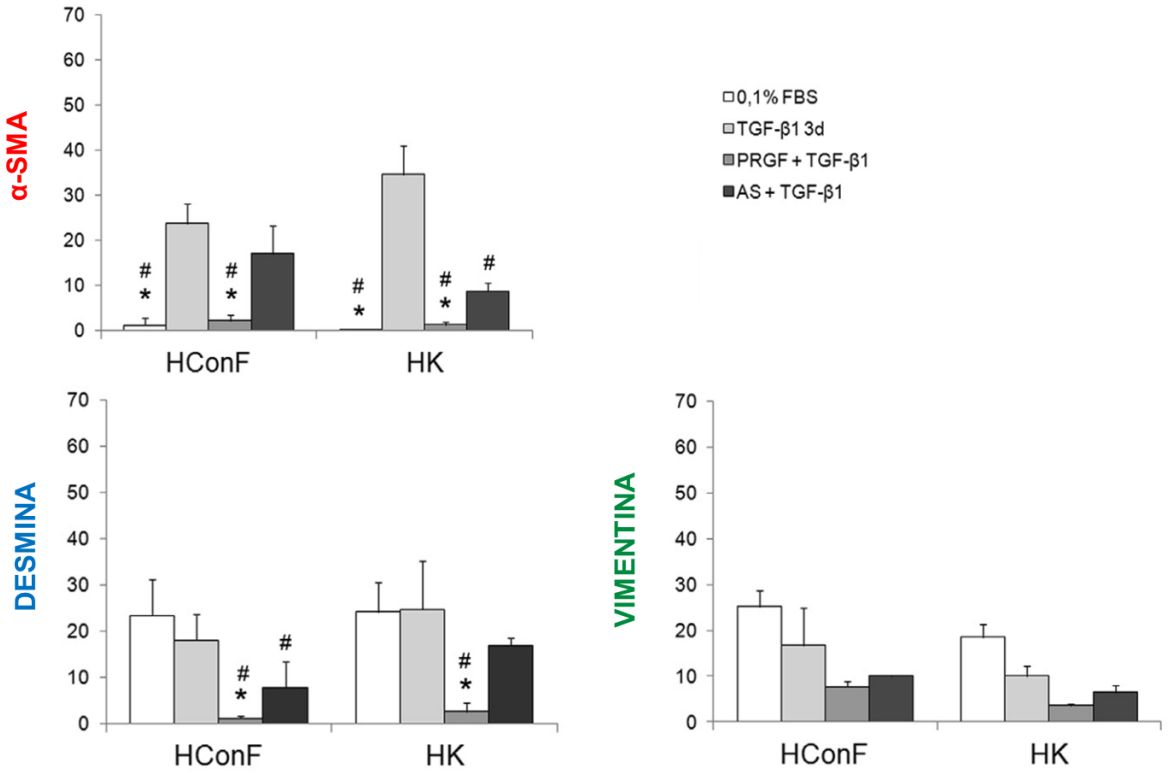

Figura 20. Cuantificación de la expresión de alfa actina (α-SMA), desmina y vimentina en cultivos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK) tras 3 días de cultivo en medio suplementado con 0,1% de suero bovino fetal (FBS) o 2,5ng/ml de TGF-β1 solo o en combinación con PRGF o suero autólogo (AS) 20%. *Diferencias estadísticamente significativas respecto a AS+TGF-β1 ($p<0,05$). #Diferencias estadísticamente significativas respecto a TGF-β1 3d ($p<0,05$).

3.2.4.2. Reversión de la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β.

En los experimentos diseñados para valorar la capacidad de revertir la diferenciación a miofibroblastos las células fueron tratadas con TGF-β1 durante 72 horas y posteriormente con TGF-β1 solo, TGF-β1 y PRGF o TGF-β1 y suero autólogo (Figura 21). El grupo de TGF-β1 y PRGF mostró la mayor proliferación, medida como cantidad de DNA, existiendo diferencias estadísticamente significativas respecto a las células tratadas con TGF-β1 y suero autólogo en la proliferación de los fibroblastos conjuntivales ($p<0,05$).

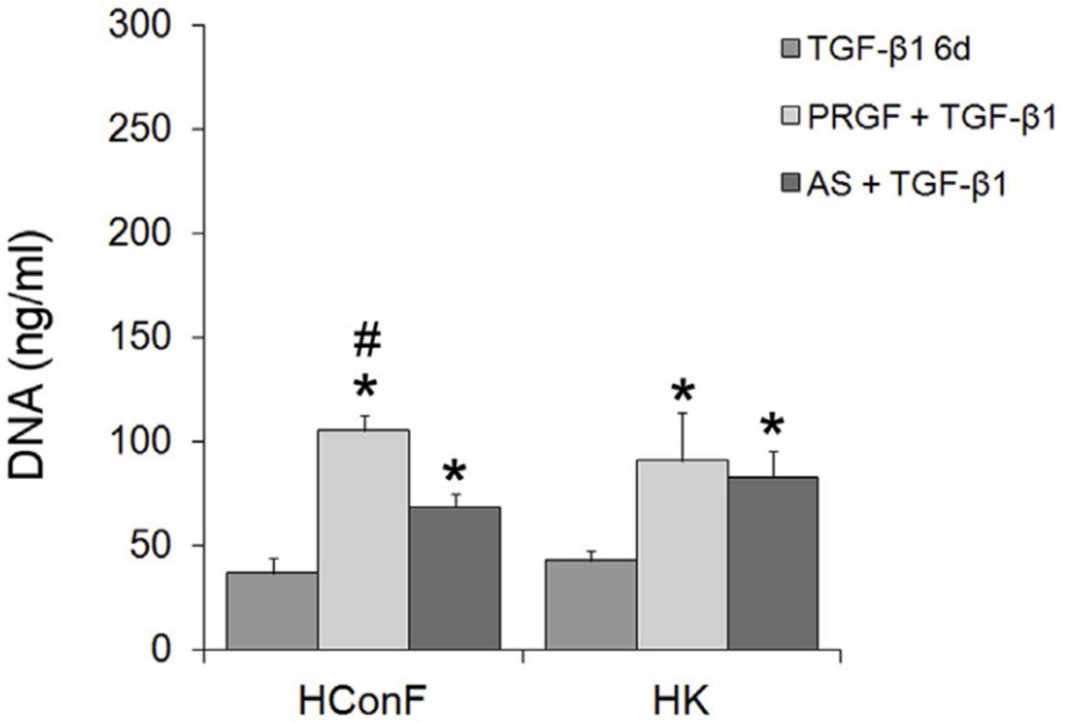

Figura 21. Cuantificación de la proliferación celular, mediante determinación de DNA, en los ensayos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) *Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 y TGF-β1 + PRGF o TGF-β1 + AS ($p<0,05$). #Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 + PRGF y TGF-β1 AS ($p<0,05$).

En los experimentos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos tras la exposición de las células a TGF-β1 2,5ng/ml durante 72 horas todas las células resultaron positivas para la expresión de α-SMA. Posteriormente, tras otras 72 horas bajo tratamiento con 2,5ng/ml de TGF-β1 y 20% de PRGF o suero autólogo esta expresión se vio reducida especialmente en el grupo de PRGF. Por otro lado la proliferación, medida como expresión de Ki-67 fue mayor en los grupos tratados con derivados hemáticos.

En la evaluación del potencial para revertir la diferenciación a miofibroblastos inducida mediante exposición TGF-β1 durante 3 días se observó una disminución en la expresión de α-SMA tras el tratamiento con ambos derivados hemáticos (Figura 22). La expresión de los marcadores de fibrosis en los dos tipos celulares resultó mayor en los cultivos de suero autólogo que en los de PRGF. Es más, la expresión de α-SMA y desmina resultó significativamente menor en el grupo del PRGF que en el del suero autólogo (Figura 23).

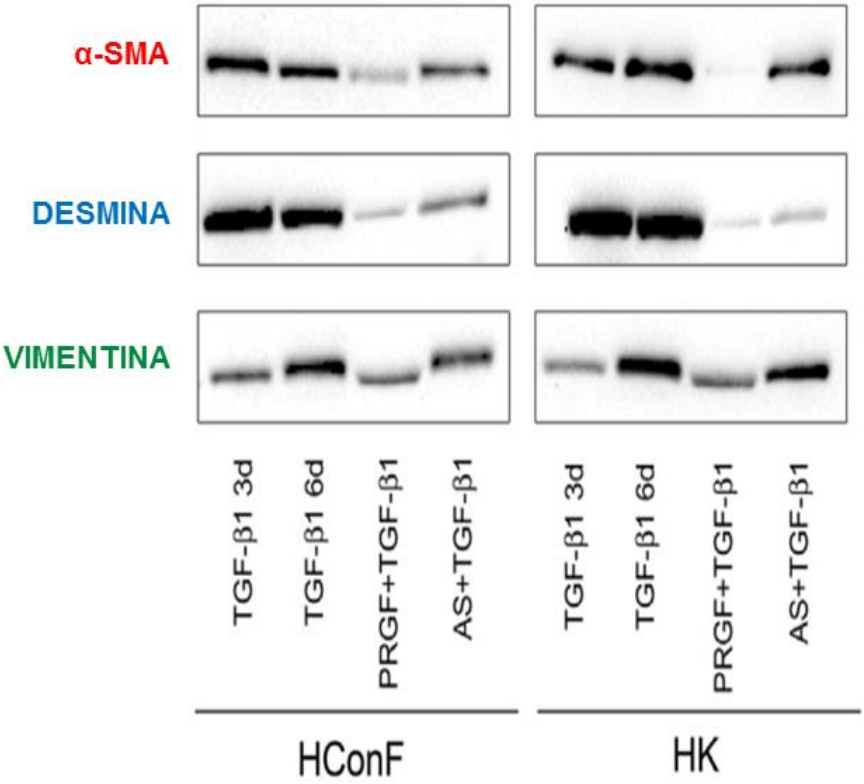

Figura 22. Análisis de la expresión mediante western blot de alfa actina (α-SMA), desmina y vimetina en los ensayos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK).

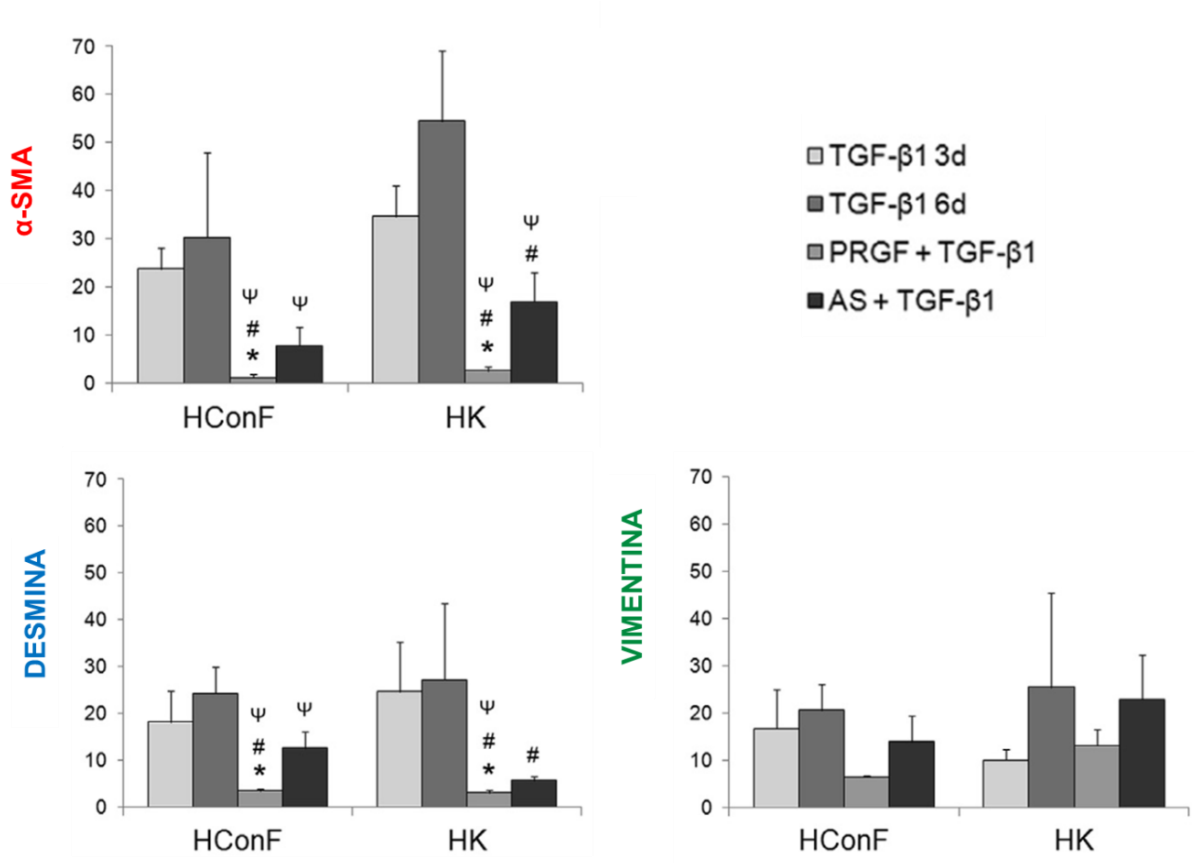

Figura 23. Cuantificación de la expresión de alfa actina (α-SMA), desmina y vimetina en los ensayos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK) tras 3 días de cultivo con medio suplementado con 2,5ng/ml de TGF-β1 y posteriormente con PRGF o suero autólogo (AS) 20%. ***** Diferencias estadísticamente significativas respecto a AS+TGF-β1 ($p<0,05$). # Diferencias estadísticamente significativas respecto a TGF-β1 3d ($p<0,05$). ¥ Diferencias estadísticamente significativas respecto a 2,5ng/ml 6 días ($p<0,05$).

4. Caracterización de la membrana de Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

4.1. Apariencia y manejabilidad

Las membranas de 100 y 500µm de espesor obtenidas presentaron una manejabilidad adecuada para el uso quirúrgico (Figura 24).

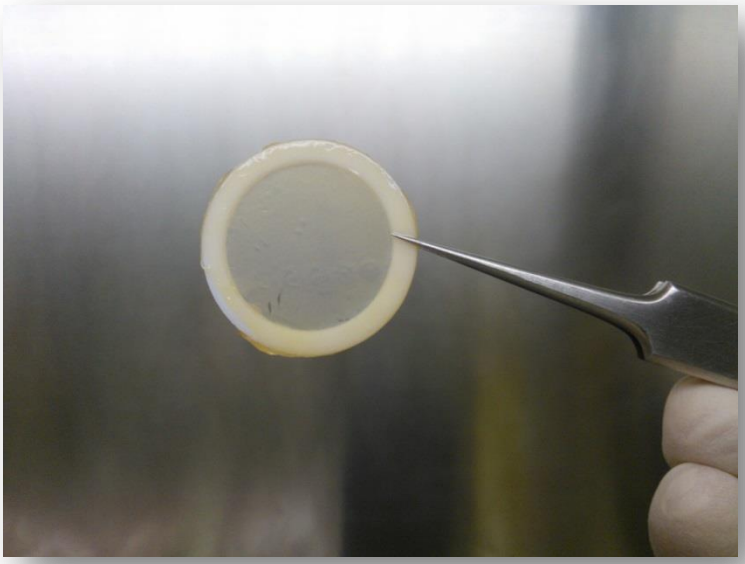

Figura 24. Imagen macroscópica de una membrana de PRGF de 100µm.

4.2. Caracterización mecánica.

En los ensayo de resistencia mecánica a la tracción la carga máxima que soportaron las membranas de PRGF de 100 y 500µm fue de 0,1±0,03 y 0,09±0,04N respectivamente. La AM soportó una carga de 0,81±0,36N (Figura 25).

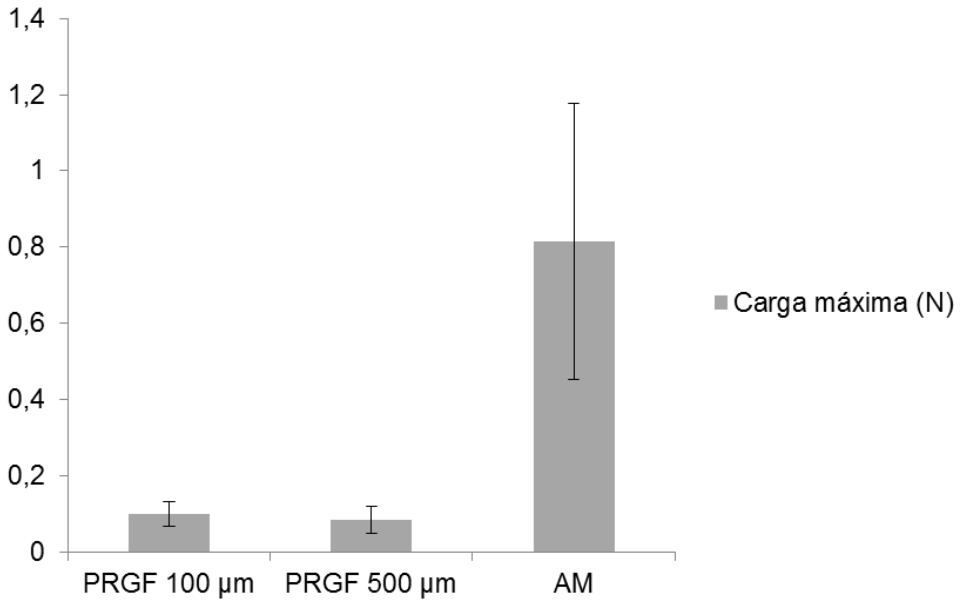

Figura 25. Resultados de carga máxima (N) de la membrana amniótica (AM) y las membranas de PRGF de 100 y 500µm.

La tensión máxima media resultó de 2,75±1,14Mpa en la AM, 0,25±0,05Mpa en la membrana de PRGF de 100µm y de 0,05±0,009Mpa en la de 500µm (Figura 26).

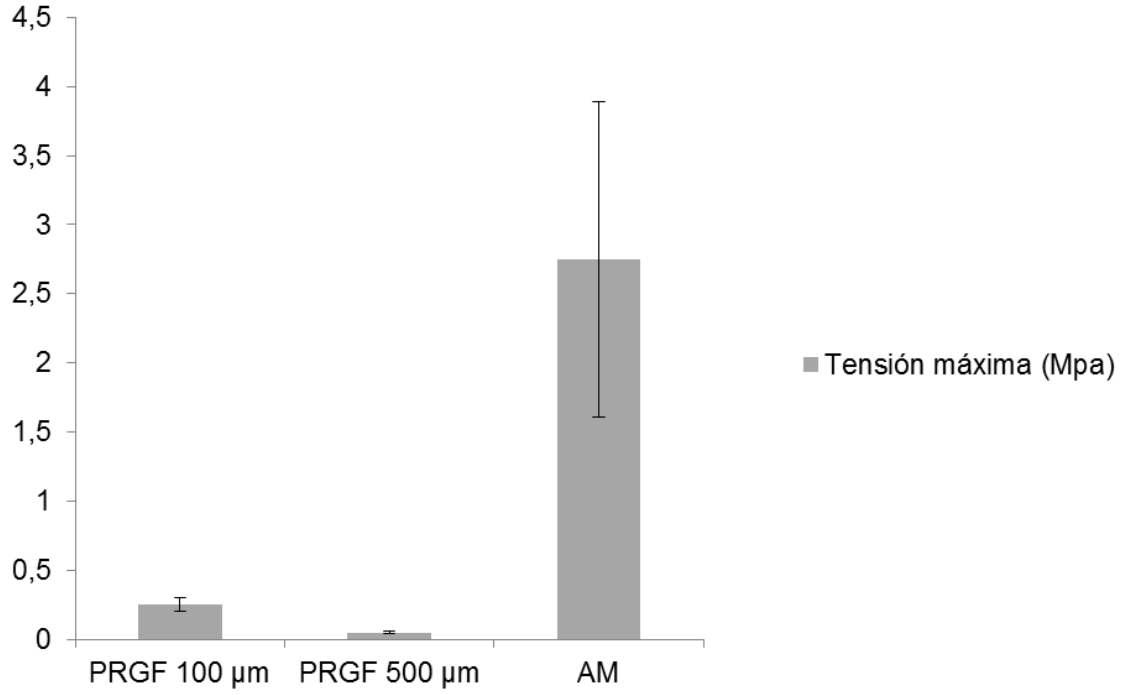

Figura 26. Resultados de tensión máxima (Mpa) de la membrana amniótica (AM) y las membranas de PRGF de 100 y 500µm.

La deformación máxima en la MA resultó de 0,5±0,5 y en las membranas de PRGF fue de 1,1±0,38 de 100µm y de 0,92±0,21 en las de 500µm (Figura 27).

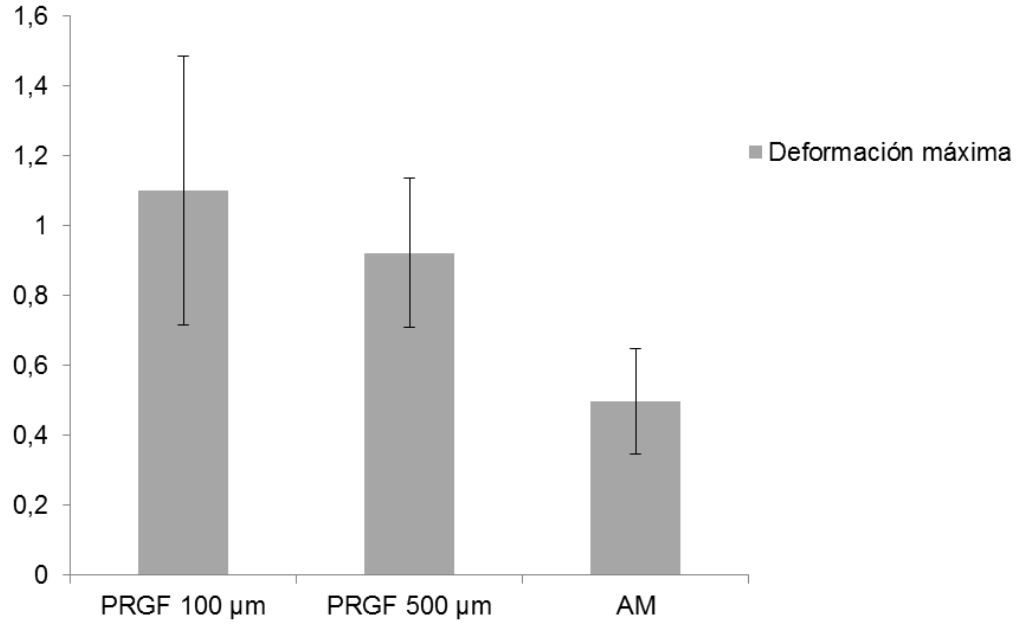

Figura 27. Resultados de deformación máxima de la membrana amniótica (AM) y de las membranas de PRGF de 100 y 500µm.

La rigidez o Módulo de Young obtenido para la AM fue de 0,056±0,023 y de 0,085±0,055 y de 0,016±0,006 para las membranas de PRGF de 100 y 500µm respectivamente (Figura 28).

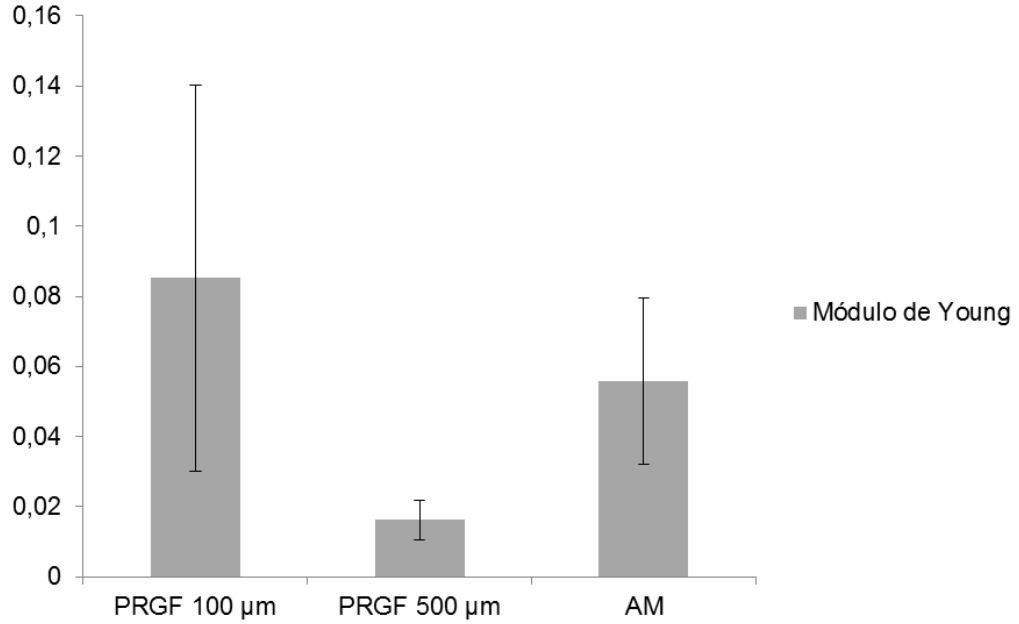

Figura 28. Módulo de Young de la membrana amniótica (AM) y las membranas de PRGF de 100 y 500µm.

4.3. Ultraestructura.

Las imágenes de SEM muestran que las membranas poseen una ultraestructura fibrilar, adecuada para la adhesión y proliferación celular (Figuras 29 y 30).

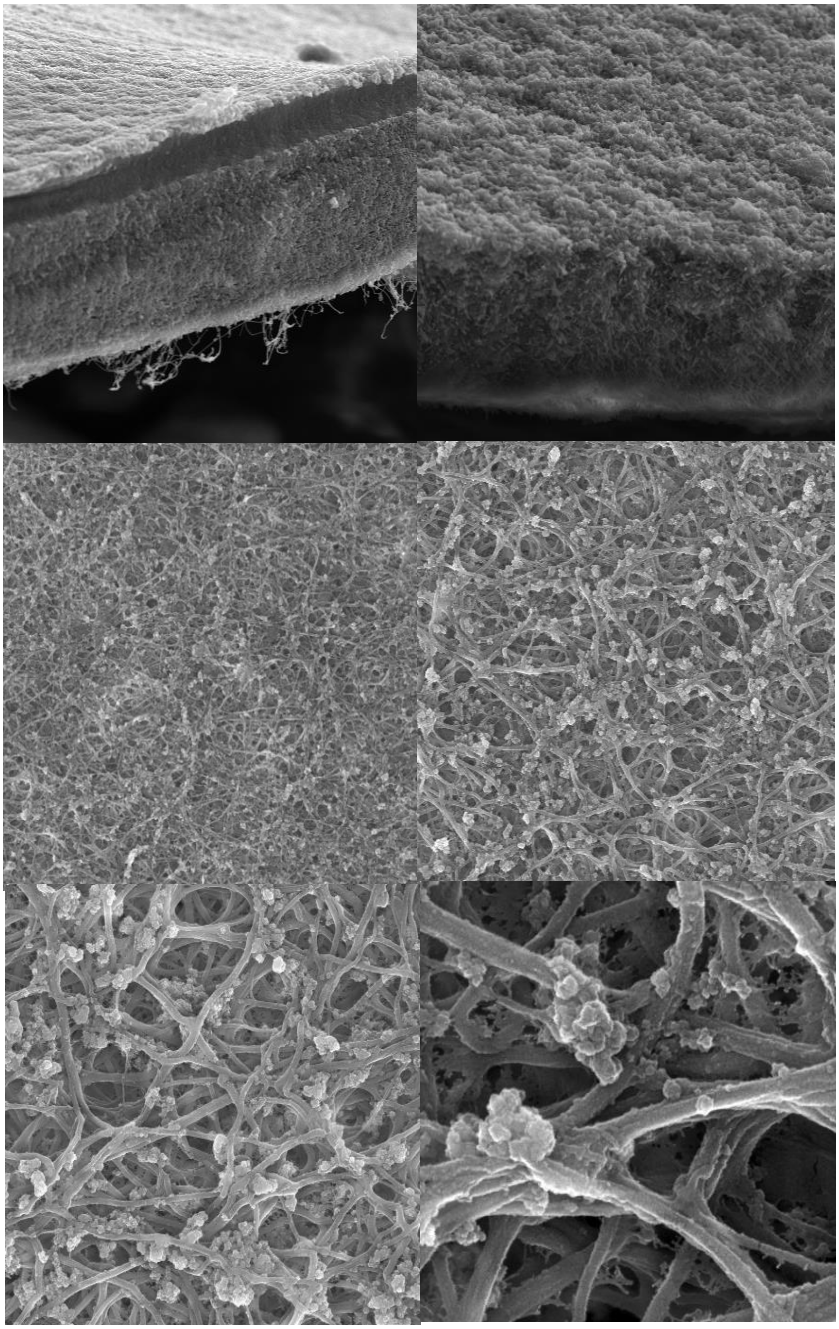

Figura 29. Imágenes de la ultraestructura de las membranas de PRGF obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (1.600x,3.000x, 3.000x, 6.000x,12.000x y 50.000x).

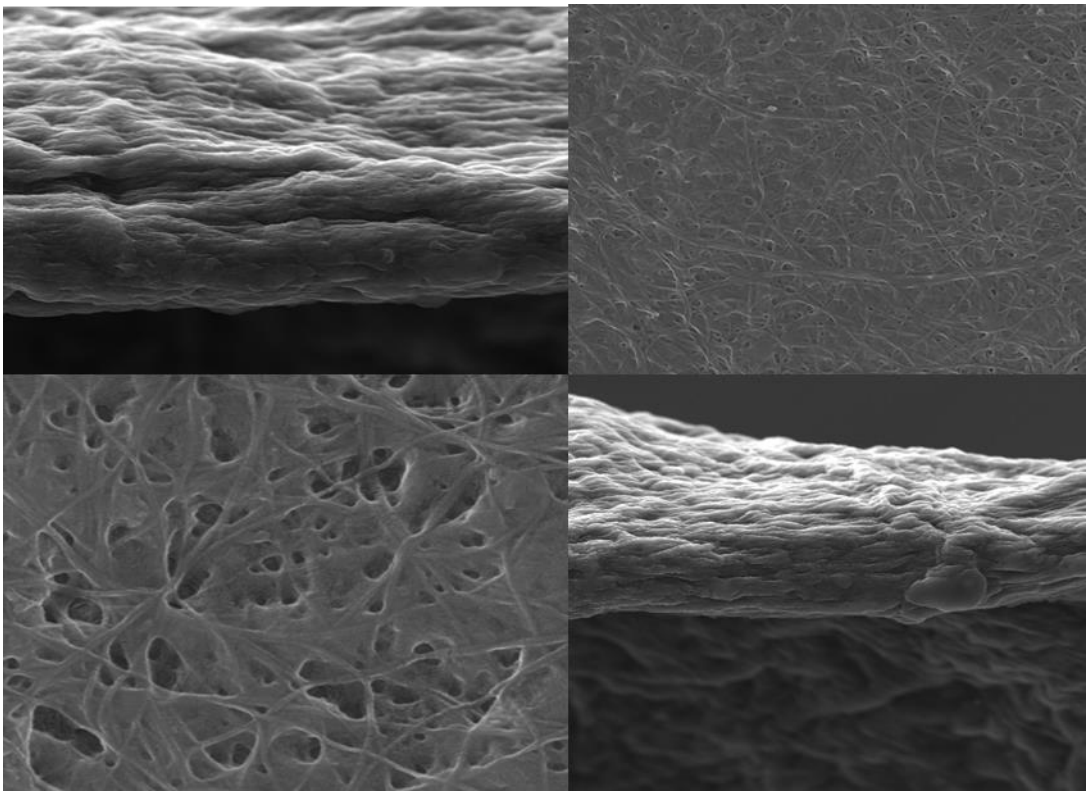

Figura 30. Imágenes de la ultraestructura de la membrana amniótica obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (1.600x, 3.000x, 6.000x y 1.600x).

5. Evaluación la aplicabilidad del Plasma Rico en Factores de Crecimiento en terapias avanzadas mediante el desarrollo de un método de cultivo de células madre epiteliales limbares totalmente autólogo.

5.1. PRGF como suplemento del medio de cultivo celular.

5.1.1. Proliferación celular.

5.1.1.1. Cuantificación del área de crecimiento.

El análisis del área de crecimiento celular desde el explante de limbo (Figura 31), ha mostrado diferencias estadísticamente muy significativas ($p<0,01$) entre los medios de cultivo MC y MB tanto en el grupo de PRGF como en el de FBS. Por otro lado, los cultivos tanto en MC como en MB suplementados con PRGF presentaron un mayor área de crecimiento ($122,97\pm17,14mm^2$ y $89,79\pm15,24mm^2$ respectivamente) que los suplementados con FBS ($77,91\pm12,3mm^2$ y $46,89\pm10,44mm^2$ respectivamente) observándose diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en el MC y estadísticamente muy significativas ($p<0,01$) en el MB (Figura 32). Cabe destacar que el área de proliferación de las células limbares en el MB-PRGF es mayor que en el MC-FBS, aunque no se alcanza la significación estadística, probablemente por el bajo tamaño muestral.

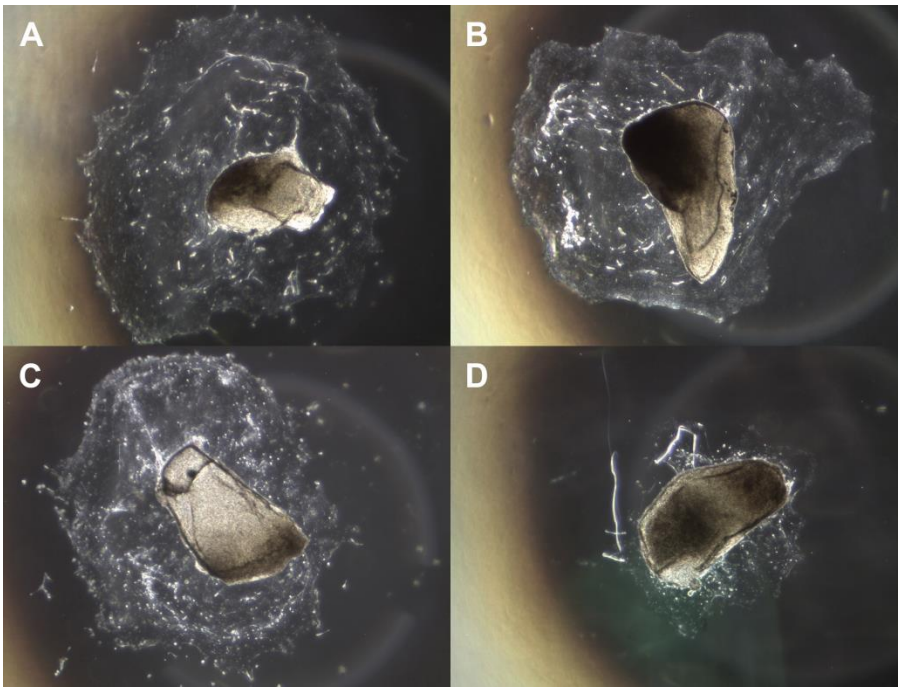

Figura 31. Microfotografía representativa del área de crecimiento celular a partir de los explantes de limbo tras 7 días de cultivo en medio de cultivo completo (A) y basal (B) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento y en medio completo (C) y basal (D) suplementados con suero bovino fetal. Obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 40 aumentos.

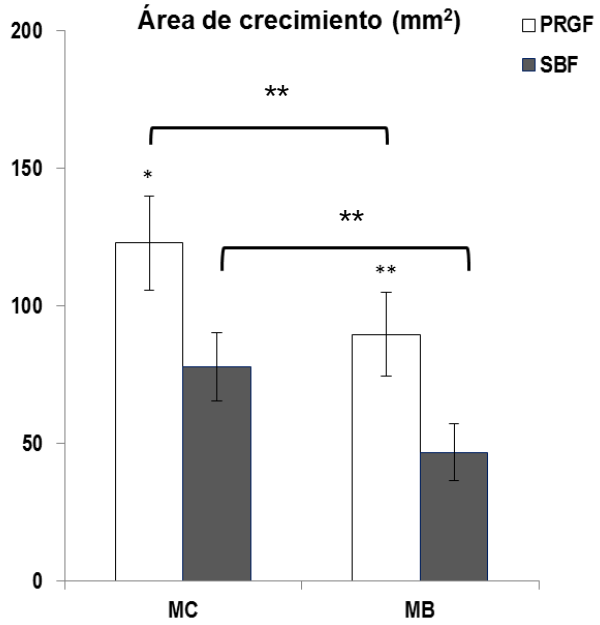

Figura 32. Área de crecimiento (mm^2) a partir de los explantes de limbo esclerocorneal en medio de cultivo completo (MC) y medio de cultivo basal (MB) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) o suero bovino fetal (FBS).* p<0,05, **p<0,01.

5.1.1.2. Contaje celular.

Por otro lado, tras 9 días de cultivo en ambos grupos (MC y MB) se obtiene un número de células similar, observándose sin embargo diferencias estadísticamente significativas (p<0,05) entre los grupos suplementados con PRGF y los suplementados con FBS (Figura 33) tanto en el MC (84.464±15.089 y 46.116±6.895 células) como en el MB (78.214±14.395 y 38.839±7.418 células).

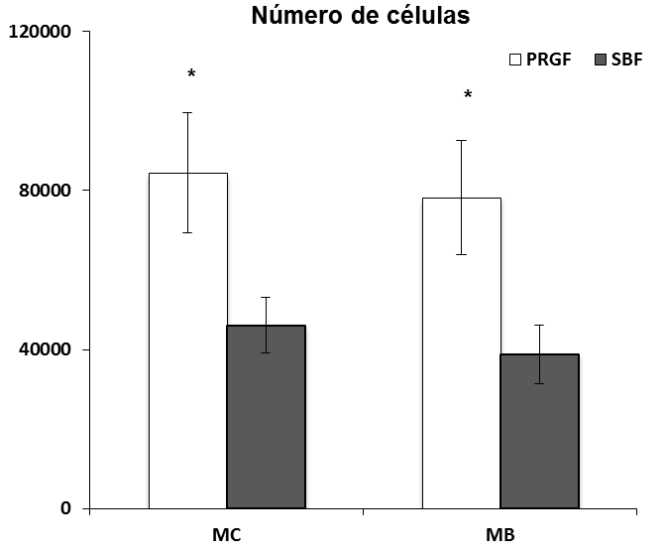

Figura 33. Número de células en los medios de cultivo completo (MC) y basal (MB) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) o suero bovino fetal (FBS).* p<0,05.

5.1.2. Caracterización celular.

5.1.2.1. Análisis morfológico.

El análisis morfológico mediante microscopía de contraste de fases mostró en los cultivos suplementados con PRGF células más homogéneas, pequeñas, ovoides o redondeas con apariencia adoquinada mientras que en los suplementados con FBS las células resultaron más grandes, alargadas y heterogéneas (Figura 34).

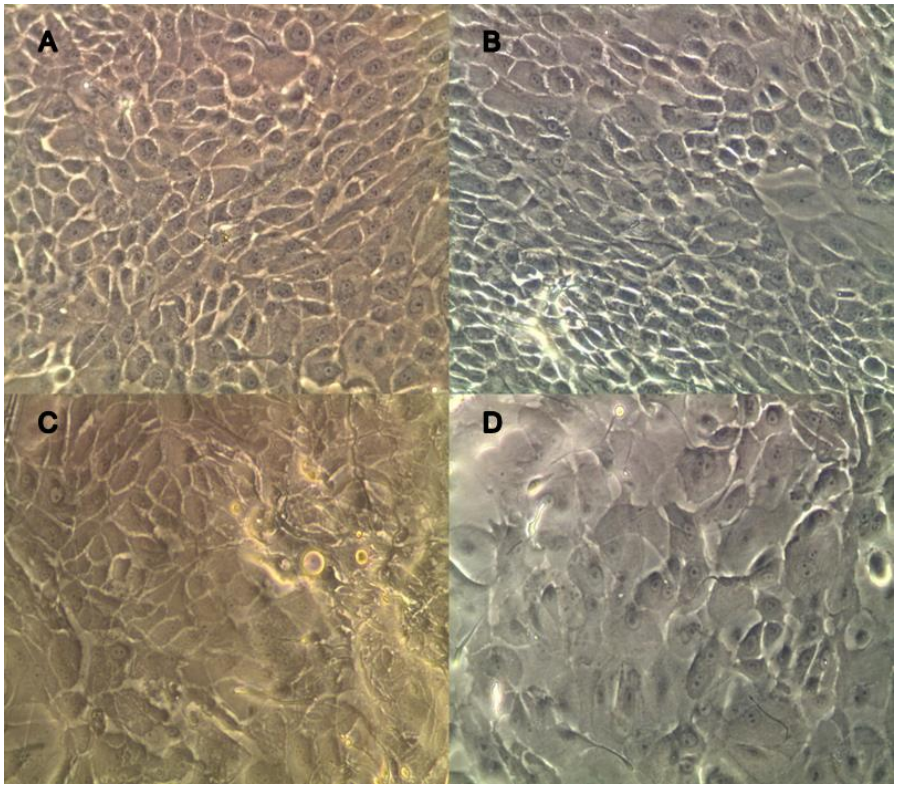

Figura 34. Microfotografía representativa de los cultivos de células epiteliales limbares en medio de cultivo completo (A) y basal (B) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento y en medio completo (C) y basal (D) suplementados con suero bovino fetal. Obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 10 aumentos.

Clasificando los cultivos de acuerdo a los criterios morfológicos anteriormente descritos (Figura 35), se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de cultivos que presentan una morfología óptima suplementados con PRGF (56,8%) y los suplementados FBS (28,9%), tanto en MC como en MB, con un *odds ratio* de 4,62 y 2,25 respectivamente. Más aún, los cultivos realizados en MBPRGF muestran un *odds ratio* de 3,08 comparándolos con los cultivos realizados en MCFBS (Tabla 5).

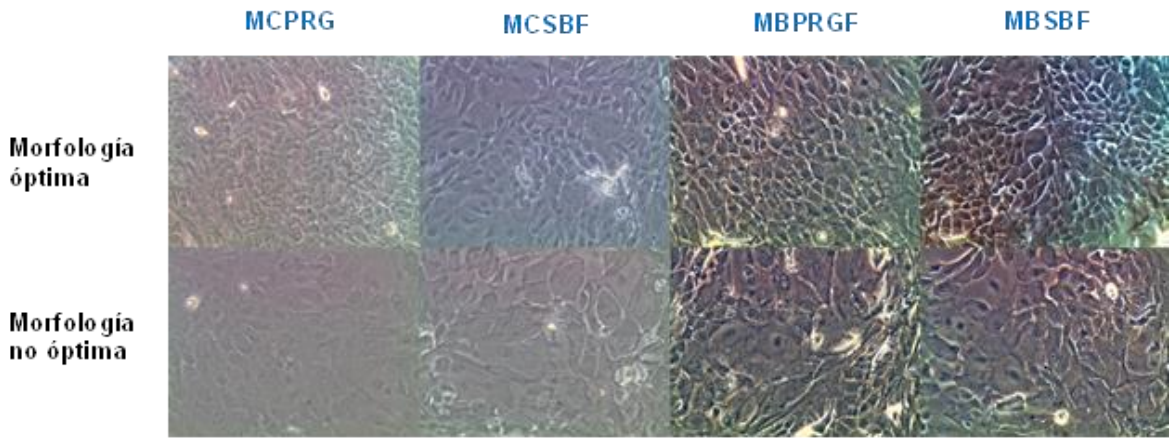

Figura 35. Microfotografía representativa de la clasificación de los cultivos según griteríos morfológicos. Obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 10 aumentos. **MC**: Medio completo. **MB**: Medio basal. **PRGF**: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. **FBS**: Suero bovino fetal.

Tabla 5**.** Tablas de contingencia de los diferentes cultivos clasificados según criterios morfológicos.

	MCPRGF (n=60)	**MCFBS** (n=62)	**p valor**	**OR**
Morfología óptima	37	16	<0,001	4,62
Morfología no óptima	23	46		0,21

	MBPRGF (n=58)	**MBFBS** (n=59)	**p valor**	**OR**
Morfología óptima	30	19	<0,05	2,25
Morfología no óptima	28	40		0,44

	PRGF (n=118)	**FBS** (n=121)	**p valor**	**OR**
Morfología óptima	67	35	<0,001	3,22
Morfología no óptima	51	86		0,31

	MBPRGF (n=58)	**MCFBS** (n=62)	**p valor**	**OR**
Morfología óptima	30	16	<0,01	3,08
Morfología no óptima	28	46		0,32

MC: Medio completo. **MB**: Medio basal. **PRGF**: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. **FBS**: Suero bovino fetal. **OR**: Odds ratio.

5.1.3. Expresión de marcadores.

El patrón de expresión de marcadores de las células en los distintos medios de cultivo se muestra en la Figura 36. La expresión de p63-α, propio de células indiferenciadas, es marcadamente superior en el MCPRGF, mientras que la

expresión de CK3 y 12, características de epitelio corneal diferenciado sólo se aprecia de forma evidente en las células cultivadas en MBSBF.

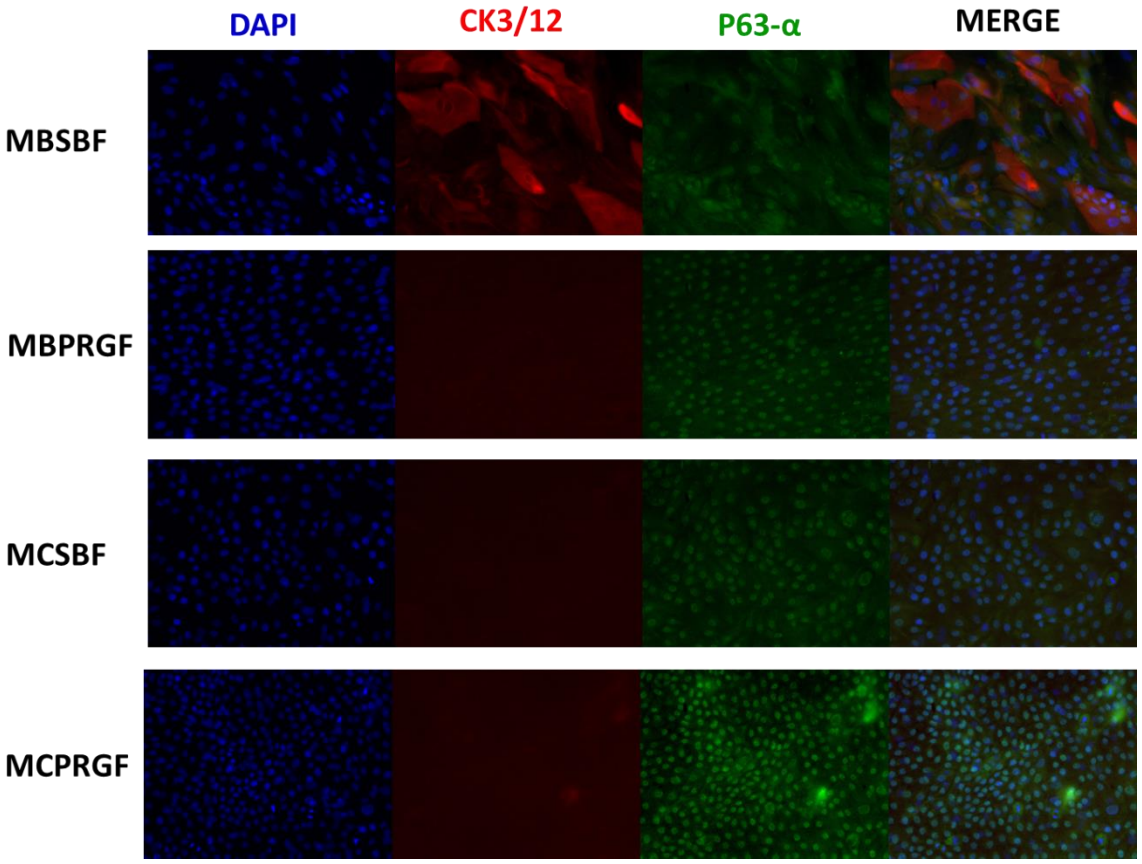

Figura 36. Microfotografía representativa de la expresión de marcadores en los cultivos de células epiteliales limbares en los distintos medios de cultivo. **MC**: Medio completo. **MB**: Medio basal. **PRGF**: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. **FBS**: Suero bovino fetal. Obtenida mediante microscopía de fluorescencia.

5.1.4. Eficiencia formadora de colonias.

La evaluación de la eficiencia formadora de colonias (Figura 37) mostró igualmente un porcentaje de colonias significativamente mayor ($p<0,01$) en los cultivos realizados con PRGF que en los de FBS, tanto en el MC (5,06±0,44 y 2,19±0,30) como en el MB (3,89±0,31 y 0,61±0,07). Más aún, se encontraron diferencias estadísticamente muy significativas ($p<0,01$) entre MBPRGF (3,89±0,31) y MCFBS (2,19±0,30) (Figura 38).

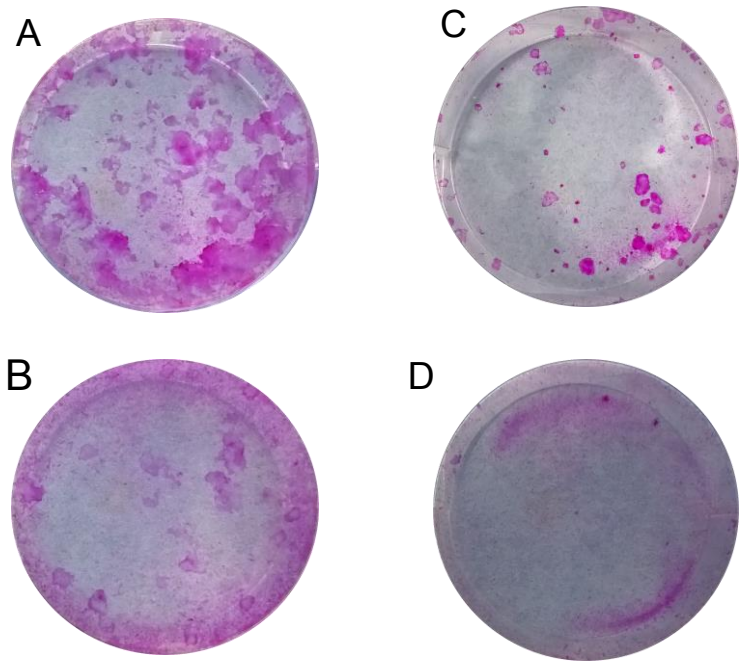

Figura 37. Imagen macroscópica representativa de colonias teñidas con rodamina tras 12 días de cultivo en medio completo (A) y basal (B) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento y en medio completo (C) y basal (D) suplementados con suero bovino fetal.

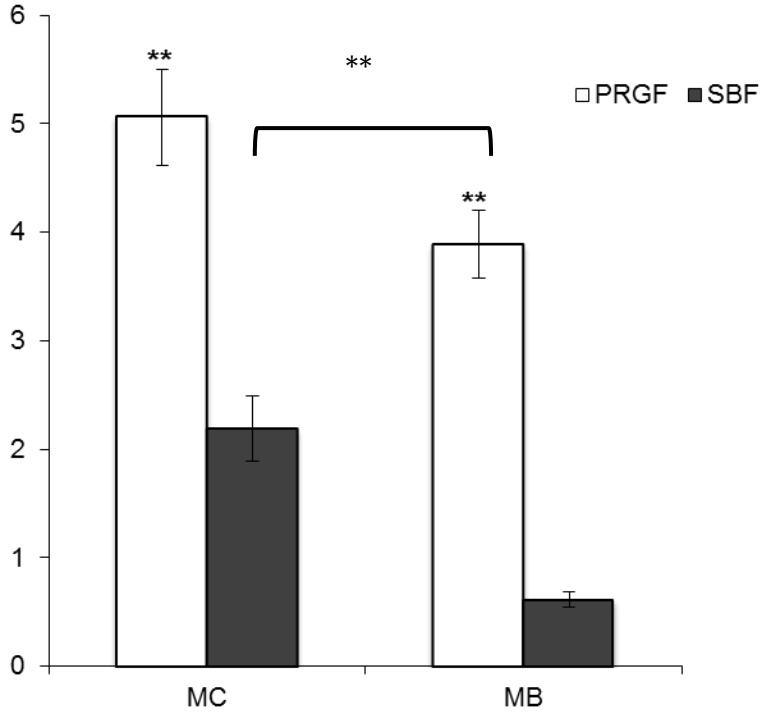

Figura 38. Porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio completo (MC) y basal (MB) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) o suero bovino fetal (FBS).

5.2. Membrana de PRGF como matriz para el cultivo y trasplante de células madre epiteliales limbares.

En las imágenes de microscopía de contraste de fases y microscopía electrónica de barrido se aprecia crecimiento celular sobre las membranas y los resultados de inmunohistoquímica demuestran que estas células expresan marcadores propios de células madre epiteliales como el p63-α y de células epiteliales corneales diferenciadas, como las CK 3 y 12.

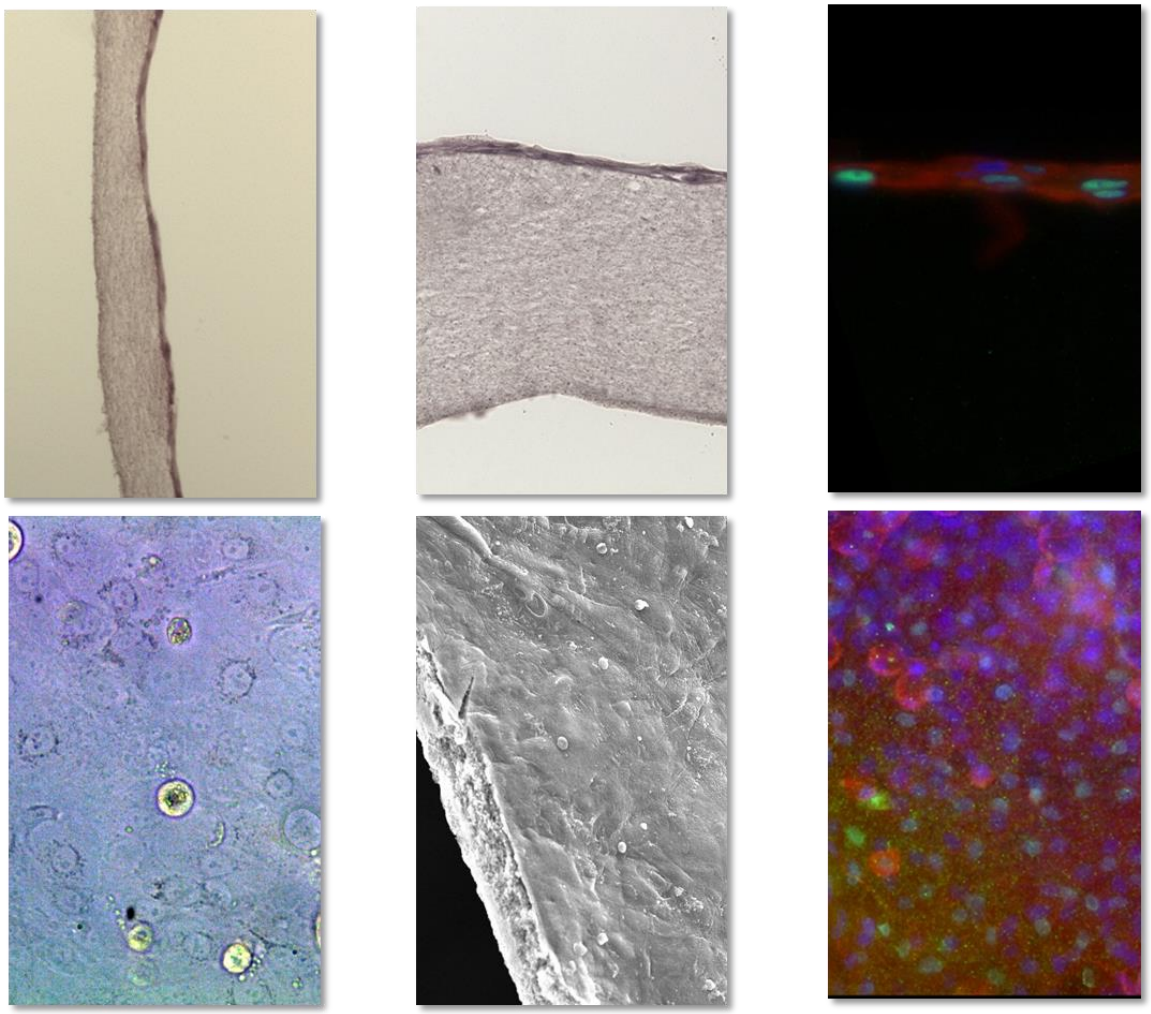

Figura 39. Microfotografías representativas del crecimiento celular sobre las membranas de PRGF.

DISCUSIÓN

La cicatrización de las heridas de la superficie ocular está mediada por una amplia gama de factores de crecimiento y otras citoquinas producidas en las glándulas lacrimales y en la propia superficie ocular (99, 100). Estas proteínas poseen un papel fundamental en la proliferación, migración y diferenciación celular así como en la síntesis de matriz extracelular (80).

El uso de derivados hemáticos en el tratamiento de patologías oculares se debe a que su composición incluye muchas de estas proteínas esenciales para el mantenimiento y la regeneración de los tejidos (101, 102).

El suero autólogo ha sido utilizado durante décadas para el tratamiento de patologías de la superficie ocular (76, 82). Sin embargo, presenta una serie de limitaciones como la presencia de citoquinas en su composición con efectos negativos sobre la regeneración tisular y una gran variabilidad en los métodos de obtención, que afecta a su composición y por tanto a su eficacia. Los resultados publicados en la literatura reflejan esta falta de estandarización siendo inconsistentes y de difícil evaluación (12, 103).

En los últimos años hemos vivido un auge en la aplicación de los derivados plaquetarios en diversas áreas de la medicina, ente ellas la oftalmología, basado en su papel sobre la reparación y regeneración tisular. El PRGF es un plasma rico en plaquetas totalmente autólogo que además de proporcionar lubricación a la superficie ocular aporta una serie de factores de crecimiento y otras citoquinas con funciones epiteliotróficas, neurotróficas y antimicrobianas (104). El colirio de PRGF ha sido utilizado en el tratamiento de diversas patologías oftalmológicas incluyendo ojo seco o defectos epiteliales persistentes (89, 91).

Recientemente nuestro grupo ha demostrado que el colirio de PRGF es una alternativa efectiva y segura para el tratamiento de patologías de la superficie ocular refractarias a otros tratamientos, entre ellos el suero autólogo (88). Por los buenos resultados obtenidos ha surgido la necesidad de establecer la estabilidad biológica del colirio de PRGF para su aplicación en la práctica clínica de forma continuada. Asumiendo una posología de 2 a 4 instilaciones diarias durante 6 meses (95, 105, 106) se decidió estudiar la composición y la actividad biológica del colirio de PRGF a distintos tiempos bajo diferentes condiciones de conservación. Las condiciones de conservación fueron diseñadas para minimizar la degradación de los compuestos activos y la contaminación microbiana respetando el uso habitual de los colirios.

Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones de varios de los factores de crecimiento implicados en la cicatrización y regeneración de la superficie ocular, como TGF-β1, EGF, VEGF, PDGF-AB, IGF-1, TSP-1 y ANG-1 se mantienen constantes tras 3 y 6 meses conservados bajo congelación (-20ºC).

Es más, los niveles de estas proteínas son similares a los obtenidos en el colirio en fresco.

Bradley et al. estudiaron la estabilidad de varios factores de crecimiento como EGF, IGF o sustancia P en el suero autólogo a distintas temperaturas (-15,4, 25, 37 y 42ºC) e intervalos de tiempo. Algunos de estos factores como la sustancia P o el factor de crecimiento neurotrófico mostraron una reducción en su concentración a TA y 4ºC (101). Sin embargo en el estudio realizado por Fisher et al. la concentración de EGF, fibronectina, vitamina A, E, albumina, e inmunoglobulina A permanecieron constantes durante 6 meses a -20ºC (107).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias en los niveles de las principales proteínas en el colirio de PRGF congelado durante 3 y 6 meses y mantenido a TA o 4ºC 3 días. Es más, la proliferación de queratocitos no mostró diferencias tras el cultivo con PRGF conservado según las condiciones del estudio. Esto es de especial importancia ya que permite a los pacientes mantener el tratamiento incluso sin necesidad de refrigeración, lo que facilita en gran medida la adherencia y mejora la calidad de vida, disminuyendo el número de extracciones de sangre necesarias. También supone un avance en la eficiencia de los servicios sanitarios puesto que disminuye el número de visitas necesarias por cada paciente.

Los colirios de derivados hemáticos son utilizados habitualmente sin conservantes para evitar la toxicidad de estos sobre la superficie ocular. Aunque poseen propiedades antimicrobianas (104, 108), al contener sustancias como lisozima o inmunoglobulinas, existe una gran preocupación por la potencial contaminación asociada al uso del colirio por largos periodos de tiempo (109). Como consecuencia se recomienda mantener los envases a 4ºC durante no más de 7 días (110). A pesar de esta recomendación varios estudios muestran que del 7 al 25% de los envases de derivados hemáticos presentan crecimiento microbiano (101, 111, 112). La implementación del uso de envases monodosis en el colirio de PRGF junto con los resultados de estabilidad y ausencia de contaminación microbiológica del presente estudio permiten la utilización del colirio durante 72 horas sin necesidad de refrigeración.

Como hemos visto el colirio de PRGF ha mostrado ser útil en el tratamiento de patologías de la superficie ocular, incluso en casos en los que el suero autólogo había resultado inefectivo. Esta mayor efectividad se ha relacionado con la mayor concentración de factores de crecimiento derivados de plaquetas que contiene el PRGF (89, 91).

En el presente estudio se ha comparado por primera vez la composición y el efecto biológico del PRGF y del suero autólogo sobre dos linajes de fibroblastos oculares.

La concentración de factores de crecimiento en el colirio de PRGF ha resultado significativamente superior que en la formulación de suero autólogo utilizada habitualmente en la práctica clínica. El EGF ha demostrado promover la proliferación y migración de células epiteliales corneales (113), por lo que las mayores concentraciones de este factor de crecimiento pueden ser las causantes del aumento en la proliferación y migración celular observadas en modelos de herida corneal (20, 114). Además, otros factores de crecimiento como FGF o PDGF-AB juegan un papel fundamental en la proliferación y migración de los fibroblastos en la superficie ocular (115, 116). Por tanto, el aumento observado de la proliferación y migración de los fibroblastos respecto al suero autólogo puede explicarse por la mayor concentración de estos factores de crecimiento en el colirio de PRGF.

Es conocido el efecto del VEGF sobre la estimulación de la proliferación de células del endotelio vascular y la angiogénesis (117), pese a que el PRGF incluye este factor de crecimiento, no se han observado procesos de neovascularización en los pacientes tratados (89, 91). Este hecho puede deberse al equilibrio entre factores pro y anti-angiogénicos, como angioestatina, endostatina o trombospondina (118).

Tras la cicatrización corneal pueden persistir miofibroblastos, principales responsables de la proliferación de tejido cicatrizal, que compromete la trasparencia corneal y por tanto, la función visual (119). La diferenciación a miofibroblastos implica la expresión de varias proteínas citoplasmáticas como α-SMA, desmina o vimentina (120). En el presente estudio se ha comparado el efecto del PRGF con el del suero autólogo para prevenir y revertir la diferenciación de fibroblastos conjuntivales y queratocitos estromales a miofibroblastos inducida por TGF-β1. Nuestros resultados muestran una mayor capacidad del PRGF respecto al suero autólogo de prevenir y revertir esta diferenciación celular, como se observa por la disminución en la expresión de proteínas citoplasmasmáticas propias de miofibroblastos.

Los resultados obtenidos en un estudio *in vivo* en el que los ratones sometidos a queratectomía fotorrefractiva (PRK) y tratados con colirio de PRGF presentaban menor cicatriz y mayor trasparencia corneal que el grupo control (118) apoyan nuestros resultados.

La vimentina ha sido la primera proteína del citoplasma celular relacionada con la fibrosis. Es expresada en los estadios iniciales y, posteriormente aparecen otras como α-SMA o desmina (41). Aunque son necesarios estudios adicionales, es posible que la vimentina sea la última proteína en expresarse en la diferenciación de los fibroblastos conjuntivales y corneales a miofibroblastos y como consecuencia sea necesario mantener los cultivos celulares durante más tiempo para evaluar el efecto del PRGF y el suero autólogo sobre su expresión.

Existen estudios contradictorios sobre la desaparición de los miofibroblatos tras la cicatrización de heridas corneales. Algunos postulan que se puede producir una

des-diferenciación de las células miofibroblásticas a fibroblastos inducida por mediadores como MyoD, prostaglandina E2 o FGF (121-123). Otros estudios sin embargo, abogan por que los miofibroblastos son células diferenciadas terminalmente que han perdido la capacidad de proliferar y sufren procesos de apoptosis desapareciendo del tejido reparado (124, 125). En el presente estudio hemos observado como la aplicación de derivados hemáticos induce la proliferación de fibroblastos y miofibroblastos, incluso en presencia de TGF-β1, sin que se produzca apoptosis.

Los resultados obtenidos también muestran que el PRGF no solo previene y revierte la diferenciación de fibroblastos a miofibroblsatos si no que aumenta su proliferación, incluso combinado con TGF-β1, como hemos visto por la expresión del marcador nuclear Ki-67. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de Hecker et al. según la cual los miofibroblastos no son células terminalmente diferenciadas y se puede revertir esta diferenciación mediante algunos productos incluidos en los derivados hemáticos, como el FGF (122, 123).

En base a las características del PRGF sobre la proliferación y migración de distintos linajes de células oculares se decidió estudiar su aplicación en terapias avanzadas. La expansión *ex vivo* de LESC constituye un tratamiento prometedor de LSCD. Sin embargo la mayoría de métodos de cultivo utilizados actualmente incluyen productos xenogénicos o alogénicos no exentos de riesgos, y con altos costes asociados.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método de cultivo y trasplante de LESC totalmente autólogo basado en la tecnología PRGF.

Por un lado el PRGF líquido ha sido utilizado como único suplemento de un medio de cultivo celular basal, obteniendo incluso mejores resultados de proliferación y capacidad clonogénica que un medio completo que incluye en su composición sustancias como el FBS o la toxina colérica, poco adecuadas para la aplicación clínica.

Además se ha obtenido una membrana de fibrina manejable que permite la adhesión y proliferación, manteniendo el fenotipo celular, y constituyendo un soporte adecuado para el trasplante.

La relevancia clínica de estos resultados radica en la utilización de un compuesto autólogo y de fácil acceso como suplemento del medio de cultivo celular y *scaffold*. Estas propiedades, junto con su accesibilidad y el bajo coste asociado a su obtención, lo convierten en una alternativa muy interesante para la terapia celular de la córnea.

Los medios de cultivo incluyen en su composición sustancias que promueven la proliferación de las células, como FBS, insulina, hidrocortisona, EGF, T3, adenina o toxina colérica (126). El suero constituye el suplemento más utilizado en cultivo

celular e ingeniería de tejidos por sus propiedades sobre la proliferación y la conservación de un estado celular indiferenciado (127). La mayoría de sueros son de origen animal, principalmente bovino, implicando importantes riesgos como el desarrollo de anticuerpos contra las proteínas animales o la transmisión de patógenos (60). En células mesenquimales, por ejemplo, se ha observado acumulación intracelular de antígenos bovinos, incluso con concentraciones de FBS del 2% es más, receptores de trasplante de células madre de médula ósea han mostrado anticuerpos anti-FBS (128).

Esto hecho ha ganado relevancia por la gran expansión que han experimentado la medicina regenerativa y las terapias avanzadas en los últimos años, en las que el uso del FBS debe evitarse en la medida de lo posible de acuerdo a la legislación y a las guías internacionales vigentes. Estas guías especifican que cuando sea necesario añadir suero al medio de cultivo es preferible usar suero del mismo individuo que ha donado las células (9-11).

Con el método de cultivo propuesto no sólo se elimina el uso de FBS, sino también de otras sustancias como la toxina colérica, utilizada para aumentar la proliferación de las LESC en cultivo por su efecto sobre la concentración intracelular de adenosin monofosfato cíclico (129, 130). Aunque existe un bajo riesgo de transmisión de la enfermedad, debido al grado de purificación de la toxina colérica y a la baja concentración utilizada en los medios de cultivo, continua siendo teóricamente posible siendo recomendable evitar su uso (60).

El PRGF como suplemento del medio de cultivo celular ha demostrado inducir una mayor proliferación celular que el FBS, medida tanto en área de crecimiento desde el explante de limbo como en número de células, independientemente de que el medio utilizado fuera MC o MB.

En ambos grupos (PRGF y FBS) los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación fueron mejores en los medios completos que en los basales. Cabe destacar que el área de proliferación y el número de células resultó mayor en el MBPRGF que en el MCFBS, existiendo diferencias estadísticamente significativas en el número de células. Podemos afirmar que un MB suplementado únicamente con PRGF consigue una mayor proliferación de células limbares que un MC suplementado con FBS que incluye en su composición factores poco adecuados para la aplicación clínica.

Comparando la concentración de factores de crecimiento descrita en PRGF y FBS observamos que la concentración de PDGF-AB es sustancialmente superior en el PRGF que en FBS, mientras que la de TGF-β, con efectos inhibidores sobre el crecimiento de células epiteliales, es superior (131, 132). Esta diferencia en los niveles de factores de crecimiento puede explicar el mayor efecto sobre la proliferación observado.

El uso de suero humano autólogo o alogénico también ha sido propuesto como sustituto del FBS en el cultivo de células conjuntivales, corneales y de epitelio oral para aplicación oftálmica (133, 134). Sin embargo, el PRGF como hemos visto contiene una mayor concentración de EGF, entre otros factores de crecimiento, que el suero humano, e incluso que otros plasmas ricos en plaquetas (114, 132), lo que se ha traducido en un mayor efecto sobre la proliferación de células epiteliales corneales tanto en estudios *in vitro* (114) como *in vivo* (20).

En cuanto a la morfología celular, en los medios suplementados con PRGF se observan células de forma ovalada, más pequeñas y homogéneas, en definitiva con una morfología propia de células epiteliales indiferenciadas (135). Es más, cuando se utilizan medios de cultivo suplementados con PRGF la probabilidad de obtener células con una morfología óptima se multiplica por tres. La variabilidad observada en el rendimiento de los distintos cultivos se puede atribuir al uso de los anillos corneoesclerales completos. En las zonas nasal y temporal del limbo el número de LESC es menor que en el área inferior y superior (136, 137), obteniéndose distintos resultados según la zona del limbo cultivada.

Confirmamos que el PRGF ayuda a mantener el estado indiferenciado de LESC mediante el análisis de la expresión de marcadores de células madre epiteliales como el p63 (29). Nuestros datos muestran que utilizando el PRGF como suplemento del medio de cultivo aumenta la expresión de estos marcadores. Suri et al. (128), sin embargo, no encuentran diferencias en la expresión de ABCG2 y p63α utilizando un medio completo suplementado con FBS o con lisado de plaquetas, que incluía así mismo toxina colérica.

La funcionalidad celular fue evaluada mediante la determinación del porcentaje de UFC presentes bajo cada medio de cultivo. Se encontró un mayor porcentaje de UFC en los medios suplementados con PRGF e incluso se observaron diferencias estadísticamente muy significativas entre el MBPRGF y el MCFBS, siendo estas colonias además de más numerosas de mayor tamaño. Estos resultados concuerdan con la mayor presencia de células que expresan fenotipo y marcadores propios de células indiferenciadas, ya que las células indiferenciadas limbares poseen una mayor capacidad de proliferación y clonogénica que las céluas corneales diferenciadas (138).

Los porcentajes de UFC obtenidos son superiores a los descritos en la literatura para métodos de cultivo por explantes sin fibroblastos murinos 3T3 (54) debido a la adicción de PRGF. Varios estudios han demostrado que el lisado de plaquetas, tanto alogénico como autólogo, es superior al FBS en la estimulación de la proliferación de células mesenquimales, disminuyendo el tiempo hasta confluencia, aumentando la proliferación y el tamaño de las UFC (139), estos resultados apoyan los obtenidos en este trabajo.

Otro factor implicado en la indiferenciación celular es la interacción entre fibroblastos y LESC (53). Está interacción se puede lograr cultivando sobre una

capa de células cebadoras o *feeder* o por la presencia de fibroblastos nativos incluidos en el explante de limbo o tras el aislamiento celular mediante colagenasa A (140). En el presente estudio se apuesta por un método de cultivo totalmente autólogo evitando el uso de productos xenogéticos como las células cebadoras murinas. Por ello se ha utilizado el cultivo por explantes en un medio suplementado con PRGF autólogo que podría ser la mejor alternativa para mantener el fenotipo de la LESC y aumentar la seguridad de los pacientes.

Para eliminar el uso de células de origen animal diversos estudios han propuesto utilizar células cebadoras de origen humano (59, 141, 142). En el método de cultivo propuesto se utilizan explantes de limbo que, por un lado mantienen las células estromales nativas favoreciendo la proliferación e indiferenciación de las LESC, y por otro facilitan el cultivo y evitan el posible daño celular derivado del uso de enzimas.

El número de células indiferencias presentes en cultivo es un factor pronóstico del éxito del trasplante de LESC expandidas *ex vivo* (30) por lo que es esperable que con las células cultivadas en presencia de PRGF se obtengan mejores resultados clínicos en el tratamiento del LSCD.

En el presente trabajo se ha desarrollado una membrana de PRGF con la sangre del propio paciente utilizada así mismo como suplemento del medio de cultivo. Las membranas de PRGF obtenidas, pese a presentar una menor resistencia mecánica a la tracción que MA, resultaron adecuadas para su aplicación quirúrgica en pacientes con patologías de la superficie ocular de distintas etiologías.

Los estudios de microscopía electrónica de barrido evidencian que las membranas de PRGF contienen una ultraestructa fibrilar con componentes como la fibrina que favorecen la adhesión celular y factores de crecimiento embebidos que se liberan de forma sostenida hasta durante 8 días (86, 143).

Al igual que la MA el PRGF aporta factores de crecimiento fundamentales para la regeneración tisular, presenta propiedades anti infecciosas (104) y proliferativas (20) e inhibe la fibrosis (118, 144). Contando entre las ventajas sobre la MA su origen autólogo, coste y accesibilidad. Todas estas características hacen que sea una alternativa a la MA no sólo en la ingeniería de tejidos si no en el tratamiento de todas las afecciones de la superficie ocular que precisen un tratamiento proliferativo continuado.

Este hecho se ha confirmado en la práctica clínica ya que la membrana de PRGF desarrollada para aplicación oftálmica ha sido implantada con éxito en 15 pacientes para el tratamiento de distintitas patologías en las que es necesario regenerar tejidos oculares.

Existe evidencia de que la expansión de las LESC está condicionada por las propiedades del soporte o scaffold utilizado (145). Las membranas de PRGF han resultado adecuadas para el cultivo celular, permitiendo la adhesión y proliferación de LESC. Las LESC cultivadas sobre la membrana mantienen la morfología y expresión de marcadores propios de células madre.

En este trabajo se ha aplicado por primera vez el PRGF como único suplemento de un medio de cultivo basal, obteniendo resultados de crecimiento y fenotipo celular similares a los de un medio completo que incluye en su composición suplementos xenogénicos, no recomendables para el uso clínico, y como matriz para el cultivo y trasplante de LESC.

Como consecuencia el cultivo de LESC en la membrana de fibrina utilizando PRGF como suplemento del medio, no sólo aumenta la seguridad y eficiencia en el tratamiento de LSCD mediante expansión *ex vivo* de LESC, sino que aumenta la proliferación celular manteniendo un estado celular indiferenciado lo que puede repercutir en una mayor tasa de éxitos en el trasplante de limbo.

Además hemos visto que el PRGF modula la cicatrización celular aumentando la proliferación y migración de fibroblastos conjuntivales y previniendo y revirtiendo su diferenciación a miofibroblastos; lo presente importantes implicaciones en el manejo de diferentes patologías (quemaduras, inflamación, traumatismos….) que tienen en común la fibrosis o cambio del tejido normal a procesos cicatrizantes que comprometen la función, como fibrosis subconjuntivales, opacidades corneales, o presencia tejido cicatricial en zonas como la maya trabecular o en la retina.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y caracterizado la preparación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento para su aplicación oftálmica en forma de colirio. Dicha preparación:

   1.1. Produce un aumento en los niveles de los principales de factores de crecimiento implicados en la regeneración corneal.

   1.2. Conserva sus propiedades y efectos biológicos durante 6 meses a -20ªC y durante 3 días a temperatura ambiente o 4ºC.

   1.3. Presenta un efecto regenerador y anti-fibrótico, aumentando la proliferación y migración de queratocitos y células conjuntivales y reviertiendo su diferenciación a miofibroblastos.

2. Se ha desarrollado y caracterizado la membrana de fibrina de PRGF para la aplicación en cirugía oftálmica, con propiedades reológicas que permiten su fácil aplicación y sutura en cirugía de la superficie ocular y córnea.

3. Se ha desarrollado la aplicación del PRGF para su empleo en terapias avanzadas en oftalmología, demostrando su efecto regenerativo mediante el aumento de la proliferación y la capacidad clonogénica de las células epiteliales limbares a la vez que preserva su estado indiferenciado. Este producto puede ser aplicado como:

   3.1. Suplemento del medio de cultivo celular y así evitar el uso de productos xenogénicos, alogenicos o irradiados que se emplean en la actualidad como cebadores de crecimiento.

   3.2. Matriz o andamiaje para la expansión ex vivo de células madre epiteliales limbares

BIBLIOGAFÍA

1. Merayo-Lloves J, Yanez B, Mayo A, Martin R, Pastor JC. Experimental model of corneal haze in chickens. J Refract Surg. 2001;17(6):696-9.
2. Gomez S, Herreras JM, Merayo J, Garcia M, Argueso P, Cuevas J. Effect of hyaluronic acid on corneal haze in a photorefractive keratectomy experimental model. J Refract Surg. 2001;17(5):549-54.
3. Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. Cornea. 2005;24(5):509-22.
4. Chen JJ, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in partial limbal deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990;31(7):1301-14.
5. Toker E, Asfuroglu E. Corneal and conjunctival sensitivity in patients with dry eye: the effect of topical cyclosporine therapy. Cornea. 2010;29(2):133-40.
6. Brignole-Baudouin F, Warnet JM, Barritault D, Baudouin C. RGTA-based matrix therapy in severe experimental corneal lesions: safety and efficacy studies. J Fr Ophtalmol. 2013;36(9):740-7.
7. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, et al. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. Cell Tissue Bank. 2016;17(1):51-8.
8. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Lancet. 1997;349(9057):990-3.
9. Guidance for FDA Reviewers and Industry Medical Devices Containing Materials Derived from Animal Sources (Except for In Vitro Diagnostic Devices), (1998).
10. Guideline on human cell-based medical products, (2007).
11. Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMEA/410/01 Rev. 3-March 2011), (2011).
12. Pan Q, Angelina A, Zambrano A, Marrone M, Stark WJ, Heflin T, et al. Autologous serum eye drops for dry eye. Cochrane Database Syst Rev. 2013;8:Cd009327.
13. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. Biomaterials. 2007;28(31):4551-60.
14. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. Front Biosci. 2008;13:3532-48.
15. Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. Ocul Surf. 2007;5(3):228-39.
16. Bonini S, Lambiase A, Rama P, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. Ophthalmology. 2000;107(7):1347-51; discussion 51-2.

17. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost. 2004;91(1):4-15.
18. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. Trends Pharmacol Sci. 2008;29(1):37-41.
19. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales M-C. In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2012;53(9):5571-8.
20. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Hernaez-Moya R, Duran JA, Morales MC. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. Cornea. 2014;33(6):614-20.
21. 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(1):49-62.
22. Poli M, Janin H, Justin V, Auxenfans C, Burillon C, Damour O. Keratin 13 immunostaining in corneal impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(13):9411-5.
23. Barbaro V, Ferrari S, Fasolo A, Pedrotti E, Marchini G, Sbabo A, et al. Evaluation of ocular surface disorders: a new diagnostic tool based on impression cytology and confocal laser scanning microscopy. Br J Ophthalmol. 2010;94(7):926-32.
24. Polisetty N, Fatima A, Madhira SL, Sangwan VS, Vemuganti GK. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye. Mol Vis. 2008;14:431-42.
25. Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT, 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(2):201-9.
26. Zhang X, Sun H, Li X, Yuan X, Zhang L, Zhao S. Utilization of human limbal mesenchymal cells as feeder layers for human limbal stem cells cultured on amniotic membrane. J Tissue Eng Regen Med. 2010;4(1):38-44.
27. Pellegrini G, Rama P, De Luca M. Vision from the right stem. Trends in Molecular Medicine. 2011;17(1):1-7.
28. Di Iorio E, Barbaro V, Ruzza A, Ponzin D, Pellegrini G, De Luca M. Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(27):9523-8.
29. Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(6):3156-61.
30. Pellegrini G, Rama P, Matuska S, Lambiase A, Bonini S, Pocobelli A, et al. Biological parameters determining the clinical outcome of autologous cultures of limbal stem cells. Regen Med. 2013;8(5):553-67.
31. Schlotzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. Exp Eye Res. 2005;81(3):247-64.
32. Watanabe K, Nishida K, Yamato M, Umemoto T, Sumide T, Yamamoto K, et al. Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2. FEBS Lett. 2004;565(1-3):6-10.

33. de Paiva CS, Chen Z, Corrales RM, Pflugfelder SC, Li DQ. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. Stem Cells. 2005;23(1):63-73.
34. Barnard Z, Apel AJ, Harkin DG. Phenotypic analyses of limbal epithelial cell cultures derived from donor corneoscleral rims. Clin Experiment Ophthalmol. 2001;29(3):138-42.
35. Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J, et al. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47(11):4780-6.
36. Hayashi R, Yamato M, Sugiyama H, Sumide T, Yang J, Okano T, et al. N-Cadherin is expressed by putative stem/progenitor cells and melanocytes in the human limbal epithelial stem cell niche. Stem Cells. 2007;25(2):289-96.
37. Li W, Hayashida Y, Chen YT, Tseng SC. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Res. 2007;17(1):26-36.
38. Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1983;24(10):1442-3.
39. DelMonte DW, Kim T. Anatomy and physiology of the cornea. J Cataract Refract Surg. 2011;37(3):588-98.
40. Torricelli AA, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. Exp Eye Res. 2016;142:110-8.
41. Chaurasia SS, Kaur H, de Medeiros FW, Smith SD, Wilson SE. Dynamics of the expression of intermediate filaments vimentin and desmin during myofibroblast differentiation after corneal injury. Exp Eye Res. 2009;89(2):133-9.
42. Wilson SE. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. Exp Eye Res. 2012;99:78-88.
43. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, aetiology, clinical presentation, diagnosis and management. Indian J Ophthalmol. 2000;48(2):83-92.
44. Daya SM, Chan CC, Holland EJ. Cornea Society nomenclature for ocular surface rehabilitative procedures. Cornea. 2011;30(10):1115-9.
45. Sejpal K, Bakhtiari P, Deng SX. Presentation, diagnosis and management of limbal stem cell deficiency. Middle East Afr J Ophthalmol. 2013;20(1):5-10.
46. Ilari L, Daya SM. Long-term outcomes of keratolimbal allograft for the treatment of severe ocular surface disorders. Ophthalmology. 2002;109(7):1278-84.
47. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell. 1975;6(3):331-43.
48. Nakamura T, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using cultivated mucosal epithelial stem cells. Cornea. 2003;22(7 Suppl):S75-80.
49. Shortt AJ, Secker GA, Notara MD, Limb GA, Khaw PT, Tuft SJ, et al. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results. Surv Ophthalmol. 2007;52(5):483-502.
50. Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, et al. An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2002;43(7):2114-21.

51. Kim HS, Jun Song X, de Paiva CS, Chen Z, Pflugfelder SC, Li DQ. Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures. Exp Eye Res. 2004;79(1):41-9.
52. Tsai RJ, Li LM, Chen JK. Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. N Engl J Med. 2000;343(2):86-93.
53. Chen SY, Hayashida Y, Chen MY, Xie HT, Tseng SC. A new isolation method of human limbal progenitor cells by maintaining close association with their niche cells. Tissue Eng Part C Methods. 2011;17(5):537-48.
54. Lopez-Paniagua M, Nieto-Miguel T, de la Mata A, Dziasko M, Galindo S, Rey E, et al. Comparison of functional limbal epithelial stem cell isolation methods. Exp Eye Res. 2015;146:83-94.
55. Baylis O, Figueiredo F, Henein C, Lako M, Ahmad S. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes. J Cell Biochem. 2011;112(4):993-1002.
56. Jang IK, Ahn JI, Shin JS, Kwon YS, Ryu YH, Lee JK, et al. Transplantation of reconstructed corneal layer composed of corneal epithelium and fibroblasts on a lyophilized amniotic membrane to severely alkali-burned cornea. Artif Organs. 2006;30(6):424-31.
57. Li DQ, Wang Z, Yoon KC, Bian F. Characterization, isolation, expansion and clinical therapy of human corneal epithelial stem/progenitor cells. J Stem Cells. 2014;9(2):79-91.
58. Omoto M, Miyashita H, Shimmura S, Higa K, Kawakita T, Yoshida S, et al. The use of human mesenchymal stem cell-derived feeder cells for the cultivation of transplantable epithelial sheets. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(5):2109-15.
59. Ang LP, Jain P, Phan TT, Reza HM. Human Umbilical Cord Lining Cells as Novel Feeder Layer for Ex Vivo Cultivation of Limbal Epithelial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015;56(8):4697-704.
60. Schwab IR, Johnson NT, Harkin DG. INherent risks associated with manufacture of bioengineered ocular surface tissue. Archives of Ophthalmology. 2006;124(12):1734-40.
61. Tseng SC, Prabhasawat P, Barton K, Gray T, Meller D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. Arch Ophthalmol. 1998;116(4):431-41.
62. Koizumi NJ, Inatomi TJ, Sotozono CJ, Fullwood NJ, Quantock AJ, Kinoshita S. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. Curr Eye Res. 2000;20(3):173-7.
63. Hao Y, Ma DH, Hwang DG, Kim WS, Zhang F. Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane. Cornea. 2000;19(3):348-52.
64. Tseng SC, Li DQ, Ma X. Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix. J Cell Physiol. 1999;179(3):325-35.
65. Wang MX, Gray TB, Park WC, Prabhasawat P, Culbertson W, Forster R, et al. Reduction in corneal haze and apoptosis by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. J Cataract Refract Surg. 2001;27(2):310-9.

66. Meller D, Pires RT, Tseng SC. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures. Br J Ophthalmol. 2002;86(4):463-71.
67. Koizumi N, Inatomi T, Quantock AJ, Fullwood NJ, Dota A, Kinoshita S. Amniotic membrane as a substrate for cultivating limbal corneal epithelial cells for autologous transplantation in rabbits. Cornea. 2000;19(1):65-71.
68. Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41(9):2506-13.
69. Feng Y, Borrelli M, Reichl S, Schrader S, Geerling G. Review of alternative carrier materials for ocular surface reconstruction. Curr Eye Res. 2014;39(6):541-52.
70. Vazquez N, Chacon M, Meana A, Menendez-Menendez Y, Ferrero-Gutierrez A, Cereijo-Martin D, et al. Keratin-chitosan membranes as scaffold for tissue engineering of human cornea. Histol Histopathol. 2015;30(7):813-21.
71. Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, et al. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. Transplantation. 2001;72(9):1478-85.
72. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al. Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. Transplantation. 2004;77(3):379-85.
73. Ralph RA, Doane MG, Dohlman CH. Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump. Arch Ophthalmol. 1975;93(10):1039-43.
74. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. Arthritis Rheum. 1984;27(4):459-61.
75. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren's syndrome. Br J Ophthalmol. 1999;83(4):390-5.
76. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. Ophthalmology. 1999;106(10):1984-9.
77. Geerling G, Maclennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. Br J Ophthalmol. 2004;88(11):1467-74.
78. López García JS MJ. “Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología”. . Comunicación solicitada 87 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología Sociedad Española de Oftalmología 2011.
79. López García JS, Murube del Castillo, J. Suero Autólogo y Derivados Hemáticos en Oftalmología. Oftalmología SEd, editor2011.
80. Klenkler B, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. Exp Eye Res. 2004;79(5):677-88.
81. Anitua E, Muruzabal F, Tayebba A, Riestra A, Perez VL, Merayo-Lloves J, et al. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. Acta Ophthalmol. 2015;93(8):e605-14.

82. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. British Journal of Ophthalmology. 2004;88(11):1467-74.
83. Igualdad. AEdMyPSMdSSSe. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas. 2013.
84. Geerling G, Grus F, Seitz B, Hartwig D, Schirra F. [Legal regulations to produce serum eye drops : when is it necessary, and how can it be obtained?]. Ophthalmologe. 2008;105(7):632-8.
85. Anitua E, Muruzabal F, de la Fuente M, Merayo J, Duran J, Orive G. Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Ocular Surface Diseases. Curr Eye Res. 2016:1-8.
86. Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, Orive G. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. Ann Anat. 2013;195(5):461-6.
87. Anitua E, Prado R, Azkargorta M, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, Casado-Vela J, et al. High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. J Tissue Eng Regen Med. 2015;9(11):E1-E12.
88. Merayo-Lloves J, Sanchez RM, Riestra AC, Anitua E, Begona L, Orive G, et al. Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eyedrops in Refractory Cases of Ocular Surface Disorders. Ophthalmic Res. 2015;55(2):53-61.
89. Lopez-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Grau AE, Duran JA. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. Cornea. 2011;30(12):1312-7.
90. Pezzotta S, Del Fante C, Scudeller L, Cervio M, Antoniazzi ER, Perotti C. Autologous platelet lysate for treatment of refractory ocular GVHD. Bone Marrow Transplant. 2012;47(12):1558-63.
91. Lopez-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Etxebarria J, Duran JA. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. Cornea. 2010;29(8):843-8.
92. Geremicca W, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. Blood Transfus. 2010;8(2):107-12.
93. Avila MY. Restoration of human lacrimal function following platelet-rich plasma injection. Cornea. 2014;33(1):18-21.
94. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, Rio AL. Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. JAMA Ophthalmol. 2013;131(6):745-51.
95. Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. Ophthalmology. 2007;114(7):1286-93.e1.
96. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM. Bovine pericardium membrane (tutopatch) combined with solid platelet-rich plasma for the management of perforated corneal ulcers. Cornea. 2013;32(5):619-24.
97. Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. N Engl J Med. 2010;363(2):147-55.

98. Merayo-Lloves J, Sanchez-Avila RM, Riestra AC, Anitua E, Begona L, Orive G, et al. Safety and Efficacy of Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops for the Treatment of Evaporative Dry Eye. Ophthalmic Res. 2016.
99. Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. Prog Retin Eye Res. 2000;19(1):113-29.
100. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrosio R, Jr., Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. Prog Retin Eye Res. 2001;20(5):625-37.
101. Bradley JC, Simoni J, Bradley RH, McCartney DL, Brown SM. Time- and temperature-dependent stability of growth factor peptides in human autologous serum eye drops. Cornea. 2009;28(2):200-5.
102. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. Ophthalmology. 2004;111(6):1115-20.
103. Riestra AC, Alonso-Herreros JM, Merayo-Lloves J. Platelet rich plasma in ocular surface. Arch Soc Esp Oftalmol. 2016.
104. Anitua E, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF(R)-Endoret(R)) against Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis strains. Clin Exp Dermatol. 2012;37(6):652-7.
105. Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. Ophthalmic Res. 2007;39(3):124-9.
106. Alio JL, Rodriguez AE, WrobelDudzinska D. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. Curr Opin Ophthalmol. 2015;26(4):325-32.
107. Fischer KR, Opitz A, Boeck M, Geerling G. Stability of serum eye drops after storage of 6 months. Cornea. 2012;31(11):1313-8.
108. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Romano CL, Taschieri S, Del Fabbro M. Plasma components and platelet activation are essential for the antimicrobial properties of autologous platelet-rich plasma: an in vitro study. PLoS One. 2014;9(9):e107813.
109. Thanathanee O, Phanphruk W, Anutarapongpan O, Romphruk A, Suwan-Apichon O. Contamination risk of 100% autologous serum eye drops in management of ocular surface diseases. Cornea. 2013;32(8):1116-9.
110. Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. Br J Ophthalmol. 2001;85(10):1188-97.
111. Garcia Jimenez V, Veiga Villaverde B, Baamonde Arbaiza B, Cahue Carpintero I, Celemin Vinuela ML, Simo Martinez RM. [The elaboration, use and evaluation of eye-drops with autologous serum in corneal lesions]. Farm Hosp. 2003;27(1):21-5.
112. Lopez-Garcia JS, Garcia-Lozano I. Use of containers with sterilizing filter in autologous serum eyedrops. Ophthalmology. 2012;119(11):2225-30.
113. Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, et al. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1990;31(9):1773-8.

114. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Duran JA, Morales MC. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012;53(9):5571-8.
115. Barton K, Nava A, Monroy DC, Pflugfelder SC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. Adv Exp Med Biol. 1998;438:461-9.
116. Grant MB, Khaw PT, Schultz GS, Adams JL, Shimizu RW. Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, and transforming growth factor-beta on corneal cell chemotaxis. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992;33(12):3292-301.
117. van Setten GB. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal human corneal epithelium: detection and physiological importance. Acta Ophthalmol Scand. 1997;75(6):649-52.
118. Anitua E, Muruzabal F, Alcalde I, Merayo-Lloves J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. Exp Eye Res. 2013;115:153-61.
119. Garana RM, Petroll WM, Chen WT, Herman IM, Barry P, Andrews P, et al. Radial keratotomy. II. Role of the myofibroblast in corneal wound contraction. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1992;33(12):3271-82.
120. Kaur H, Chaurasia SS, de Medeiros FW, Agrawal V, Salomao MQ, Singh N, et al. Corneal stroma PDGF blockade and myofibroblast development. Exp Eye Res. 2009;88(5):960-5.
121. Garrison G, Huang SK, Okunishi K, Scott JP, Kumar Penke LR, Scruggs AM, et al. Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E(2). Am J Respir Cell Mol Biol. 2013;48(5):550-8.
122. Hecker L, Jagirdar R, Jin T, Thannickal VJ. Reversible differentiation of myofibroblasts by MyoD. Exp Cell Res. 2011;317(13):1914-21.
123. Maltseva O, Folger P, Zekaria D, Petridou S, Masur SK. Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001;42(11):2490-5.
124. Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. Exp Cell Res. 2003;282(2):90-100.
125. Wilson SE, Chaurasia SS, Medeiros FW. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. Exp Eye Res. 2007;85(3):305-11.
126. Yanai R, Yamada N, Inui M, Nishida T. Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells. Exp Eye Res. 2006;83(1):76-83.
127. Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1993;34(10):2976-89.
128. Suri K, Gong HK, Yuan C, Kaufman SC. Human Platelet Lysate as a Replacement for Fetal Bovine Serum in Limbal Stem Cell Therapy. Curr Eye Res. 2016:1-8.
129. Okada N, Kitano Y, Ichihara K. Effects of cholera toxin on proliferation of cultured human keratinocytes in relation to intracellular cyclic AMP levels. J Invest Dermatol. 1982;79(1):42-7.

130. Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: a new view. Cell. 1978;15(3):801-11.
131. Shanskii YD, Sergeeva NS, Sviridova IK, Kirakozov MS, Kirsanova VA, Akhmedova SA, et al. Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types. Bull Exp Biol Med. 2013;156(1):146-51.
132. Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Lloves J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. Exp Eye Res. 2015;135:118-26.
133. Vianna LM, Kallay L, Toyono T, Belfort R, Jr., Holiman JD, Jun AS. Use of human serum for human corneal endothelial cell culture. Br J Ophthalmol. 2015;99(2):267-71.
134. Ferro F, Spelat R, Beltrami AP, Cesselli D, Curcio F. Isolation and characterization of human dental pulp derived stem cells by using media containing low human serum percentage as clinical grade substitutes for bovine serum. PLoS One. 2012;7(11):e48945.
135. Romano AC, Espana EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM, Tseng SC. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003;44(12):5125-9.
136. Utheim TP, Raeder S, Olstad OK, Utheim OA, de La Paz M, Cheng R, et al. Comparison of the histology, gene expression profile, and phenotype of cultured human limbal epithelial cells from different limbal regions. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009;50(11):5165-72.
137. Notara M, Shortt AJ, O'Callaghan AR, Daniels JT. The impact of age on the physical and cellular properties of the human limbal stem cell niche. Age (Dordr). 2013;35(2):289-300.
138. Pellegrini G, Golisano O, Paterna P, Lambiase A, Bonini S, Rama P, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. J Cell Biol. 1999;145(4):769-82.
139. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? Biomaterials. 2016;76:371-87.
140. Gonzalez S, Deng SX. Presence of native limbal stromal cells increases the expansion efficiency of limbal stem/progenitor cells in culture. Exp Eye Res. 2013;116:169-76.
141. Kureshi AK, Dziasko M, Funderburgh JL, Daniels JT. Human corneal stromal stem cells support limbal epithelial cells cultured on RAFT tissue equivalents. Sci Rep. 2015;5:16186.
142. Gonzalez S, Mei H, Nakatsu MN, Baclagon ER, Deng SX. A 3D culture system enhances the ability of human bone marrow stromal cells to support the growth of limbal stem/progenitor cells. Stem Cell Res. 2016;16(2):358-64.
143. Anitua E, Zalduendo MM, Prado R, Alkhraisat MH, Orive G. Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion. J Biomed Mater Res A. 2015;103(3):1011-20.

144. Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Lloves J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. Exp Eye Res. 2015.
145. Jones RR, Hamley IW, Connon CJ. Ex vivo expansion of limbal stem cells is affected by substrate properties. Stem Cell Res. 2012;8(3):403-9.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3T3: Línea celular de fibroblastos murinos utilizada como cebadora para cultivos celulares

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AM: Membrana amniótica

ANG-1: Angiopoietina 1

BCA: Ácido bicinconínico

BCVA: Mejor agudeza visual corregida

BUT: Tiempo de ruptura lagrimal

CK: Citoqueratina

CLAU: Injerto conjuntivolimbar autólogo

COMET: Trasplante de láminas de epitelio mucoso oral cultivado autólogo

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

DMEN/F12: Medio de cultivo modificado de Dulbecco, Ham's F12

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EICH: Enfermedad de injerto contra huésped

F1: fase superior del plasma tras la centrifugación de la sangre

F2: 2 ml de plasma más cercanos a la serie roja tras la centrifugación de la sangre

FBS: Suero bovino fetal

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

FNT: Factor de necrosis tumoral

HGF: Factor de crecimiento de hepatocitos

IG: Inmunoglobulina

IGF: Factor de crecimiento similar a insulina

IL: Interleuquinas

KGF: Factor de crecimiento de queratinocitos

LESC: Células madre limbales epiteliales

LKAL: Injerto queratolimbar alogénico

LMSC: Células madre limbares mesenquimales

LR-CLAL: Injerto conjuntivolimbar alogénico de donante vivo

LSCD: Déficit de células madre limbares

MB: Medio basal

MBPRGF: Medio basal suplementado con Plasma Rico en Factores de Crecimiento

MBSBF: Medio basal suplementado con suero bovino fetal

MC: Medio clásico

MCPRGF: Medio clásico suplementado con Plasma Rico en Factores de Crecimiento

MCSBF: Medio clásico suplementado con suero bovino fetal

NGF: Factor de crecimiento nervioso

OSDI: Índice de enfermedad de la superficie ocular

PAS: Ácido periódico de Schiff

PBS: Tampón fosfato salino

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento

PRK: Queratectomía fotorrefractiva

PRP: Plasma rico en plaquetas

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa

SBF: Suero bovino fetal

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SO: Superficie ocular

SOS: Síndrome de ojo seco

T3: Triiodotironina

TA: Temperatura ambiente

TBS-T: tris-hidroximetil aminometano buffer salino con 0,1% de polisorbato 20

TGF-β: Factor de crecimiento transformante β

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

TSP-1: Trombospondina 1

UFC: Unidades formadoras de colonias

VAS: Escala visual analógica

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

α-SMA: Alfa actina de músculo liso

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Corte transversal de la córnea dónde se aprecian sus distintas capas. Tinción hematoxilina-eosina, 40 aumentos..... 13
Figura 2. Corte histológico del fornix conjuntival en el que se distingue epitelio, células caliciformes y sustancia propia. Tinción hematoxilina-eosina, 40 aumentos..... 15
Figura 3. Localización del limbo esclerocorneal (a). Diagrama de la localización del limbo y de la migración de las células madre epiteliales limbares al epitelio corneal (b). Adaptado de (Pellegrini, Rama et al. 2011)..... 16
Figura 4. Hipótesis de Thof and Friend sobre la fisiología de la regeneración del epitelio corneal. Adaptado de Thoft and Friend, 1983. 18
Figura 5. Presentación clínica del déficit de células madres limbares (LSCD). a y b patrón de la tinción con fluoresceína. c, LSCD total con neovascularización corneal y defecto epitelial en un paciente sometido a queratoplastia. Adaptado de Sejpal, Bakhtiari et al. 2013..... 21
Figura 6. Distintas formulaciones de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). Colirio de PRGF (A), PRGF para inyección (B), coágulo de PRGF (C), membrana de fibrina (D). Adaptado de (Anitua, Muruzabal et al. 2015) 32
*Figura 7. Proceso de preparación de las membranas de Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF). **A**. Tubo citratado con sangre tras la centrifugación. **B**. Formación del gel en los pocillos. **C**. Gel sobre el conformador. **D**. Membrana obtenida tras la conformación. E. Membrana montada sobre disco de nitrocelulosa..... 39*
Figura 8. Ensayo de proliferación celular. A. Las células fueron sembradas en el interior de los insertos. B. Tas retirar el inserto se obtiene un espacio de 500µm entre las células. C. Microfotografía obtenida mediante microscopía de contraste de fases del espacio entre las células. Adaptado de www.ibidi.com. 43
*Figura 9. Disposición de las muestras durante el ensayo de resistencia mecánica a la tracción. **A.** Marco de plástico. **B.** Muestra sometida a fuerzas de tracción. **C.** Máquina de ensayos Instron 5848..... 47*
Figura 10. Número de preparaciones de colirio de Plasma Rico en Factores de Crecimiento por año..... 52
*Figura 11. **A.** Úlcera corneal tórpida de 3 meses de evolución tratada con suero autólogo y agentes regenerativos de la matriz extracelular. **B**. Membrana de PRGF sobre la superficie ocular. **C**. Aspecto de la córnea tras el tratamiento..... 53*
Figura 12. Microfotografía de los queratocitos cultivados con colirio de PRGF recién elaborado (t_0) o conservado 3 y 6 meses (t_3 y t_6) a -20ºC obtenida mediante microscopía de contraste de fases. Línea de escala de 300µm. 56
Figura 13. Microfotografías de los cultivos de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) tras 72 horas en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control obtenidas mediante microscopía de contraste de fases. Barra de escala de 400µm..... 58
*Figura 14. Cuantificación de la proliferación celular mediante determinación de DNA de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo 20% (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control. * Diferencias estadísticamente significativas entre PRGF y AS ($p<0,05$). # Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p<0,05$). 58*
Figura 15. Microfotografías de la proliferación de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) tras 72 horas en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control. Obtenidas mediante inmunofluorescencia Hoechst. Barra de escala de 400µm. 59
*Figura 16. Cuantificación de la migración celular, como número de células por mm^2, de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) en medio de cultivo suplementado con PRGF, suero autólogo (AS) o suero bovino fetal (FBS) como control.*****Diferencias estadísticamente significativas entre PRGF y AS ($p<0,05$). # Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p<0,05$). 59*

*Figura 17. Cuantificación de la proliferación celular, mediante determinación de DNA, en los ensayos de protección frente a la diferenciación a miofibroblastos inducida por TGF-β1 de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) tras 3 días de cultivo en medio suplementado con 2,5ng/ml de TGF-β1 solo o en combinación con PRGF o suero autólogo 20% (AS). *Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 y TGF-β1 + PRGF o AS (p<0,05). #Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 + PRGF y TGF-β1 AS (p<0,05).* 60
Figura 18. Microfotografías de la expresión de α actina de músculo liso (α-SMA) y Ki-67 en cultivos de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) obtenidas mediante técnicas de inmunoflorescencia en los ensayos de diferenciación a miofibroblastos. Barra de escala de 200μm. 61
Figura 19. Análisis de la expresión mediante western blot de alfa actina (α-SMA), desmina y vimetina en cultivos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK) tras 3 días de cultivo en medio suplementado con 0,1% de suero bovino fetal (FBS) o 2,5ng/ml de TGF-β1 solo o en combinación con PRGF o suero autólogo 20% (AS). 62
*Figura 20. Cuantificación de la expresión de alfa actina (α-SMA), desmina y vimentina en cultivos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK) tras 3 días de cultivo en medio suplementado con 0,1% de suero bovino fetal (FBS) o 2,5ng/ml de TGF-β1 solo o en combinación con PRGF o suero autólogo (AS) 20%. *Diferencias estadísticamente significativas respecto a AS+TGF-β1 (p<0,05). #Diferencias estadísticamente significativas respecto a TGF-β1 3d (p<0,05).* 63
*Figura 21. Cuantificación de la proliferación celular, mediante determinación de DNA, en los ensayos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos conjuntivales humanos (HConF) y queratocitos humanos (HK) *Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 y TGF-β1 + PRGF o TGF-β1 + AS (p<0,05). #Diferencias estadísticamente significativas entre TGF-β1 + PRGF y TGF-β1 AS (p<0,05).* 64
Figura 22. Análisis de la expresión mediante western blot de alfa actina (α-SMA), desmina y vimetina en los ensayos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK). 65
*Figura 23. Cuantificación de la expresión de alfa actina (α-SMA), desmina y vimetina en los ensayos de reversión de la diferenciación a miofibroblastos de fibroblastos conjuntivales (HConF) y queratocitos estromales humanos (HK) tras 3 días de cultivo con medio suplementado con 2,5ng/ml de TGF-β1 y posteriormente con PRGF o suero autólogo (AS) 20%. * Diferencias estadísticamente significativas respecto a AS+TGF-β1 (p<0,05). # Diferencias estadísticamente significativas respecto a TGF-β1 3d (p<0,05). ¥ Diferencias estadísticamente significativas respecto a 2,5ng/ml 6 días (p<0,05).* 66
Figura 24. Imagen macroscópica de una membrana de PRGF de 100μm. 67
Figura 25. Resultados de carga máxima (N) de la membrana amniótica (AM) y las membranas de PRGF de 100 y 500μm. 68
Figura 26. Resultados de tensión máxima (Mpa) de la membrana amniótica (AM) y las membranas de PRGF de 100 y 500μm. 68
Figura 27. Resultados de deformación máxima de la membrana amniótica (AM) y de las membranas de PRGF de 100 y 500μm. 69
Figura 28. Módulo de Young de la membrana amniótica (AM) y las membranas de PRGF de 100 y 500μm. 69
Figura 29. Imágenes de la ultraestructura de las membranas de PRGF obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (1600x,3000x, 3000x, 6000x,12000x y 50000x). 70
Figura 30. Imágenes de la ultraestructura de la membrana amniótica obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (1600x,3000x, 6000x y 1600x). 71
Figura 31. Microfotografía representativa del área de crecimiento celular a partir de los explantes de limbo tras 7 días de cultivo en medio de cultivo completo (A) y basal (B) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento y en medio completo (C) y basal (D) suplementados con suero bovino fetal. Obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 40 aumentos. 72
Figura 32. Área de crecimiento (mm^2) a partir de los explantes de limbo esclerocorneal en medio de cultivo completo (MC) y medio de cultivo basal (MB) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) o suero bovino fetal (FBS). p<0,05, **p<0,01.* 73

Figura 33. Número de células en los medios de cultivo completo (MC) y basal (MB) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) o suero bovino fetal (FBS). p<0,05.* 73*
Figura 34. Microfotografía representativa de los cultivos de células epiteliales limbares en medio de cultivo completo (A) y basal (B) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento y en medio completo (C) y basal (D) suplementados con suero bovino fetal. Obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 10 aumentos. 74
*Figura 35. Microfotografía representativa de la clasificación de los cultivos según griteríos morfológicos. Obtenida mediante microscopía de contraste de fases a 10 aumentos. **MC**: Medio completo. **MB**: Medio basal. **PRGF**: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. **FBS**: Suero bovino fetal. 75*
Figura 36. Microfotografía representativa de la expresión de marcadores en los cultivos de células epiteliales limbares en los distintos medios de cultivo. MC: Medio completo. MB: Medio basal. PRGF: Plasma Rico en Factores de Crecimiento. FBS: Suero bovino fetal. Obtenida mediante microscopía de fluorescencia. 76
Figura 37. Imagen macroscópica representativa de colonias teñidas con rodamina tras 12 días de cultivo en medio completo (A) y basal (B) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento y en medio completo (C) y basal (D) suplementados con suero bovino fetal. 77
Figura 38. Porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) en medio completo (MC) y basal (MB) suplementados con Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) o suero bovino fetal (FBS). 77

GLOSARIO

Alogénico: Relativo a tejidos procedentes de la misma especie pero diferentes desde el punto de vista antigénico.

Anillo corneoescleral: Porción de tejido sobrante tras la disección de la córnea que corresponde con la localización del limbo.

Autólogo: Relativo a un tejido o estructura que deriva del mismo individuo.

Caracterizar: Determinar los peculiares atributos de algo o alguien, de forma que se distinga de los demás.

Células cebadoras o *feeder*: Células utilizadas en técnicas de cultivo celular para promover el crecimiento de otras células de diferente origen.

Cicatrización: Proceso por el cual los tejidos vivos reparan un área dañada.

Desarrollar: Aumentar o reforzar algo de orden físico intelectual o moral. Exponer con orden y amplitud una cuestión o un tema.

Eficiencia formadora de colonias: Medida de la capacidad celular para originar nuevas colonias, corresponde con el porcentaje de células sembradas que forman una colonia.

Estandarizar: Establecer un modelo, norma, patrón o referencia.

Explante: Porción del anillo corneoescleral de 1-2 mm^2.

Haze: Opacidad de la córnea.

Industrialización: Conjunto de operaciones materiales ejecutadas para la obtención, transformación o transporte de uno o varios productos naturales.

Kit: Conjunto de productos y utensilios suficientes para conseguir un determinado fin, que se comercializan como una unidad.

Matriz o *scaffold*: Estructura tridimensional que sirve como soporte para adhesión, migración y proliferación celular en ingeniería de tejidos.

Medicina regenerativa: Disciplina que tiene como objetivo la reposición o regeneración de células, tejidos u órganos dañados estructural y funcionalmente.

Membrana amniótica: Capa más interna de la placenta compuesta por una membrana basal y un estroma avascular.

Microquimerismo: presencia en el cuerpo humano de células procedentes de otros organismos genéticamente distintos.

Plasma rico en plaquetas: Volumen de plasma autólogo que contiene una concentración de plaquetas superior al nivel basal (150.000-350.000/ µl).

Regeneración: Proceso de renovación o restauración.

Terapias avanzadas: Tratamiento que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y del que se alega que tiene propiedades, se emplea o se administra a las personas para regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano.

Xenogénico: Referente a los tejidos de diferentes especies que, por tanto, son antigénicamente diferentes.

CRÉDITOS

Este trabajo ha sido financiado en parte por el programa Retos-Colaboración del Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación Orientada a los Retos de la Sociedad, en el marco del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016, por la Fundación Mª Cristina Masaveu Peterson y por la Fundación Ramón Areces.

Además se ha contado con la colaboración científica, de laboratorio y técnica de la Fundación Eduardo Anitua y de BTI Biotechnology Institute.

ANEXOS

Publicaciones relacionadas con el presente trabajo:

Riestra AC, Vazquez N, Chacon M, Orive G, Anitua E, Meana A, Alfonso JF, Merayo-Lloves J. **Plasma rich in growth factors for the culture of human limbal stem cells**. Pendiente publicación.

Riestra AC, Alonso-Herreros JM, Merayo-Lloves J. **Platelet rich plasma in ocular surface**. Arch Soc Esp Oftalmol. 2016.

Merayo-Lloves J, Sanchez-Avila RM, Riestra AC, Anitua E, Begona L, Orive G, et al. **Safety and Efficacy of Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops for the Treatment of Evaporative Dry Eye**. Ophthalmic Res. 2016. Índice de impacto: 1,422

Merayo-Lloves J, Sanchez RM, Riestra AC, Anitua E, Begoña L, Orive G, Fernandez-Vega L. **Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eyedrops in Refractory Cases of Ocular Surface Disorders.** Ophthalmic Res. 2015 Nov 17;55(2):53-61. Índice de impacto: 1,422.

Anitua E, de la Fuente M, Riestra A, Merayo-Lloves J, Muruzabal F, Orive G. **Preservation of Biological Activity of Plasma and Platelet-Derived Eye Drops After Their Different Time and Temperature Conditions of Storage.** Cornea. 2015 Sep;34(9):1144-8. Índice de impacto: 2.042.

Anitua, E., Muruzabal, F., Tayebba, A., Riestra, A., Perrez, V., Merayo-Lloves, J., Orive, G. **Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies**. Acta Ophthalmol. 2015 Apr 2. Índice de impacto: 2.512.

Anitua, E., de la Fuente, M., Muruzabal, F., Riestra, A., Merayo-Lloves, J., Orive, G. **Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts**. Exp Eye Res. 2015 Jun;135:118-26. Índice de impacto: 3.017.