



Universidad Miguel Hernández

Facultad de Medicina

Departamento de Patología y Cirugía

TESIS DOCTORAL

**CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO DEL
PLASMA RICO EN PLAQUETAS UTILIZADO PARA
OFTALMOLOGÍA (E-PRP) Y COMPARACIÓN TRAS DIFERENTES
MÉTODOS DE CONSERVACIÓN**

AUTORA

Alejandra Eliana Rodríguez Zunino

DIRECTORES

Prof. Dr. Jorge L. Alió y Sanz

Dr. Jorge L. Alió del Barrio

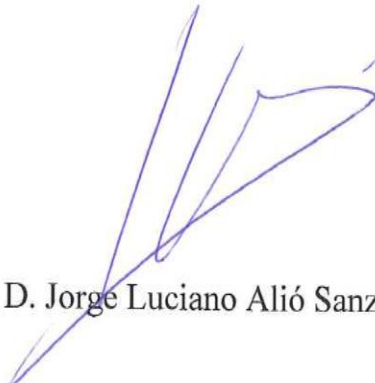
Alicante 2017


D. Jorge Luciano Alió Sanz y D. Jorge Luis Alió del Barrio
como Directores de la Tesis Doctoral

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “Cuantificación de los factores de crecimiento del plasma rico en plaquetas utilizado para oftalmología (E-PRP) y comparación tras diferentes métodos de conservación” realizado por D./Dña. Alejandra E. Rodríguez Zunino ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis Doctoral en la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Lo que certifico en Sant Joan d’Alacant a veintiocho de Julio de dos mil diecisiete.


D. Jorge Luciano Alió Sanz


D. Jorge Luis Alió del Barrio



DÑA. SUSANA JIMÉNEZ MORENO, DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y CIRUGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE.

CERTIFICA:

Que, D/Dña. Alejandra E. Rodríguez Zunino ha realizado bajo la coordinación de este Departamento su memoria de tesis doctoral titulada *“Cuantificación de los factores de crecimiento del plasma rico en plaquetas utilizado para oftalmología (E-PRP) y comparación tras diferentes métodos de conservación”* cumpliendo todos los objetivos previstos, finalizando su trabajo de forma satisfactoria para su defensa pública y capacitándole para optar al grado de doctor.

Lo que certifico en Sant Joan d'Alacant a veintiocho de julio de dos mil diecisiete.


Miguel Hernández
DEPARTAMENTO
PATOLOGÍA Y CIRUGÍA



DEDICATORIA

A mis padres, por enseñarme el camino a seguir y por su infinito amor

A Horacio, por ser mi compañero, mi soporte, mi amor

A mis hijos, Matías y Sofía, por ser lo mejor de mi vida



AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros de Vissum, que a lo largo de los años han compartido conmigo el día a día, y de los que siempre he recibido un inmenso cariño.

A mis directores de tesis, Prof. Dr. Jorge Alió y Dr. Jorge Alió del Barrio por su guía, su apoyo y dedicación a este trabajo.

A Laurent Bataille, por confiar en mí cada día e impulsarme a afrontar este proyecto.

A Sandra Gisbert, por su dedicación, profesionalidad y gran colaboración en la realización de este trabajo.

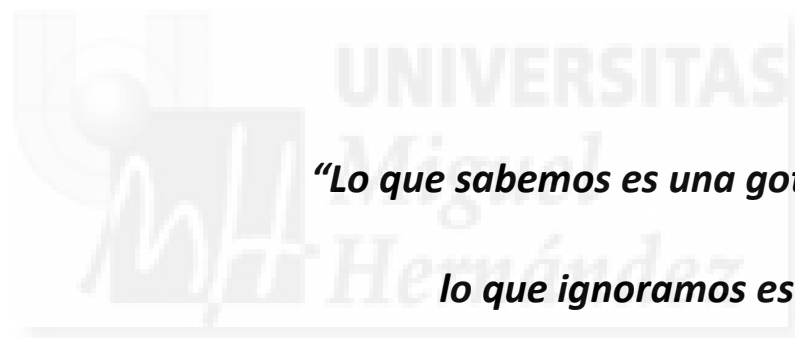
A Ángel Sánchez, por resolver mis dudas sobre las p , α , β y σ .

A Liliana, por sus acertados comentarios.

A mi familia, a los que he robado interminables momentos mientras redactaba esta tesis y, aun así, han estado allí apoyándome y ayudándome en todo lo posible.

A todos, muchas gracias.





*“Lo que sabemos es una gota de agua,
lo que ignoramos es el océano”*

Isaac Newton



ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	7
Agradecimientos	9
Abreviaturas	17
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Plaquetas	24
1.1.1. Activación de las plaquetas	27
1.2. Factores de crecimiento	28
1.2.1. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	30
1.2.2. Factor de crecimiento transformante β (TGF-B)	32
1.2.3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	33
1.2.4. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	34
1.3. Fibronectina	36
1.4. Propiedades de los derivados sanguíneos con y sin plaquetas ..	37
1.5. Inflamación y derivados sanguíneos	43
1.6. Actividad antimicrobiana del PRP	47
1.7. Obtención de derivados sanguíneos utilizados en oftalmología	48
1.7.1. E-PRP (Eye-Platelet Rich Plasma)	49
1.7.2. Sistemas “cerrados” de obtención de PRP	52
1.7.3. Suero autólogo	56
1.8. Aplicaciones clínicas de los derivados sanguíneos	59
2. JUSTIFICACIÓN	65
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
3.1. Hipótesis	73

3.2.	Objetivos	73
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	75
4.1.	Materiales	77
4.1.1.	Recursos humanos	77
4.1.2.	Material fungible	77
4.1.3.	Aparatos	79
4.2.	Métodos	84
4.2.1.	Selección de individuos	84
4.2.2.	Extracción de sangre	86
4.2.3.	Preparación del E-PRP	86
4.2.4.	Procedimientos y conservación	90
4.2.5.	Determinación de factores de crecimiento	91
4.2.6.	Análisis estadístico	94
5.	RESULTADOS	97
5.1.	Voluntarios	99
5.2.	Cuestionario OSDI	99
5.3.	Recuento de células sanguíneas	100
5.3.1.	Recuento de plaquetas	100
5.3.2.	Recuento de glóbulos rojos	102
5.3.3.	Recuento de leucocitos	104
5.4.	Concentración de factores de crecimiento y fibronectina	105
5.5.	Análisis estadístico de los datos	113
5.5.1.	Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	115
5.5.2.	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB)	117
5.5.3.	Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1)	119
5.5.4.	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A)	121

5.5.5. Fibronectina	122
5.6. Análisis de correlaciones	123
5.6.1. Correlaciones E-PRP Fresco	124
5.6.2. Correlaciones E-PRP Congelado	126
6. DISCUSIÓN	129
6.1. Recuento de células sanguíneas	132
6.2. Cuantificación de factores de crecimiento y fibronectina, y comparaciones entre métodos	135
7. CONCLUSIONES	149
8. REFERENCIAS	153





ABREVIATURAS (Por orden alfabético)

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CD40L	Ligando CD40L
Cl₂Ca	Cloruro cálcico
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
DS	Desviación standard
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzimoimmunoensayo
E-PRP	Plasma rico en plaquetas para oftalmología
FC	Factor de crecimiento/s
FGFb	Factor de crecimiento fibroblástico básico
F-PRP	Plasma rico en plaquetas libre de leucocitos
HConF	Fibroblastos conjuntivales humanos
HK	Queratinocitos humanos
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
IL	Interleuquina
LASIK	Laser in situ keratomileusis
LCD	Pantalla de cristal líquido

LOPD	Ley Orgánica de protección de datos
L-PRF	Plasma rico en fibrina con leucocitos
L-PRP	Plasma rico en plaquetas con leucocitos
LXA4	Lipoxina A4
MMP	Metaloproteinasa
MUC5AC	Mucina 5AC
OSDI	Ocular Surface Disease Index
PDGF-AA	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AA
PDGF-AB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas AB
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB
PDGFRs	Receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas
PF	Factor plaquetario
PMPs	proteínas microbidas de las plaquetas
PRGF	Plasma rico en factores de crecimiento
PRP	Plasma rico en plaquetas
RANTES	Citoquina expresada y secretada por el linfocito T normal en función de su grado de activación.
rpm	Revoluciones por minuto

SA	Suero autólogo
ST	Sangre total
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β 1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF-A	Factor de crecimiento del endotelio vascular
y col.	Y colaboradores





INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes situaciones por las que la superficie ocular puede alterarse, ya sea de una forma leve como el ojo seco o exposición ambiental, hasta otra muy severa que puede incluso comprometer la visión llegando hasta la ceguera como en el caso del penfigoide cicatricial ocular o el Síndrome de Steven Johnson (1).

Algunas de las condiciones que producen desórdenes de la superficie ocular son la sequedad ocular, queratoconjuntivitis seca, erosiones corneales recurrentes, defectos epiteliales persistentes, queratopatías neurotróficas, síndrome de la superficie ocular tras LASIK, úlceras corneales tórpidas, enfermedad de injerto contra huésped, penfigoide cicatricial ocular (1), entre otras.

Tras la alteración o lesión del tejido conjuntival o corneal sobreviene un proceso biológico de regeneración para restaurar esa superficie ocular dañada. Este es un proceso complejo en el que intervienen las células madre epiteliales de la córnea y la conjuntiva ya que son las responsables de la homeostasis y la regeneración de la superficie ocular (2), así como factores de crecimiento, citoquinas y elementos de la matriz extracelular (3).

Estos procesos fisiológicos naturales de restauración del tejido dañado son actividades permanentes que ocurren en nuestro cuerpo sin ser

conscientes de ello, pero hay situaciones en las que por la gravedad del daño o por la incapacidad del propio organismo de resolver la situación, es necesaria la administración de tratamientos para solventar el problema.

Los tratamientos comprenden desde la administración de lágrimas artificiales tópicas hasta la práctica de complejas cirugías de restauración de la superficie ocular como los trasplantes de córnea en sus diversas modalidades (1,4–7).

Dentro del gran abanico de posibilidades terapéuticas disponibles, los tratamientos convencionales a veces no resultan efectivos para resolver la condición patológica.

En este aspecto, la administración de productos derivados de la sangre como opción terapéutica ha adquirido un gran protagonismo, debido a su composición biológica y su capacidad para inducir la regeneración de los tejidos afectados (8–10).

1.1. PLAQUETAS

Las plaquetas fueron descubiertas en 1882 y han sido presentadas tradicionalmente como restos citoplasmáticos de los megacariocitos (11). En la actualidad se considera que son células anucleadas que proceden de los megacariocitos de la médula ósea que tras un complejo mecanismo de maduración nuclear y citoplasmática se convierten en plaquetas libres (12).

En un adulto sano el intervalo fisiológico de las plaquetas es de 150-400x10³ células/ml, con una producción media de alrededor 1x10¹¹ plaquetas diarias (13).

La función principal de las plaquetas o trombocitos es la de garantizar la hemostasia y evitar la pérdida de sangre cuando se rompen los vasos sanguíneos. En este proceso, se adhieren al colágeno subendotelial expuesto, forman un tapón plaquetario y luego se activan (14).

Las plaquetas también participan en la activación de la cascada de la coagulación y hemostasia secundaria (15). La rotura accidental de las plaquetas produce la formación de cierta cantidad de trombina, y si la trombina generada es lo suficientemente grande se desencadenan los mecanismos que convierten el fibrinógeno en fibrina formándose el trombo compuesto por fibrina y eritrocitos. La trombosis provoca infartos de miocardio si el órgano afectado es el corazón (16) y apoplejía si ocurre en los vasos del cerebro (17).

Aunque su papel central es en la prevención del sangrado, las plaquetas contribuyen a diversos procesos que se extienden más allá de la hemostasia y la trombosis, incluyendo la promoción de respuestas inflamatorias e inmunitarias, el mantenimiento de la integridad vascular y la contribución a la cicatrización de heridas.

Las plaquetas pueden reclutar leucocitos y células progenitoras a sitios de lesión vascular y trombosis; almacenan, producen y liberan productos

proinflamatorios, factores antiinflamatorios y angiogénicos y micropartículas en la circulación, además de estimular la generación de trombina (18).

En la microscopia electrónica, se observan las diferentes organelas que contienen las plaquetas: mitocondrias, peroxisomas, ribosomas, glucógeno y gránulos, estos últimos se dividen en tres tipos: gránulos *alfa*, *delta* o densos y *lambda* (19).

Los gránulos alfa de las plaquetas contienen más de 30 proteínas bioactivas y es que a pesar de la ausencia de núcleo y de ADN, las plaquetas cuentan con un sistema para realizar la síntesis proteica, poseen copias de ARNm para casi un tercio de las proteínas conocidas en el genoma humano, procesan el ARNm y traducen eficazmente distintas proteínas (20).

Estas proteínas desempeñan funciones de reparación de los tejidos e influyen en la reactividad vascular de las células sanguíneas, en la angiogénesis y la inflamación (21). Las proteínas secretadas por los gránulos alfa también intervienen en la defensa celular frente a agentes exógenos mediante la producción de proteínas señalizadoras que atraen a los macrófagos.

Las plaquetas son esenciales para la respuesta inmune innata y para combatir infecciones causadas por virus, bacterias, u otros microorganismos.

Ayudan a mantener y modular la inflamación y son una fuente importante de moléculas pro-inflamatorias ya que secretan P-selectina, factor tisular, CD40L y metaloproteinasas.

También participan en enfermedades de la piel, alergias, artritis reumatoide o enfermedad hepática; mientras que, paradójicamente, el plasma autólogo rico en plaquetas y los concentrados de plaquetas se utilizan como una ayuda para promover la reparación tisular y el crecimiento celular (22).

1.1.1. Activación de las plaquetas

En condiciones fisiológicas, las plaquetas se encuentran circulando en forma no activa y en su superficie expresan un número relativamente pequeño de moléculas, las cuales en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y células de su entorno (13).

Las plaquetas cambian de forma con la activación debido a modificaciones complejas en el esqueleto y citoesqueleto de su membrana. Con la activación experimentan la liberación de los gránulos, cuerpos densos y del contenido de los lisosomas.

Esta activación, también conocida como degranulación, puede ser causada por un estímulo físico, químico o una combinación de ambos, y provoca que los gránulos alfa se fundan con la membrana de las plaquetas, donde algunas de las proteínas secretoras (por ejemplo, ciertos factores de

crecimiento) pasan al estado activo y así son liberadas al exterior donde se unen a los receptores de las células diana (células endoteliales, epiteliales, osteoblastos, entre otros) (23).

Los factores de crecimiento liberados por las plaquetas activadas inician y modulan la cicatrización debido a que inducen la quimiotaxis, proliferación y diferenciación celular, neovascularización y deposición de matriz extracelular (24).

Específicamente, los gránulos alfa constituyen el mayor reservorio de factores de crecimiento y mitogénicos que se liberan durante la activación plaquetaria. Estos factores están implicados en procesos de quimiotaxis, proliferación celular, diferenciación y angiogénesis, promoviendo así la cicatrización (22,25).

Dada la importancia que tienen en este estudio, se describen a continuación los factores de crecimiento y proteínas del plasma más relevantes involucrados en la regeneración.

1.2. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento (FC) lo forman un grupo de sustancias de naturaleza peptídica cuya función es la comunicación intercelular a nivel molecular. Estos son capaces de modificar las respuestas biológicas celulares ya que intervienen regulando los procesos de migración, proliferación, diferenciación y metabolismo celular, e incluso la apoptosis.

La función principal que desempeñan los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular. Estos promueven el aumento del tamaño celular al incrementar la síntesis proteica de las células sobre las que actúan (26).

Los FC más importantes provenientes de las plaquetas son el FC Transformante β (TGF- β), FC fibroblástico básico (FGFb), FC derivado de plaquetas (PDGF), FC del endotelio vascular (VEGF), FC tejido conectivo (CTGF), el FC insulínico tipo 1 (IGF-1), y el FC epidérmico (EGF) (27).

Los factores de crecimiento actúan de manera local. La estimulación celular, se puede realizar mediante un sistema autocrino, mecanismo por el cual las células producen y responden al mediador biológico. O por un sistema paracrino en el que la célula que genera el factor se encuentra en las proximidades de las células sobre las cuales actúa.

Generalmente, los FC, son sintetizados en forma de precursores, por lo que se precisa de un proceso de proteólisis para su liberación en la forma activa. El mecanismo de acción que llevan a cabo, comienza al unirse a receptores específicos de membrana, existiendo para cada FC un receptor o conjunto de receptores específicos. El proceso esta mediado por un sistema de segundos mensajeros que activan una cascada de señales, por lo que, gracias a este mecanismo, la acción de los factores no cesa en el lugar de la lesión, aunque hayan desaparecido del medio, ya que han activado la vía de segundos mensajeros.

A parte de los gránulos alfa de las plaquetas que constituyen un gran reservorio de factores de crecimiento, existen otros tipos celulares productores de estas moléculas como son los fibroblastos, osteoblastos, células endoteliales, leucocitos, monocitos y macrófagos (26).

1.2.1. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)

El FC derivado de plaquetas (PDGF) es un conocido modulador de la mitosis celular de fibroblastos y la quimiotaxis (28). Promueve indirectamente la angiogénesis a través de los macrófagos por un mecanismo de quimiotaxis (29).

En estudios realizados, se ha demostrado la expresión de PDGF-AA, PDGF-BB, y PDGF-AB y sus correspondientes receptores en córnea humana, y su participación en la proliferación y quimiotaxis en ensayos con cultivos de fibroblastos corneales humanos, demostrando que el factor PDGF-BB posee un efecto quimiotáctico significativamente mayor en comparación con PDGF-AA o PDGF-AB. Debido al efecto quimiotáctico que presenta PDGF en la cicatrización de heridas corneales, se plantea la hipótesis de que dicho factor regula el quimioatrayente de neutrófilos, IL8 (30)(31).

Los estudios realizados con PDGFs y sus receptores (PDGFRs) en el desarrollo animal y en enfermedades han revelado su función como FC en organogénesis, cáncer, inflamación vascular y fibrosis tisular (32).

El PDGF-BB se usa para mejorar la cicatrización de heridas en la práctica clínica desde hace unos 25 años (33). El PDGF-BB humano recombinante, denominado becaplermina, se ha introducido en la clínica como un tratamiento tópico para las úlceras diabéticas neuropáticas crónicas de extremidades inferiores (33).

También se ha utilizado contra úlceras por presión y para acelerar la cicatrización en diversos procedimientos quirúrgicos. Los mecanismos de reparación tisular inducidos por PDGF-BB parecen implicar la proliferación de fibroblastos, la producción de colágeno y la formación de neovasos (34) y pueden implicar efectos directos en células mesenquimales que expresan PDGFR- α (35).

Su eficacia clínica se ha demostrado en varios estudios de fase III (36) (Smiell y col., 1999), y los resultados combinados sugieren que la aplicación tópica de PDGF-BB es segura y bien tolerada. Un estudio con más de 900 pacientes confirmó que el tratamiento tópico con PDGF mejoró la cicatrización de úlceras crónicas de pie de diabéticos de espesor completo (37).

La administración local de PDGF-BB también se ha probado en pacientes con enfermedad periodontal severa y se ha encontrado que aumentan los biomarcadores para el metabolismo óseo y la rotación (38) y proporcionan regeneración periodontal mejorada (39).

1.2.2. Factor de crecimiento transformante β (TGF-B)

El FC transformante β (TGF- β) es multifuncional y uno de los factores más importantes que intervienen en la modulación del comportamiento de los tejidos oculares. Además, este ligando participa en la migración celular y la proliferación, la muerte celular, la síntesis de proteínas durante el desarrollo, reparación de los tejidos, entre otros procesos fisiológicos o patológicos (40).

TGF- β es una citoquina intrigante que exhibe una actividad dual en enfermedades malignas. Por un lado es un mediador importante de la invasión del cáncer, metástasis y angiogénesis, mientras que por otro lado, exhibe funciones antitumorales (41).

En la mayoría de los casos, el TGF- β mejora la producción de la matriz extracelular y suprime la proliferación celular, por ejemplo, la de células epiteliales en presencia de otros factores. Por otra parte, este FC también es capaz de inducir la producción de otros factores tales como el FC de tejido conectivo (CTGF), el FC derivado de plaquetas (PDGF), FC derivado de los fibroblastos (FGF), y FC endotelial vascular (VEGF), así como estimular su propia producción. Todos ellos juegan un papel importante en la restauración del tejido normal tras sufrir una lesión (27).

Existen tres isoformas del TGF- β , denominadas TGF- β 1, β 2 y β 3 cuya presencia se encuentra en los tejidos de mamíferos, sin embargo, su expresión no es uniforme.

Como en otros tejidos, la sobreactivación de TGF- β subyace en la patogénesis de enfermedades oculares que pueden dar lugar al deterioro de la visión y a la alteración de la homeostasis del tejido ocular. Por ello, se puede considerar la posibilidad de desarrollar estrategias terapéuticas para tales enfermedades orientadas a la vía de señalización del TGF- β (40).

La vía de señalización TGF- β desempeña un papel clave en la función de los fibroblastos oculares, su diferenciación y su proliferación. La supresión de la vía TGF- β ha mostrado una disminución de la deposición de la matriz extracelular en los fibroblastos oculares in vitro (42).

Por otra parte, se ha demostrado que la Ciclosporina A inhibe el TGF- β 2 inducido por los miofibroblastos de fibroblastos de pterigión humano obtenidos de cultivo primario (43), por lo que estos resultados podrían indicar el potencial terapéutico de la Ciclosporina A contra la progresión del pterigión.

1.2.3. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

El FC epidérmico (EGF), desempeña un papel muy importante en la migración y proliferación del epitelio corneal para mejorar los procesos de regeneración tisular, así como la estimulación del tejido de granulación.

Estudios demuestran que el efecto mitogénico del EGF en la proliferación de las células epiteliales de la córnea, precisa de la supresión de la expresión del gen Pax-6 específica del ojo. Los fibroblastos, los

proosteoblastos y precondrocitos expresan un alto número de receptores para EGF (44).

Por otro lado se conoce que el EGF aumenta la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ y activa la proteinquinasa ERK $\frac{1}{2}$ para estimular la secreción de mucina de las células caliciformes conjuntivales (45). Se sabe además, que la cicatrización del epitelio corneal es estimulada por el EGF y está parcialmente mediada a través de la vía 12/15-LOX-LXA4 (46).

Para lograr un proceso de cicatrización de heridas ideal que promueve el crecimiento sano de tejido con menos cicatrización, se preparó un sistema de administración tópica de fármacos basado en gel compuesto de 3 polímeros diferentes quitosano, sulfato de dextrano y polivinilpirrolidona K30 (CDP). Aplicado de forma tópica, el EGF evidenciaba efectos claramente beneficiosos acelerando el proceso de curación de heridas y produciendo menos cicatrización (47).

1.2.4. Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)

El FC endotelial vascular (VEGF), ha sido conocido durante mucho tiempo por ser un estimulador potente de la proliferación de los vasos sanguíneos. Es un mitógeno celular endotelial, factor angiogénico y un potente mediador de la permeabilidad vascular, además de estar implicado en el crecimiento de los nervios (48).

Los experimentos realizados in vitro han demostrado que VEGF y sus receptores son expresados por las neuronas y estimulan la proliferación de neuronas corticales, otorga protección a las neuronas centrales y periféricas frente a la muerte inducida por hipoxia y promueve el crecimiento axonal en neuronas periféricas (49).

Por otro lado, la sobreexpresión de VEGF es un factor que contribuye al desarrollo de enfermedad. Por ejemplo, los tumores sólidos requieren un aumento de suministro de sangre si van a seguir creciendo más allá de un cierto tamaño y los tumores que expresan VEGF son capaces de seguir creciendo, este proceso es denominado angiogénesis (50).

La sobreexpresión de VEGF también puede conducir a enfermedad vascular en la retina y otras partes del cuerpo. Una disminución del nivel de VEGF en las arterias pulmonares se ha asociado además con la condición de enfisema pulmonar (50).

Dado que el crecimiento del cáncer es estimulado por VEGF, los investigadores han hecho numerosos intentos de disminuir su expresión para prevenir la angiogénesis y el crecimiento tumoral. Dos fármacos que han tenido éxito en frenar la progresión de las enfermedades que dependen de VEGF son bevacizumab y ranibizumab (51).

1.3. FIBRONECTINA

La fibronectina es una proteína de adhesión, que se encuentra libre en el plasma, y es un constituyente principal de la composición de la matriz extracelular. Los niveles de fibronectina en plasma son aproximadamente de $300 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ (52).

Esta proteína ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de interactuar con diversas células y macromoléculas, influyendo en su comportamiento y en las reacciones bioquímicas de diversos sistemas, así como en una gran variedad de procesos fisiológicos como la fagocitosis, proliferación, adhesión y migración celular (53,54).

La fibronectina es capaz de unirse a la fibrina, al colágeno, a glicosaminoglicanos, a la heparina, a ciertos proteoglicanos y a proteínas de la membrana plasmática celular como las integrinas. Por tanto, establece uniones entre moléculas de la matriz extracelular y entre moléculas de las células con la matriz extracelular. Las moléculas de fibronectina pueden aparecer formando fibras insolubles en los tejidos conectivos o solubles en el plasma de los fluidos corporales, como la sangre (55).

Entre sus principales funciones, se encuentra la de intervenir en la remodelación de los tejidos durante la embriogénesis y participar en el proceso de cicatrización de una lesión tras la formación de un coágulo de fibrina, generado por la activación del sistema hemostático (56).

1.4. PROPIEDADES DE LOS DERIVADOS SANGUÍNEOS CON Y SIN PLAQUETAS

Los hemoderivados han mostrado su capacidad para mejorar la curación y estimular la regeneración de diferentes tejidos, efecto que es debido a los factores de crecimiento y proteínas bioactivas que se sintetizan y están presentes en la sangre (21).

El plasma rico en plaquetas (PRP) es un derivado sanguíneo obtenido mediante centrifugación de la sangre total que se caracteriza por poseer una alta concentración de plaquetas (29).

En la Tabla 1 se muestran los factores de crecimiento más importantes que se encuentran en el plasma rico en plaquetas, de qué células derivan y cuáles son sus principales funciones (57).

Tabla 1. Factores de crecimiento contenidos en el plasma rico en plaquetas		
Factor de crecimiento (FC)	Origen	Función
<i>FC Transformante β (TGF-β)</i>	Plaquetas, matriz ósea y cartilaginosa, macrófagos, monocitos, neutrófilos, «natural killer»,	Proliferación de células mesenquimales indiferenciadas, inhibición de la proliferación linfocitaria y macrofágica, interviene regulando: - Mitogénesis endotelial, fibroblástica y osteoblástica - Síntesis de colágeno y secreción

	células TH1 activadas	de colagenasas - Efecto mitogénico de otros FC. - Quimiotaxis endotelial y angiogénesis.
<i>FC Fibroblástico básico (FGFb)</i>	Plaquetas, macrófagos, células mesenquimales, condrocitos y osteoblastos	Estimula mitogénesis, crecimiento y diferenciación de condrocitos y osteoblastos y la mitogénesis de células mesenquimales
<i>FC Derivado de plaquetas (PDGF)</i>	Plaquetas, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, monocitos, células musculares lisas	Estimula mitogénesis de células mesenquimales y osteoblastos; mitogénesis y quimiotáxis de células estirpe fibroblástica, glial y muscular lisa; regula secreción colagenasas; estimula mitogénesis mesenquimal y epitelial
<i>FC del Endotelio vascular (VEGF)</i>	Plaquetas, células endoteliales	Incrementa angiogénesis, permeabilidad vascular y mitogénesis de células endoteliales
<i>FC Tejido conectivo (CTGF)</i>	Plaquetas	Promueve angiogénesis, regeneración condral, fibrosis y adhesión plaquetaria
<i>FC Epidérmico (EGF)</i>	Plaquetas, macrófagos y monocitos	Estimula quimiotaxis endotelial y angiogénesis; regula secreción de colagenasas; estimula mitogénesis de células mesenquimales y epiteliales
<i>Fuente: De La Mata y col. Reumatol Clin. 2013;9(3):166–171</i>		

Además de las plaquetas, el plasma contiene algunas moléculas de adhesión celular tales como la fibrina, la fibronectina y vitronectina las cuales proporcionan soporte estructural para la migración celular, la proliferación y el crecimiento tridimensional en los tejidos en los que actúan (23).

Por otro lado, las citoquinas PF4 y CD40L presentes en el plasma promueven la reparación de tejidos e influyen en la reactividad vascular de las células sanguíneas, en la angiogénesis y la inflamación (21).

Se han realizado diferentes ensayos in-vitro para estudiar y tratar de entender el efecto que producen en las células y los tejidos los diferentes tipos de preparados sanguíneos basados en plaquetas.

Hartwig y col. estudiaron la capacidad epiteliotrófica de concentrados de plaquetas y suero en células humanas del epitelio corneal. Tras la estimulación observaron un aumento significativo en la proliferación celular del concentrado de plaquetas. Los efectos de migración y diferenciación celular fueron positivos con ambos preparados, pero ligeramente mayores con el suero (58).

Siguiendo esta línea de trabajo, en 2005 realizaron otro estudio también en células epiteliales humanas en un modelo de cultivo celular in vitro. Esta vez compararon la capacidad epiteliotrófica de las células cuando se enfrentaban con plasma fresco congelado (sin plaquetas) y con suero. Los resultados de proliferación, migración y diferenciación celular fueron significativamente mejores en el suero que en el plasma fresco congelado (sin plaquetas). En este estudio, ninguno de los preparados estudiados

contenía plaquetas, pero se infería que la mayor capacidad epiteliotrófica del suero podría deberse a la mayor concentración de mediadores de la proliferación como los factores de crecimiento EGF y PDGF, y al mayor contenido de vitamina A (59).

En un posterior ensayo, compararon la capacidad epiteliotrófica corneal utilizando tres diferentes preparados sanguíneos; suero, plasma fresco congelado y un concentrado de plaquetas que era activado con trombina. En este caso, los resultados de proliferación celular fueron mejores con el concentrado de plaquetas que con el resto, mientras que el suero mostró mejores resultados de migración y diferenciación celular (60).

El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) es otro derivado sanguíneo, que como su nombre lo indica, presenta una alta concentración factores de crecimiento; y que por su forma de preparación no contiene plaquetas (61).

Estudios realizados con cultivos de fibroblastos humanos obtenidos de la piel, sinovia y tendón, revelaron una respuesta proliferativa significativa en todas estas células cuando fueron estimuladas con diferentes preparaciones de PRGF. La máxima proliferación ocurría con concentraciones de PRGF desde el doble hasta el cuádruple de la inicial. También observaron que el PRGF aumentaba la síntesis de ácido hialurónico pero que no alteraba la producción del colágeno tipo I; y que la síntesis de VEGF ocurría solo en las células del tendón. Concluyeron entonces, que los efectos biológicos del PRGF pueden depender de la concentración de plaquetas aplicada y del tipo de células empleadas (62,63).

Ensayos más recientes han estudiado los efectos biológicos del PRGF y del suero autólogo en cultivos de queratocitos del estroma corneal (HK) y en fibroblastos conjuntivales (HConF). Los resultados mostraron niveles significativos más altos de todos los factores de crecimiento analizados en el PRGF cuando se comparaba con en el suero autólogo. También se observó que el PRGF produjo un aumento significativo de los resultados biológicos tanto de las células HK como de las HConF, y redujo la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos inducida por TGF- β 1 en contraste con el suero autólogo. Este último hallazgo sugiere que el PRGF puede mejorar el tratamiento de la cicatrización de heridas oculares superficiales minimizando la formación de cicatrices en comparación con AS, mientras que promueve la proliferación y migración celular (64,65).

Freire y col. hicieron un estudio comparando los efectos del suero autólogo, PRP y PRGF sobre cultivos de células corneales humanas. Todos los compuestos presentaron altos niveles de factores de crecimiento, pero los valores de del factor de crecimiento EGF fueron más elevados con PRGF que con el resto. Los índices de proliferación celular fueron más altos con suero autólogo y con PRGF. (66)

Posteriormente, los mismos autores realizaron un ensayo experimental en conejos, en los que indujeron una erosión corneal para luego tratarla con los mismos 3 derivados sanguíneos anteriores. Todos los compuestos mejoraron la cicatrización pero las corneas tratadas con suero autólogo y PRGF se curaron más rápidamente (67).

Se han realizado además, estudios experimentales pero con sentido clínico practicando queratectomía fotorefractiva (PRK) a ratones C57BL/6 para

valorar el proceso de curación tras la aplicación de plasma rico en factores de crecimiento. Los animales controles mostraron mayor índice de haze corneal y el epitelio que se había generado era hiperplásico, mientras que los tratados con PRGF presentaron una mayor regeneración del epitelio corneal y menor haze (68).

Estudios más recientes han demostrado la capacidad del s-PRGF de promover la proliferación y migración de células epiteliales y corneales de conejo, y acelerar la reepitelización corneal en los ensayos in-vivo (69).

Existen otros estudios en los que los derivados sanguíneos ricos en plaquetas, han demostrado consistentemente potenciar la proliferación, migración y diferenciación de células madre, con variadas aplicaciones en la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa (70–73).

Además de los hemoderivados mencionados, basados en plasma con o sin plaquetas, encontramos el suero autólogo (SA) que también se utiliza en el ámbito de la Oftalmología. El suero autólogo, aunque no contiene plaquetas, sí presenta cantidades variables de factores de crecimiento, por eso está incluido en este apartado (74).

Los estudios de toxicidad in vitro utilizando células del epitelio corneal humanas, han demostrado una toxicidad reducida cuando se comparaba con hipromelosa sin conservante, utilizada para preparar lágrimas artificiales (75).

Varios estudios experimentales han demostrado además sus propiedades regenerativas. El suero autólogo potencia el efecto regenerativo de las células madre mesenquimales en córneas de rata dañadas (76). Además,

promueve la migración y diferenciación de las células del epitelio corneal (58,59).

El suero autólogo también presenta cantidades elevadas de EGF e induce la proliferación de células epiteliales de la córnea humana (66), promoviendo de esta manera la reepitelización corneal en conejos a los que se había practicado un debridamiento previo del epitelio (67).

Además, se ha observado que el suero autólogo aumenta la expresión conjuntival de la mucina MUC5AC, aumentando como consecuencia la densidad de células caliciformes en la conjuntiva, principalmente en pacientes con ojo seco severo (77).

1.5. INFLAMACIÓN Y DERIVADOS SANGUÍNEOS

Hay muchos grupos de investigación que han estudiado los marcadores de inflamación en diferentes preparados sanguíneos con plaquetas con resultados variables, sobre todo por las diferencias en los métodos de preparación del PRP (73).

De hecho, hay varios que están a favor de la presencia de leucocitos en sus formulaciones, como Dohan y col. que compara su preparado de fibrina rica en plaquetas (PRF) con diferentes derivados sanguíneos. En este estudio determina las concentraciones de 3 citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, y TNF- α), la citoquina anti-inflamatoria IL-4 y el promotor de la angiogénesis VEGF. Sus resultados revelaron que el PRF podría ser un nodo de regulación inmune con capacidad de retrocontrol

inflamatorio. Este concepto podría explicar la reducción de las infecciones postoperatorias cuando el PRP se utilizaba como aditivo quirúrgico (78).

Otros ensayos han demostrado los efectos del PRP sobre la liberación de citoquinas de los monocitos y la generación de la lipoxina A4 (LXA4) que es un antiinflamatorio endógeno. En este caso, el PRP promovió cambios significativos en la liberación de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias mediada por monocitos e incrementó la lipoxina A4. Esto sugiere que el PRP puede suprimir la liberación de citoquinas, limitar la inflamación, y por tanto, promover la regeneración de tejidos (79).

Mazzocca y col. evaluaron in vitro los efectos antiinflamatorios del PRP, el ketorolaco y la metilprednisolona en células endoteliales de vena umbilical humana. Aunque el PRP y el ketorolaco no produjeron una reducción tan significativa en los marcadores de inflamación celular como la metilprednisolona, redujeron la inflamación celular en comparación con el control. Por lo que concluyeron que el PRP puede tener aplicación clínica como medicamento antiinflamatorio inyectable (80).

Por su parte, Schar y col. estudiaron los niveles de varios factores de crecimiento y de la citoquina inflamatoria IL-1 β en preparados de plasma rico en plaquetas con leucocitos (L-PRP). En este ensayo los niveles de IL-1 β y VEGF fueron significativamente menores en el L-PRP que en el suero autólogo, demostrando su menor poder pro-inflamatorio y angiogénico (81).

Siguiendo esta misma línea de trabajo, Anitua y col. realizaron el mismo ensayo, pero comparando una matriz de plasma rico en plaquetas con

leucocitos (L-PRP) con una matriz de PRGF sin leucocitos. La concentración de todos los factores de crecimiento liberados fue comparable entre ambos métodos, no encontrándose diferencias entre ellos. Pero luego de 3 días de incubación en las matrices de L-PRP los niveles de VEGF disminuyeron drásticamente. Por su parte, la inclusión de leucocitos en la matriz L-PRP produjo un aumento significativo de las citoquinas proinflamatorias, IL-1 β e IL-16, con respecto a las matrices de PRGF que presentaron valores muy bajos. Las matrices de PRGF se mantuvieron estables durante los 8 días de incubación (82).

El agregado posterior de leucocitos a las matrices de PRGF estimuló un ambiente más pro-inflamatorio, segregando más cantidades de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-16 y TNF-alfa, alterando de esta manera las propiedades de la fibrina (83).

Se ha estudiado, además, la inactivación del plasma por calor, a 56°C con el objeto de reducir la actividad del complemento y de la inmunoglobulina E, y así poder aplicarlo en pacientes con enfermedades autoinmunes. Los ensayos de migración y proliferación celular dieron buenos resultados con el plasma calentado a 56°, en comparación con el plasma sin calentar. Por otra parte, la mayoría de las proteínas y morfogenes involucrados en la cicatrización se preservaron adecuadamente (84).

Para evaluar el poder antiinflamatorio del plasma rico en factores de crecimiento, se enfrentó la sangre de pacientes con la enfermedad de injerto contra huésped a fibroblastos de la superficie ocular en un ambiente pro-inflamatorio (IL-1 β , y TNF-alfa). Los resultados concluyeron que aún en ese ambiente, el plasma rico en factores de crecimiento tenía

poder regenerativo y que además presentaba un efecto antiinflamatorio (85).

En un paso más allá hacia el control de los efectos antiinflamatorios de los derivados sanguíneos, algunos autores han estudiado los efectos de productos derivados de la sangre alogénicos.

Stenwall y col. han investigado la composición de citoquinas y los efectos antiinflamatorios de preparados de suero alogénico para valorar su mejor uso como colirio. Para ello el suero de 15 donantes fue inactivado y luego se estudió la capacidad reguladora de inducir células T (86).

Aunque la inmensa mayoría de derivados sanguíneos usados en oftalmología es de origen autólogo, hay algunos autores que han tratado a pacientes con suero de naturaleza alogénica.

Chiang y col. aplicaron suero alogénico de familiares a pacientes con defecto epitelial persistente en los que no era viable o adecuado utilizar suero autólogo, y ninguno de los pacientes presentó un efecto adverso durante el tratamiento (87).

Por su parte, otros investigadores han aplicado suero alogénico en pacientes de ojo seco severo que padecían de enfermedad de injerto contra huésped, en los que no era posible aplicar suero autólogo. Los paciente mejoraron sus síntomas y signos de sequedad y no presentaron efectos adversos (88,89).

1.6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PRP

En busca de más propiedades y efectos biológicos del plasma rico en plaquetas, varios autores han estudiado su capacidad antimicrobiana.

Además de la gran cantidad de proteínas y factores de crecimiento, han descubierto que el plasma rico en plaquetas libera agentes inmunomoduladores con actividad antimicrobiana como las proteínas microbicidas de las plaquetas (PMPs), trombocidinas, RANTES, péptido activador del tejido conectivo, y factor plaquetario 4 (PF-4), entre otras (90,91).

Otros autores han estudiado directamente el efecto inhibitorio de los concentrados de plaquetas frente a distintos cultivos de microorganismos.

Drago y col. demostró la capacidad inhibitoria del PRP frente a cepas obtenidas de la cavidad oral de *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus oralis*, pero no de *Pseudomonas aeruginosa* (92).

En general, la mayoría de los autores coincide en los efectos inhibitorios del PRP frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* ya sean meticilino-sensibles o meticilino-resistentes (92–94) y a *Streptococcus agalactiae* (92,94); pero difieren en la actividad antimicrobiana del PRP frente a *Escherichia coli* (94,95) y a *Enterococcus faecalis* (92,95). Todos coinciden en la incapacidad del PRP de inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (92,95).

1.7. OBTENCIÓN DE DERIVADOS SANGUÍNEOS UTILIZADOS EN OFTALMOLOGÍA

La denominación y forma de obtención de los productos preparados con derivados sanguíneos en la literatura es muy diversa, y suscita malentendidos continuos en lectores, científicos y revisores (96); por lo que se intentará clarificar este aspecto en la medida de lo posible.

Inicialmente, el término “PRP” fue descrito por Marx (23,97), y en general, hace referencia a un proceso de centrifugación en dos pasos, por el que se obtiene un plasma rico en plaquetas que posteriormente se activa con cloruro de calcio o trombina, inmediatamente antes de su utilización. Este PRP tiene una consistencia de gel o coágulo, o incluso más sólido como malla de fibrina y siempre se había utilizado en procedimientos quirúrgicos como adyuvante de la cicatrización, además de aplicaciones directas sobre úlceras de piel en pacientes diabéticos.

Dado que existe una inmensa variedad de sistemas para obtener derivados sanguíneos autólogos, con cantidades variables de plaquetas y factores de crecimiento, nos centraremos en los utilizados en el ámbito de la Oftalmología, que son los relacionados con el tema de esta tesis.

1.7.1. E-PRP (Eye-Platelet Rich Plasma)

El acrónimo E-PRP proviene de su denominación en inglés como “Eye-PRP” (Eye- Platelet Rich Plasma) y se refiere al plasma rico en plaquetas que se usa en Oftalmología.

El término E-PRP fue introducido por Alió y col. (8) para diferenciarlo del término “PRP” que había sido utilizado en sus publicaciones anteriores relacionadas con este tema (98–100) y que suscitaba confusiones en la literatura. El proceso de obtención de E-PRP es diferente al utilizado por Marx et al (23).

El E-PRP es muy versátil ya que es posible utilizarlo como colirio (sin activar), como coágulo (activado), o como membrana autóloga de fibrina (activado). El E-PRP autólogo en forma de colirio se utiliza como tratamiento tópico ocular para diversas patologías de la superficie ocular (98–100) y en forma de coágulo o membrana autóloga de fibrina en procedimientos quirúrgicos para la reconstrucción de la superficie ocular (98,101,102).

La obtención de E-PRP para uso oftalmológico se lleva a cabo mediante un proceso de centrifugación en un solo paso y la tasa final de la concentración de plaquetas dependerá de si será utilizado como colirio, como coágulo, o como membrana autóloga de fibrina.

Para preparar el E-PRP se requiere:

- La sangre se recoge en 10 tubos estériles, cada uno de 10 ml con 1ml de citrato de sodio 3,2% (Monovette, Stardest) para evitar la coagulación.
- Centrifugación en centrífuga convencional de laboratorio: 10 min a 1600 rpm (9). Estas condiciones pueden variar dependiendo de la centrífuga y el tamaño de los tubos utilizados.
- Separación del plasma rico en plaquetas en campana de flujo laminar, en estrictas condiciones de esterilidad y con material desechable.
- 10 frascos cuentagotas de cristal, estériles: se colocan 4 ml de E-PRP en cada uno de ellos (en el caso de que se prepare como colirio).
- Cloruro de calcio 10%: 50µl por cada 1 ml de E-PRP (si es necesario activar el E-PRP).
- Para tener un control más exhaustivo del proceso de obtención, se puede utilizar un hemocitómetro o contador de células hemático para conocer los parámetros hematológicos de la sangre entera antes de la centrifugación (hematocrito, recuento de hematíes, leucocitos, plaquetas) y después de la preparación del E-PRP (recuento de hematíes, leucocitos y plaquetas).

En estas condiciones el E-PRP resultante presenta un índice de enriquecimiento de plaquetas de 1,6 a 2,5 veces sobre los valores basales (sangre total).

El colirio de E-PRP es un compuesto 100% autólogo ya que no contiene ningún aditivo.

En la Figura 2 se pueden observar las distintas fases de la preparación del E-PRP a partir de la sangre centrifugada.

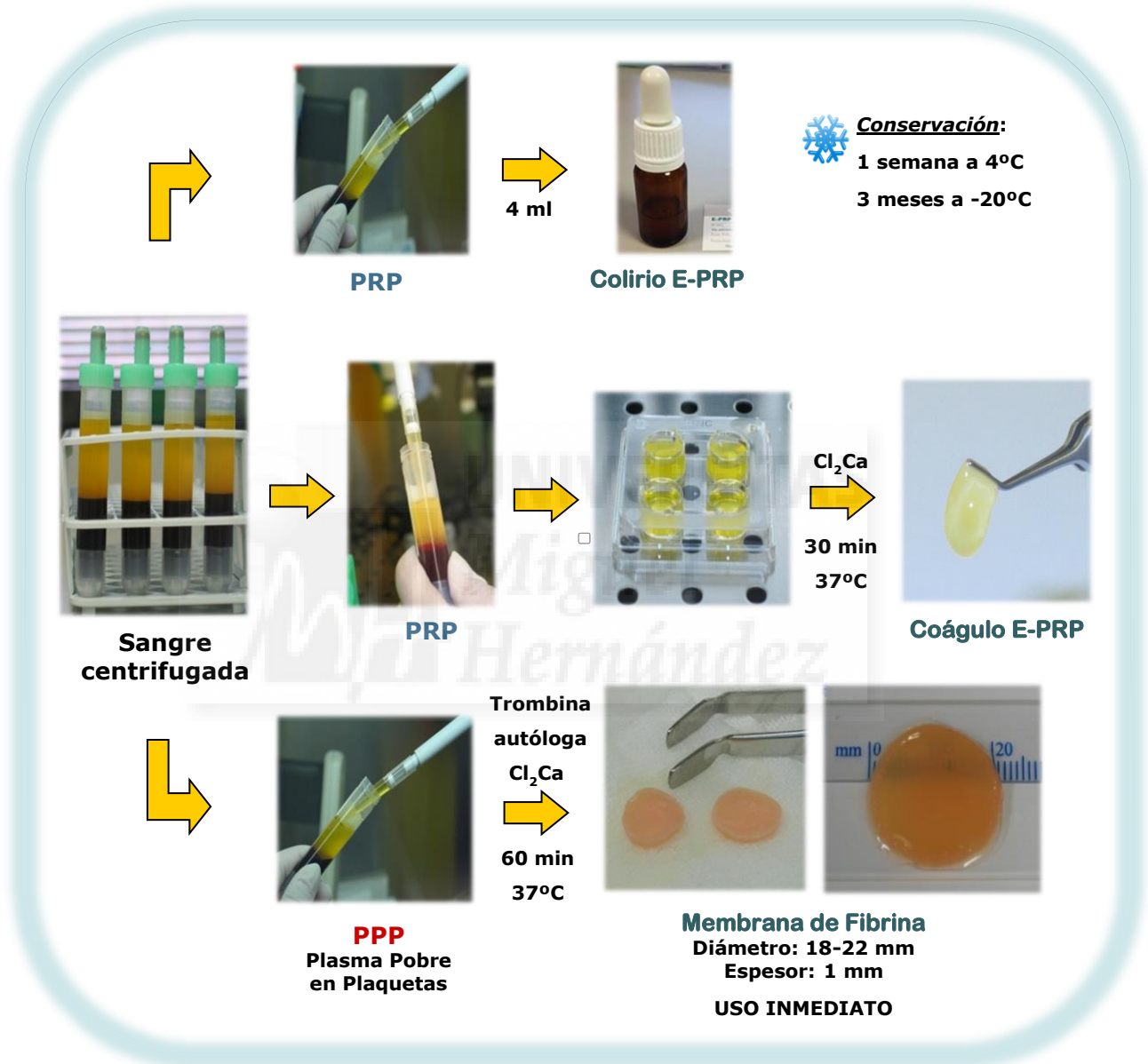


Figura 2. Diagrama de preparación de los distintos tipos de E-PRP (colirio, coágulo, membrana de fibrina). *Fuente: Imagen y fotos propias.*

A los pacientes se les instruye sobre cómo lavarse las manos antes de usar el producto, y sobre cómo realizar una correcta aplicación evitando el contacto del cuentagotas con cualquier parte del ojo. Estas prevenciones se llevan a cabo con el fin de evitar una posterior contaminación.

Un frasco de E-PRP (4 ml) en uso puede mantenerse a 4°C durante una semana, tras la cual debe ser descartado. El resto de los frascos de E-PRP deberán mantenerse congelados a -20°C hasta un máximo de 3 meses.

Este sistema de preparar el plasma rico en plaquetas se denomina “abierto” ya que es necesario abrir los tubos con sangre para su manipulación, por eso se deben realizar bajo condiciones de esterilidad.

1.7.2. Sistemas “cerrados” de obtención de PRP

Existen otros métodos de obtención de plasma rico en plaquetas con un sistema “cerrado”, es decir se manipulan los tubos para obtener el PRP, pero sin abrir los tubos, mediante un sistema con jeringas y agujas.

Estos sistemas son kits comerciales, que constan de tubos para la extracción de sangre especialmente diseñados, y un material fungible propio. En general, hay que adquirir la centrífuga específica para ese kit comercial, ya que viene con los parámetros de centrifugación establecidos y no pueden ser modificados por el usuario.

1.7.2.1. RegenKit® BCT

Es un sistema cerrado de producción de plasma rico en plaquetas. El RegenKit® BCT pertenece a la empresa RegenLab USA. Está aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) (Figura 3).

Denomina al producto A-PRP, sigla que viene del inglés: Autologous Platelet-Rich Plasma.

Cada tubo Regen BCT con 8 ml de sangre genera de 4 a 5ml de plasma autólogo enriquecido con plaquetas, a una concentración de 1.6 de los niveles basales.



Figura 3. Kit comercial RegenKit® BCT de RegenLab USA.
Fuente: Web del producto

1.7.2.2. ANGEL®

Sistema cerrado de obtención de plasma rico en plaquetas del proveedor Arthrex.

Dispositivo fundamentado en un equipo de centrifuga más software que mediante sistema de tubos y de centrifugaciones programadas, obtiene el PRP.

En la Figura 4 se observan los componentes del Sistema ANGEL®.



Figura 4. Componentes del Sistema ANGEL®, Arthrex.

Fuente: Web del producto

Requiere experiencia por parte del usuario y permite seleccionar el grado de concentración plaquetaria en un amplio rango (3x a un 18x).

El dispositivo que actúa como fraccionador de plasma es la propia centrifugadora con un complejo conjunto de fungibles. El contenido no queda expuesto al medio ambiente.

Las aplicaciones clínicas del producto obtenido con esta técnica requieren de un alto conocimiento por parte del usuario.

1.7.2.3. PRGF Endoret®

La sigla PRGF, viene de su denominación en Inglés y significa Plasma Rico en Factores de Crecimiento.

La preparación de este PRGF se realiza con un sistema de tipo cerrado. Requiere un kit comercial PRGF Endoret® de BTI (Biotechnology Institute, S.L., Miñano, Álava, España). Es necesario adquirir el kit y la centrifuga específica (BTI System IV, Vitoria, España). Se basa en una técnica de doble centrifugación y activación.

La empresa BTI dispone de un certificado europeo de esterilidad del producto acabado.

En la Figura 5 se observan los componentes del Kit comercial PRGF Endoret®.



Figura 5. Kit comercial PRGF Endoret[®], BTI.

Fuente: Web del producto.

Pasos:

- 1^º centrifugación: obtención del plasma rico en plaquetas, utilizando centrífuga específica (580g durante 8 minutos).
- Recolección del plasma y activación (producto provisto en el kit).
- Incubación del plasma en tubos de cristal a 37°C durante 1 hora.
- 2^º centrifugación: 1000g durante 10 minutos.
- Separación del plasma rico en factores de crecimiento y almacenaje en mini viales.
- Dispensación en viales de colirio de que pueden mantenerse en nevera o a temperatura ambiente por 3 días.
- Se puede conservar hasta 3 meses congelado a -20°C (103).

1.7.3. Suero autólogo

El suero autólogo, a diferencia del plasma, se obtiene de sangre sin anticoagulante. Dado que en el coágulo quedan atrapados todos los

componentes celulares, el suero autólogo carece de plaquetas, y cualquier otra célula. Ver Figura 6.

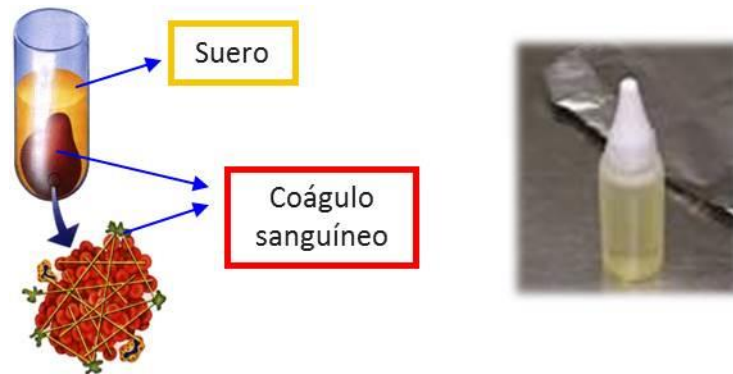


Figura 6. Fracciones obtenidas en la preparación del suero autólogo.
Fuente: Lopez-García y col. Arch Soc Esp Oftalmol. 2007 Jan;82(1):9-20.

Se considera un método “abierto” ya que para su preparación es necesario abrir los tubos para manipular la sangre.

Aunque los métodos empleados para obtener el suero autólogo no suelen seguir protocolos estandarizados, excepto muy pocos (104), y los resultados obtenidos de la bibliografía son extremadamente dispares; los pasos básicos para obtención del suero autólogo serían:

- Coagulación espontánea de la sangre extraída sin anticoagulante.
- Centrifugación.
- Separación del suero / almacenamiento
- Dilución.
- Conservación

Para su preparación se utiliza sangre sin anticoagulante. Se deja que la sangre coagule espontáneamente en los tubos durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se centrifuga para liberar el suero del coágulo con hematíes y leucocitos. Algunos autores prefieren esperar hasta 2 horas (104).

Con respecto a la centrifugación, en la literatura existen discrepancias en cuanto a la cantidad las revoluciones por minuto (rpm) empleadas y al tiempo de centrifugación empleados para su separación (67,104–106). Una opción estándar sería 3000 rpm durante 15 min, que no produce hemólisis y separa una adecuada cantidad de suero (aproximadamente la mitad del volumen de sangre total) manteniendo las propiedades inalteradas (66).

La mayoría de los autores realiza la preparación del suero autólogo con suero fresco, continuando con el procedimiento inmediatamente posterior a su separación (59,104,107–109). Pero aquí tampoco hay consenso y algunos autores optan por congelar el suero a -80°C para prepararlo en otro momento (106).

En relación a la dilución posterior que se hace al suero autólogo, como era de esperar, tampoco hay un acuerdo entre los autores. Algunos de ellos optan por la dilución al 20% (104,106,110) y otros lo utilizan al 50% (75,109,111–113). Incluso algunos, también lo utilizan al 100% cuando no obtienen los resultados esperados (75). La mayoría de los autores utiliza el suero fisiológico 0,9% para su dilución, mientras que otros usan solución salina balanceada (BSS) (114) o hialuronato sódico (111).

Por su parte, algunos realizan un filtrado posterior a su elaboración para eliminar cualquier eventual contaminación. Para ello utilizan un jeringa con filtros de 0,22 μm de poro que aseguran la eliminación de bacterias (104,111,115).

Con respecto a la conservación, la mayoría coincide que conservarlo hasta 3 meses congelado a -20°C no altera las propiedades del suero autólogo (104,108,109). Incluso alguno autores aseveran que un almacenamiento a -20°C durante 9 meses no altera la concentración de los factores de crecimiento (74).

1.8. APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS DERIVADOS SANGUÍNEOS

La superficie ocular comprende al tejido corneal y conjuntival incluyendo todas sus capas celulares. Estas estructuras interactúan con otras, como los párpados con sus glándulas lagrimales y de Meibomio para mantener un adecuado film lagrimal y contribuir a la homeostasis del ojo. Hay muchas situaciones y patologías específicas que afectan este complejo equilibrio produciendo una descompensación y alterando en consecuencia la superficie del ojo. En este sentido, la patología más frecuente que afecta a la superficie ocular es el Síndrome de Ojo Seco desde sus estados leves hasta los muy severos en los que se ve comprometida la visión de los pacientes (116).

Los tratamientos habituales incluyen una variedad inmensa de lágrimas artificiales, lubricantes con contenido lipídico, spray liposomales, insertos, antiinflamatorios, inmunosupresores como la ciclosporina A o

regeneradores de la matriz extracelular, además de otros procedimientos como la oclusión de puntos lagrimales o los tratamientos más recientes con luz pulsada intensa (IPL) (117,118).

Las estrategias terapéuticas en alteraciones de la superficie ocular se centran cada vez más en el uso de tratamientos de acción múltiple, menos artificiales y sin potenciales alérgenos como los conservantes u otros productos que podrían inducir toxicidad en una superficie ocular muy vulnerable. Estas terapias han de ser eficaces en la reducción de la sintomatología y prevención de las complicaciones tardías, con poca o nula respuesta alérgica, sin efectos secundarios y sin alterar la homeostasis del ojo.

Los derivados sanguíneos para el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular se han estado utilizando desde hace ya mucho tiempo con resultados muy prometedores. Uno de los primeros registros en el ámbito de la Oftalmología pertenece a Rosenthal et al (119), que en el año 1975 utilizó una mezcla de plaquetas autólogas, fibrinógeno y trombina como adhesivo de superficie ocular para la fijación de queratoplastias lamelares en conejos.

Uno de los preparados sanguíneos más populares y utilizados hasta la actualidad en el ámbito de la oftalmología, es el suero autólogo. Aunque hay registros más antiguos (120), fue a partir de que Fox y col. (115) y Tsubota y col. (5) publicaran sus trabajos para el tratamiento del ojo seco con síndrome de Sjögren, que el uso del suero autólogo se hizo más popular. Desde esa época se han llevado a cabo una gran variedad de estudios para demostrar su eficacia clínica en el tratamiento del ojo seco,

defectos epiteliales, ojo seco post LASIK y otras alteraciones de la superficie ocular (58,75,104,106,107,121–124).

Pero ha sido recientemente que se han publicado varios trabajos comparando los efectos del suero autólogo con otros derivados sanguíneos como el PRP o el PRGF (66,67,125).

El primer autor en utilizar el plasma rico en plaquetas (PRP) en el campo de la Oftalmología fue Alió y col. en 2007 para tratar úlceras corneales neurotróficas (98). Luego continuó utilizando el colirio de E-PRP para el tratamiento de ojo seco (100), en el síndrome de superficie ocular post LASIK (99) y otras alteraciones de la superficie ocular (8).

Además de las aplicaciones tópicas como colirio, el E-PRP puede prepararse en forma de coágulo o de membrana de fibrina, y puede utilizarse como adyuvante en procesos quirúrgicos de reconstrucción de superficie ocular. En algunos casos de perforación corneal han utilizado la membrana autóloga de fibrina con coágulos de E-PRP en el sitio de la injuria para sellar la perforación y así recuperar esa córnea (101); y en otros han utilizado coágulos de E-PRP conjuntamente con membrana de pericardio bovino (Tutopatch®) para reparar la herida (102). También ha empleado esta técnica de reconstrucción quirúrgica conjuntamente con membrana amniótica (98).

Otros colaboradores también han utilizado esta técnica de reconstrucción quirúrgica de la superficie ocular con coágulos y membrana de fibrina autóloga a base de E-PRP (126,127), así como también en forma de colirio para ver la regeneración tras Lasik (128).

Kim y col. emplearon el PRP para tratar defectos epiteliales que no resolvían luego de infecciones corneales, y lo compararon con el suero autólogo. Los índices de cicatrización del epitelio corneal fueron significativamente mayores con el PRP que con el suero autólogo (129). Lee y col. utilizaron la misma preparación de PRP de Kim y col. 2012 para erosiones corneales recurrentes, resultando efectivo para disminuir el índice de recurrencia (130).

Además, el PRP se ha inyectado en las glándulas lagrimales de pacientes con disfunción lagrimal severa y ojo seco severo, mejorando la producción de lágrima y disminuyendo la queratitis asociada (131).

Otros autores, han utilizado con éxito el PRP como adyuvante durante la cirugía de agujero macular en pacientes con alta miopía (132).

Los derivados plaquetarios han sido utilizados además en infiltraciones subconjuntivales para el tratamiento de causticaciones corneales (133) .

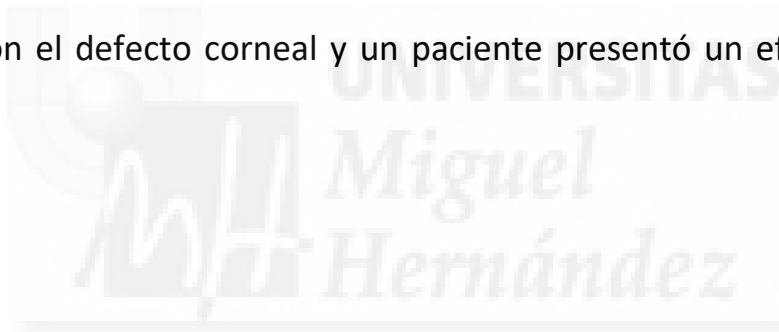
Por su parte, el PRGF autólogo ha sido utilizado para múltiples propósitos por Anitúa y col. desde 1999 (61), y se ha empleado desde entonces en varias áreas de la medicina (134–136).

Pero no fue hasta 2010 que el PRGF comenzó a utilizarse en el ámbito de la Oftalmología. López-Plandolit y col. emplearon el PRGF diluido al 50% para tratar defectos epiteliales corneales persistentes en 18 pacientes. Los resultados mostraron una recuperación de los defectos epiteliales en el 85% de los casos (137).

Posteriormente, los mismos autores evaluaron los resultados del PRGF diluido al 20% en casos de ojo seco. Observaron una reducción en los síntomas y una mejoría en la metaplasia escamosa, aunque esta no era estadísticamente significativa (138).

Por su parte, Merayo y col. utilizó preparados de PRGF Endoret para el tratamiento de pacientes con ojo seco evaporativo (139) y en pacientes con desórdenes de la superficie ocular refractario a los tratamientos convencionales con resultados satisfactorios (140).

Más recientemente, Sánchez-Ávila y col. utilizaron el PRGF para tratar queratitis neurotróficas en estadios 2 y 3. La mayoría de los pacientes resolvieron el defecto corneal y un paciente presentó un efecto adverso (141).





JUSTIFICACIÓN





2. JUSTIFICACIÓN

Ya se ha mencionado la necesidad de tratamientos que recuperen la funcionalidad de la superficie ocular con los mínimos efectos adversos posibles.

Resulta necesario entender mejor las propias estrategias del cuerpo ante agresiones y cómo aprovecharlas, con el fin de desarrollar terapias mínimamente invasivas que aprovechen y refuercen las propias defensas inmunológicas, evitando sustancias irritantes, tóxicas o ajenas a la propia fisiología. En este sentido, los tratamientos con sustancias autólogas como la sangre cumplirían todas estas condiciones. Concretamente, las plaquetas tienen un claro protagonismo en la reparación de daños tisulares, ya que constituyen un gran reservorio de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular esenciales y proteínas bioactivas, que inducen quimiotaxis, proliferación y diferenciación celular, neovascularización y deposición de matriz extracelular (22,142).

En cuanto a los derivados sanguíneos empleados en oftalmología existe una inmensa variedad de productos, entre ellos, el suero autólogo, el PRP tradicional, el E-PRP, el PRGF, el coágulo de plaquetas o la membrana autóloga de fibrina (10,143).

Cada uno de estos productos varía en su preparación, estructura, composición y concentración de factores de crecimiento.

Las diferentes formas de preparar los derivados sanguíneos proporcionan un producto final diferente con cada una de ellas, haciendo aún más difícil las comparaciones de su respuesta clínica.

Como ya hemos mencionado, el plasma rico en plaquetas para uso oftalmológico o E-PRP difiere del PRP tradicional utilizado en otros ámbitos de la medicina.

El PRP tradicional se obtiene a partir de dos centrifugaciones y contiene todos los leucocitos y gran cantidad de glóbulos rojos, por lo que el producto final es de color rojo. Esto hace inviable su uso como colirio para su aplicación en la superficie ocular (29,129,130,144–147).

En cambio, el E-PRP, a partir de una sola centrifugación concentra el mayor número de plaquetas posible y está libre de glóbulos rojos y leucocitos (los recuentos celulares de estos dos tipos celulares son mínimos). El aspecto del producto final es del color del plasma, por lo que puede presentar diferentes tonalidades de amarillo y es opalescente debido al gran número de plaquetas en suspensión. Las plaquetas se mantienen inactivadas, por lo que pueden desempeñar sus funciones en el sitio de aplicación proporcionando una liberación continua y fisiológica de sus factores de crecimiento (8,9,127).

El E-PRP se utiliza para el tratamiento de diferentes afectaciones de la superficie ocular desde hace bastante tiempo con óptimos resultados. Primeramente se aplicó en úlceras corneales que no curaban adecuadamente, ya sea en forma de colirio o como coágulo de E-PRP en los casos más severos conjuntamente con membrana amniótica (98).

Luego se utilizó en pacientes con disfunción de la superficie ocular tras LASIK (99,128) y en pacientes con ojo seco de diversa gravedad (8,100). Posteriormente se utilizó en forma de coágulo debajo de parches de pericardio bovino (Tutopatch®) en úlceras corneales severas o perforaciones corneales (102,126). En un paso más hacia el concepto de regeneración completamente autóloga y dada su gran versatilidad, se emplearon, en este mismo tipo de pacientes, coágulos de E-PRP pero debajo de una membrana de fibrina también autóloga (8). Ya sean los parches de pericardio bovino como la membrana autóloga de fibrina, se suturaban a la conjuntiva y luego se practicaba una tarsorrafia parcial (9,127).

Por su parte, el PRGF se prepara a partir de dos centrifugaciones. En la primera se concentran las plaquetas (al igual que en el E-PRP), luego se procede a su activación con cloruro cálcico, incubación, se vuelve a centrifugar y por último se filtra. Todos estos pasos hacen que su preparación sea más laboriosa. En el caso del PRGF Endoret, además hay que contar que todo el material necesario debe ser adquirido específicamente para el procedimiento ya que no se utilizan tubos ni centrífugas convencionales. El producto final es de color amarillo, límpido ya que no contiene células en suspensión y gran cantidad de factores de crecimiento (148).

Por otro lado, está el suero autólogo que requiere de una incubación previa de la sangre sin anticoagulante, una centrifugación para separar el coágulo sanguíneo del suero exudado y una dilución posterior (20% o 50%) en suero fisiológico, BSS o hialuronato sódico. El producto final es

límpido y casi incoloro o con un leve tono amarillo debido a la dilución, sin plaquetas y sin leucocitos, pero con cantidades variables de factores de crecimiento y citoquinas provenientes del proceso de coagulación de la sangre entera (149).

El suero autólogo (74,111,150) y el PRGF (84,103) han sido ampliamente caracterizados y hay estudios comparativos entre ambos, en los que se reflejan las concentraciones de los factores de crecimiento de los distintos preparados y se contrastan los resultados (64,125).

Por el contrario, a pesar de que se ha utilizado en la clínica no hay suficiente información sobre el plasma rico en plaquetas usado para oftalmología E-PRP, en lo que se refiere a determinación de las concentraciones de los factores de crecimiento más importantes y de su adecuada conservación para su posterior uso como tratamiento para las diferentes afecciones de la superficie ocular.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS





3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El plasma rico en plaquetas para uso en Oftalmología E-PRP concentra adecuadamente las plaquetas minimizando el contenido de otras células sanguíneas, provee de una alta concentración de factores de crecimiento y proteínas de adhesión y puede ser almacenado a -20°C conservando sus propiedades.

3.2. OBJETIVOS

De acuerdo a la hipótesis de investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- I.** Determinar la concentración de plaquetas, de leucocitos y glóbulos rojos en la sangre total y el E-PRP.
- II.** Cuantificar la presencia de los factores de crecimiento en el E-PRP:
 - A.** Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB)
 - B.** Factor de crecimiento transformante β (TGF- β)
 - C.** Factor de crecimiento epidérmico (EGF)
 - D.** Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)
 - E.** Fibronectina
- III.** Comparar la concentración de los factores de crecimiento del E-PRP fresco y E-PRP congelado a -20°C durante 3 meses, con o sin centrifugación posterior.



MATERIALES Y MÉTODOS





4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

Recursos humanos

Material fungible

Aparatos

4.1.1. Recursos humanos

El grupo de voluntarios estaba comprendido por seis individuos sanos (n=6), sin patología ocular, con edades comprendidas entre 23 y 46 años (media de 32.5 ± 7.7), vecinos de la población de Alicante.

4.1.2. Material fungible

Material estéril utilizado para la toma y procesamiento de las muestras:

- Palomillas Multyfly 21 G (Sarstedt®). Figura 7
- Tubos de vacío de 9 ml, con 1ml de citrato sódico 3,2% (Monovette®-Sarstedt). Figura 7.
- Puntas de pipeta automática de 5-50 μ l, 10-100 μ l y 100-1000 μ l.
- Pipetas de 5 y 10 ml.
- Tubos de 50 ml graduados (Labclinics®).
- Tubos cónicos de 1,5 ml.



Figura 7. Palomillas Multyfly 21 G para punción venosa y tubos de vacío Monovette® - Sarstedt. *Fuente: Imagen propia.*

Material complementario:

- Gasas estériles
- Alcohol 70° y 96°
- Agua destilada
- Cuaderno de recogida de datos
- Material bibliográfico
- Material fotográfico

Material para la determinación de los factores de crecimiento:

- Kits ELISA eBioscience® (Figura 8)



Figura 8. Kits ELISA eBioscience® para determinación de factores de crecimiento y fibronectina. *Fuente: Imagen propia.*

4.1.3. Aparatos

- Centrífuga de laboratorio convencional Digicen 20 (Orto-Alresa®).

Control de parámetros digital que incluye velocidad, tiempo de centrifugado, temperatura del interior, tiempo y velocidad de frenado, porta-tubos basculantes y pantalla de LCD (Figura 9).



Figura 9. Centrífuga convencional Digicen 20 (Orto-Alresa®).
Fuente: Imagen propia.

- Contador de células sanguíneas Mythic 18, Orphée®

Analizador de hematología automático con pantalla táctil que tras la aspiración de 8 μ l de muestra provee resultados del recuento de glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, hematocrito, y hemoglobina, entre los parámetros más importantes (Figura 10).



Figura 10. Contador hematológico Mythic 18, Orphée®
Fuente: Web del producto.

- Cabina de flujo laminar Faster BHG 2004®.

Cabina de seguridad biológica para manipular la sangre de los pacientes y preparar el E-PRP en completa esterilidad (Figura 11).



Figura 11. Cabina de flujo laminar Faster BHG 2004®.

Fuente: Imagen propia.

- Pipetas automáticas.

Pipeta Finnpiquette® 100-1000µl para separar el plasma de los glóbulos rojos.

Pipetas Finnpiquette® 5-50 µl y 10-100 µl para cargar muestras en placas de ELISA.

Pipeta multicanal Eppendorf con 12 puntas, para la aplicación simultánea de reactivos y soluciones de lavado en las placas de 96 pocillos durante la técnica ELISA (Figura 12).



Figura 12. Pipetas automáticas. *Fuente: Imagen propia.*

- Agitador mecánico Bio-Shaker PSU-2T PLUS, BOECO®

Agitador de laboratorio orbital, de mesa, digital, para placas de ELISA. Necesario para los períodos de incubación durante la realización de la prueba.



Figura 13. Agitador mecánico orbital Bio-Shaker PSU-2T PLUS, BOECO®
Fuente: Web del producto.

- Lector de placa ELISA Tecan Sunrise™ Basic

Lector de placas multipocillos para realizar la lectura de la absorbancia del color desarrollado tras la técnica ELISA, antes y después de agregar la solución de stop. Se complementa con el uso del software Maguellan™ para la obtención de los datos y cálculo de las concentraciones de los distintos factores de crecimiento (Figura 14).



Figura 14. Lector de placa ELISA Tecan Sunrise™ Basic
Fuente: Imagen propia.

4.2. MÉTODOS

Selección de individuos

Extracción de sangre

Preparación del E-PRP

Procedimientos y conservación

Determinación de factores de crecimiento

Análisis estadístico

4.2.1. Selección de individuos

Este estudio fue llevado a cabo de acuerdo a los principios éticos para la investigación médica en humanos, establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (World Medical Association) (151), y tras la aprobación del Comité Ético local de investigación clínica.

Los datos y muestras de voluntarios de la clínica Vissum Corporación Oftalmológica (Alicante, España) utilizados durante el estudio, fueron obtenidos tras la firma de un consentimiento informado por cada uno de ellos. Además, se garantizó la confidencialidad de los datos para la presentación de los resultados, cumpliendo así con la legislación vigente sobre la protección de datos (LOPD).

Voluntarios sanos

Seis individuos sanos (n=6), sin patología ocular ni sistémica conocida, con edades comprendidas entre 23 y 46 años (media de 32.5 ± 7.7), se

incluyeron en este grupo. El 50% de ellos fueron mujeres y el otro 50% hombres.

Se excluyeron mujeres embarazadas, menores de 18 años, personas con enfermedades sistémicas de cualquier etiología, e individuos con molestias oculares que evidenciaran alguna posible patología de la superficie ocular.

Para cumplir con este último requisito todos los voluntarios completaron el cuestionario OSDI de síntomas oculares (152).

La puntuación del cuestionario OSDI se presenta en una escala de 0 a 100, donde los valores elevados se correlacionan con una mayor discapacidad de la superficie ocular, como se muestra en la Tabla 2. Este cuestionario es útil para discriminar sujetos con superficie ocular normal de sujetos con algún grado de alteración en la superficie ocular, ya que presenta una buena sensibilidad y especificidad.

En este caso el índice debía estar en el rango considerado como normal, $OSDI \leq 12$.

Tabla 2. Clasificación de grado de Ojo Seco según la puntuación obtenida por el cuestionario OSDI.

Puntuación	0 a 12	13 a 22	23 a 32	33 a 100
Grado de disfunción	Normal	Medio	Moderado	Severo

Fuente: Schiffman y col. Arch Ophthalmol. 2000 May;118(5):615-21.

4.2.2. Extracción de sangre

Todos los individuos participantes en el estudio debían encontrarse en ayunas para la extracción de sangre, con el fin de que las condiciones del proceso fueran lo más homogéneas posibles.

La sangre de los voluntarios se obtuvo por venopunción en el brazo, en la flexura del codo, previa desinfección de la piel con alcohol 96°. Se utilizaron palomillas Multyfly 21G (Sarstedt®) y tubos de vacío de 9 ml, con 1ml de citrato sódico como anticoagulante (Monovette®-Sarstedt). Se obtuvieron aproximadamente 100-120ml de sangre por paciente, tras la extracción de 10-12 tubos en cada uno de ellos.

4.2.3. Preparación del E-PRP

Tras la extracción de la sangre se realizó el recuento de las células sanguíneas, hematíes, leucocitos y plaquetas, en la sangre entera (antes de centrifugar) para lo que se utilizó en contador hematológico digital Mythic 18, Orphée®.

A continuación, los tubos fueron centrifugados a 1400rpm, durante 10 minutos, a una temperatura de 5°C, en la centrifuga de mesa Digicen 20 (Orto-Alresa®). Esta temperatura permite que disminuya la activación de las plaquetas y aumente su viabilidad (73).

Tras la centrifugación cada tubo presentó dos fases bien diferenciadas. La inferior, roja, con la inmensa mayoría de los hematíes de la muestra y la superior, amarilla que representa el plasma rico en plaquetas E-PRP (Figura 15).

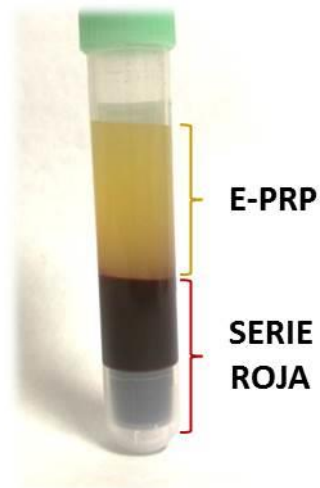


Figura 15. Tubo de sangre tras la centrifugación para obtener E-PRP.
Fuente: Imagen propia.

A veces, inmediatamente tras la centrifugación las dos fases quedaron perfectamente diferenciadas (Figura 15), y otras se observaban algunos glóbulos rojos en suspensión cerca de la interfase (Figura 16 izquierda).

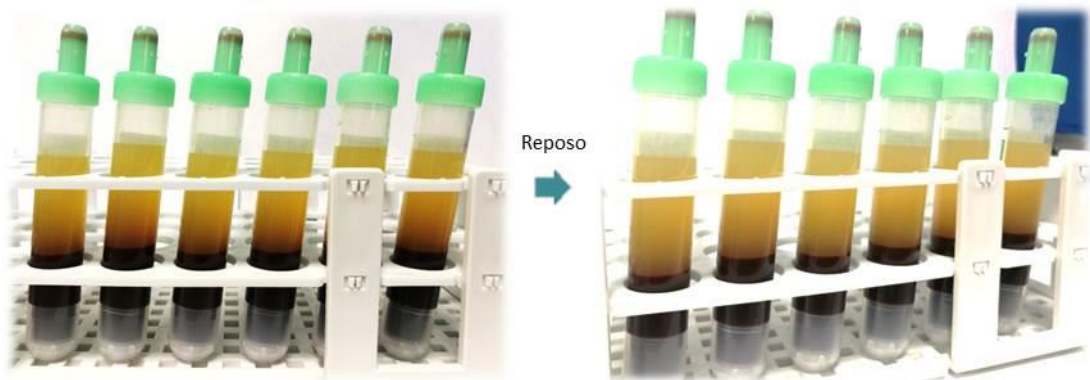


Figura 16. Tubos de sangre tras la centrifugación.
Fuente: Imágenes propias.

En los casos en que se observaban glóbulos rojos en suspensión no se pudo separar el E-PRP inmediatamente y se mantuvieron los tubos en reposo unos minutos hasta que los hematíes sedimentaron (Figura 16 derecha).

La separación de toda la fracción plasmática, E-PRP, se realizó en estrictas condiciones de esterilidad trabajando dentro de la cabina de flujo laminar (Faster BHG 2004®) con materiales desechables estériles (Figura 17).

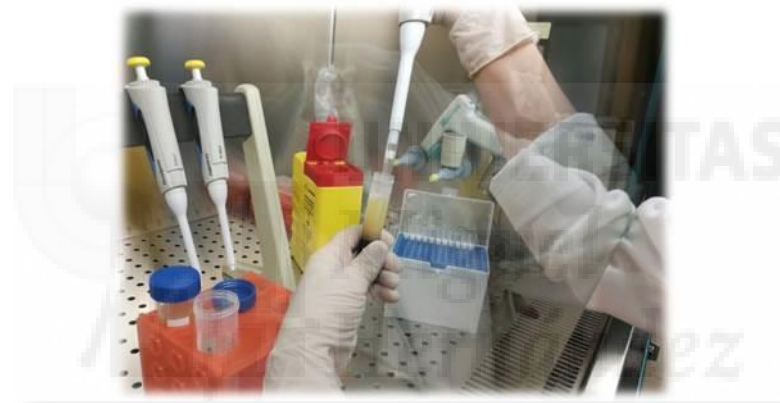


Figura 17. Separación del E-PRP tras la centrifugación en campana de flujo laminar. *Fuente: Imagen propia.*

En la interfase entre el E-PRP y la serie roja aparecía normalmente una línea blanca muy delgada compuesta por los leucocitos, que se evitaba cuando se aspiraba el plasma rico en plaquetas para disminuir al máximo el contenido de glóbulos blancos en el preparado final.

El E-PRP de cada uno de los tubos era aspirado y colocado en un tubo estéril de 50ml. De esta forma, todo el E-PRP de un mismo paciente

quedaba junto favoreciendo la homogeneización del producto final. Tras la homogeneización (inversión del tubo sin formación de espuma), 1 ml de E-PRP era extraído y colocado en un tubo cónico de 1,5 ml para realizar el recuento celular en el analizador hematológico Mythic 18, Orphée® (Figura 18).



Figura 18. Recuento de células de E-PRP en Mythic 18, Orphée®.
Fuente: Imagen propia.

Seguidamente, tras la obtención del E-PRP, todo el plasma rico en plaquetas se fraccionó en alícuotas de 1ml (tubos cónicos de 1,5 ml), y se dividió en 4 grupos de tratamiento, fresco, fresco centrifugado, congelado a -20°C y congelado a -20°C centrifugado, para su posterior análisis.

Este procedimiento fue llevado a cabo, para cada muestra de sangre de cada uno los individuos que participaron en el estudio. Se recolectaron aproximadamente de 30 a 40 ml de E-PRP por paciente.

4.2.4. Procedimientos y conservación

Los tubos de E-PRP de cada uno de los individuos se dividieron en 4 grupos, para someterlos a distintos procedimientos y conservación.

Los 4 grupos designados fueron:

- 1. E-PRP FRESCO:** Plasma rico en plaquetas (E-PRP) obtenido de la manera habitual. El término “fresco” hace referencia a que no ha sufrido ningún tipo de conservación ni tratamiento posterior. Las determinaciones de los factores de crecimiento y de la fibronectina se realizaron en el mismo día de la obtención del plasma, inmediatamente posterior al fraccionamiento. El aspecto del plasma era el habitual, opalescente.
- 2. E-PRP FRESCO CENTRIFUGADO:** E-PRP que luego de ser alicuotado en fracciones de 1ml fue sometido a una centrifugación de 6000 rpm durante 5 minutos, inmediatamente posterior a su obtención. La realización de esta centrifugación tenía como objetivo ver si las plaquetas se activaban durante el fuerte centrifugado liberando así sus factores de crecimiento al medio. Tras esta centrifugación las plaquetas quedaron agregadas en el fondo del tubo cónico y el sobrenadante quedó límpido, que fue lo que se utilizó para la realización de los ELISAs. El recuento de plaquetas del sobrenadante fue cero (datos no mostrados).
- 3. E-PRP CONGELADO A -20°C:** E-PRP que luego de ser fraccionado fue almacenado a -20°C durante 3 meses. Al cabo de ese tiempo los

viales se descongelaron lentamente (24 horas en nevera), y luego se procedió a realizar las pruebas de ELISA. Este es el procedimiento de conservación habitual cuando el E-PRP se indica como tratamiento para pacientes con alteraciones de la superficie ocular (8).

4. E-PRP CONGELADO A -20°C Y CENTRIFUGADO: E-PRP que fue sometido al mismo tratamiento anterior, congelado a -20°C durante 3 meses, y que luego de la descongelación lenta fue centrifugado a 6000 rpm durante 5 minutos. Tras esta centrifugación las plaquetas quedaron agregadas en el fondo del tubo cónico y el sobrenadante quedó límpido. Este sobrenadante se utilizó para la realización de las pruebas de ELISA.

4.2.5. Determinación de factores de crecimiento

Para cuantificar la concentración del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), del factor de crecimiento epidérmico (EGF), del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y de la proteína plasmática fibronectina presentes en cada una de las muestras, se realizó el inmunoensayo comúnmente conocido como ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Concretamente se empleó el tipo “ELISA sándwich” en el cual el antígeno a cuantificar queda atrapado entre dos anticuerpos ya sean monoclonales o policlonales.

Para este estudio se empleó el kit ELISA de la empresa eBioscience® el cual incluía una placa de 96 pocillos recubiertos por una cantidad conocida de anticuerpo de captura y los reactivos necesarios para llevar a cabo el procedimiento.

En las dos primeras columnas de pocillos se dispusieron las disoluciones con concentraciones conocidas para realizar la curva estándar y el blanco, ambos por duplicado. El resto de pocillos se emplearon para las determinaciones de las muestras problema. Cada muestra se testó por duplicado, pero utilizando dos viales distintos.

Antes de iniciar el procedimiento, algunas de las muestras de plasma debían ser diluidas previamente, según el protocolo específico del antígeno a determinar.

Los períodos de incubación intermedios fueron de una a varias horas (dependiendo del protocolo), a temperatura ambiente y se realizaron con agitación mecánica a 400rpm en agitador orbital Bio-Shaker PSU-2T PLUS, BOECO®.

Las muestras problema se agregaron en cada uno de los pocillos según protocolo. Tras la incubación se realizaron varios lavados con la finalidad de eliminar el exceso de muestra y seguidamente se adicionó el segundo anticuerpo unido a biotina dirigido contra el antígeno. Tras la incubación y lavado se añadió estreptavidina con enzima peroxidasa de rábano (HRP) para que se uniera al conjugado de biotina. Finalmente, se añadió la disolución sustrato con la cual la enzima reaccionó generando un producto coloreado de azul cuya intensidad variaba en función de la cantidad del

antígeno que había en la muestra. El desarrollo de color se monitorizaba leyendo la densidad óptica (DO) a 620nm en el lector de placa ELISA Tecan Sunrise™-Basic y empleando el software Maguellan™ (Figura 19 izquierda). Cuando el desarrollo de color fue el adecuado, la reacción se detuvo con la solución de detención “stop” (Figura 19 derecha), y la absorbancia se midió nuevamente a una longitud de onda de 450nm con el mismo lector de placa para ELISA y software.

Luego de realizar la curva de calibrado para cada sustancia y teniendo en cuenta la absorbancia obtenida, se obtuvieron las concentraciones de cada uno de los factores de crecimiento presentes en las muestras.



Figura 19. Lectura de DO en Tecan Sunrise™ (izquierda) y detención de la reacción (derecha). *Fuente: Imágenes propias.*

4.2.6. Análisis estadístico

El objetivo del análisis estadístico fue determinar la influencia que ocasionaban los diferentes tratamientos aplicados al E-PRP (Fresco, Fresco centrifugado, Congelado a -20°C , o Congelado a -20°C y centrifugado) sobre la concentración de los factores de crecimiento PDGF-BB, TGF- β 1, EGF y VEGF, y la proteína fibronectina.

Para ello se comparó la variable de concentración de cada una de las proteínas estudiadas con los cuatro procedimientos realizados. Los análisis se realizaron para cada factor por separado.

El tamaño muestral fue de $n=6$ para cada uno de los tratamientos aplicados. Este tamaño muestral era demasiado pequeño para aplicar procedimientos paramétricos como el ANOVA, ya que necesita que las poblaciones sigan una distribución sea normal y, con tamaños muestrales tan pequeños, cualquier contraste de normalidad saldría no significativo (que se ajusta a la normal). No hay un tamaño muestral lo suficientemente grande como para tener la posibilidad de rechazar el ajuste a la distribución normal.

Por esta razón, para comparar las concentraciones con cada uno de los tratamientos utilizados se llevó a cabo el análisis no paramétrico de los datos obtenidos mediante la prueba de Kruskal-Wallis, que es el método alternativo al ANOVA cuando no se cumple la hipótesis de normalidad o el tamaño muestral es pequeño. Este primer análisis se realizó con el programa SPSS® V15.0.

En los casos en que el Kruskal-Wallis resultó significativo (cuando las concentraciones entre tratamientos eran diferentes), se realizaron comparaciones múltiples post hoc utilizando el test de Tukey. Este análisis se realizó con el programa RStudio 1.0.143 - Windows Vista/7/8/10.

Además, se realizó un análisis de correlación entre la concentración de los distintos factores de crecimiento y fibronectina, y las células sanguíneas presentes en el E-PRP (Plaquetas, Hematíes y Leucocitos). Inicialmente se realizó para cada uno de los factores de crecimiento y fibronectina globalmente, y posteriormente para cada procedimiento aplicado a cada factor de crecimiento por separado. Los resultados dieron el coeficiente de correlación de Spearman (r) junto al p valor del contraste de este coeficiente.

El nivel de significación para el que se realizaron todos los contrastes del análisis fue del 5% ($p \leq 0,05$).



RESULTADOS





5. RESULTADOS

5.1. VOLUNTARIOS

Se incluyeron en este estudio seis individuos sanos (n=6), sin patología ocular ni sistémica conocida, con edades comprendidas entre 23 y 46 años (media de 32.5 ± 7.7). La proporción de hombres y mujeres fue del 50%.

5.2. CUESTIONARIO OSDI

Los valores obtenidos del cuestionario OSDI realizado en los voluntarios sanos están reflejados en la Tabla 3.

Voluntario	Género	Puntuación OSDI	Resultado
1	Hombre	10.48	Normal
2	Mujer	2.08	Normal
3	Mujer	2.08	Normal
4	Mujer	10.41	Normal
5	Hombre	11.36	Normal
6	Hombre	8.33	Normal

Como muestran los resultados en la Tabla 3, los individuos que conforman este grupo no presentan síntomas de disfunción de la superficie ocular, ya que la puntuación obtenida es inferior a 13, puntuación a partir de la cual se considera ojo seco “Medio” (152). La valoración del test confirma la

anamnesis inicial que se les realizó mostrando un resultado calificado como “Normal”. Todos los individuos cumplieron con este criterio.

5.3. RECUENTO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Los resultados que se muestran en este apartado corresponden a los valores recogidos de los 6 voluntarios sanos, correspondientes a la concentración de plaquetas, glóbulos rojos y leucocitos en la sangre entera o basal y luego de la centrifugación realizada para concentrar las plaquetas y obtener el E-PRP (E-PRP fresco).

5.3.1. Recuento de plaquetas

El recuento de plaquetas de cada uno de los individuos, antes y después de la centrifugación, se realizó por duplicado. Los valores mostrados corresponden a la media de ambos.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos del recuento de plaquetas en la sangre basal (antes de la centrifugación) y en el E-PRP luego de su preparación.

En la Figura 20 se han representado gráficamente los valores obtenidos.

Voluntario	Plaquetas Sangre total x10³/μl	Plaquetas E-PRP x10³/μl	Índice de concentración
1	218	460	2,11
2	235	467	1,99
3	188	352	1,87
4	324	589	1,82
5	373	613	1,64
6	253	489	1,93
Media	265,17	495,00	1,89
DS	69,75	95,14	0,16

DS: Desviación standard

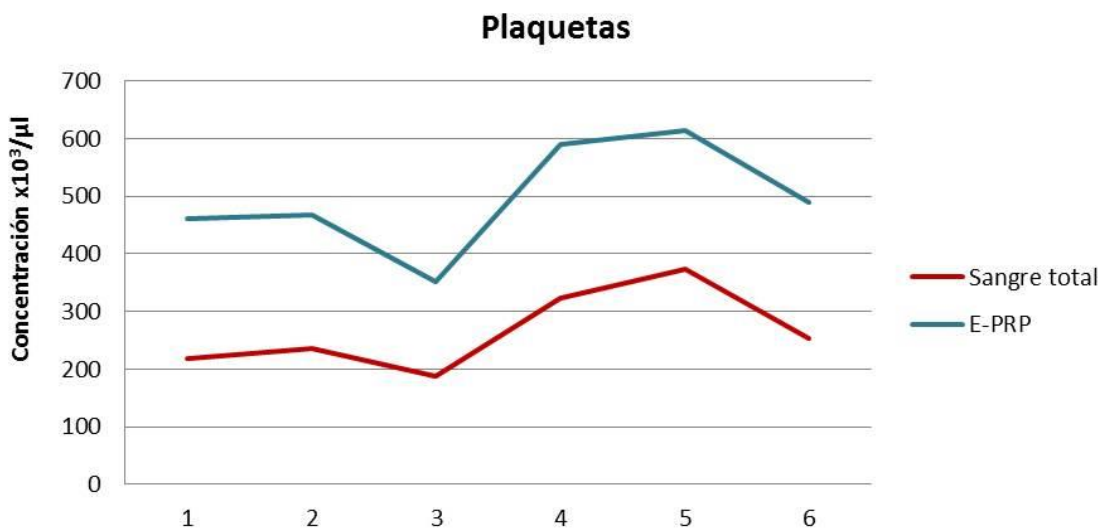


Figura 20. Concentración de plaquetas en sangre total y en E-PRP.

En el recuento de plaquetas en la sangre basal, el valor más alto encontrado corresponde al voluntario 5 ($373 \times 10^3/\mu\text{l}$). Este voluntario además presentó el recuento de hematíes más bajo ($3,65 \times 10^6/\mu\text{l}$). Estos valores conjuntamente con la hemoglobina de 10,6 g/dl y el hematocrito de 33,5 % (datos no mostrados) corresponden a un cuadro de anemia (153). A priori este voluntario no presentaba ninguna condición física que indicara esta situación por lo que se incluyó igualmente en el estudio.

Los resultados muestran que la velocidad de centrifugación empleada para la elaboración del E-PRP (1400 rpm) y el tiempo establecido (10 minutos) son adecuados, debido a que las plaquetas se concentran casi el doble, según el índice de concentración obtenido de 1,89.

5.3.2. Recuento de glóbulos rojos

El recuento de hematíes de cada uno de los individuos, antes y después de la centrifugación, se realizó por duplicado. Los valores mostrados corresponden a la media de ambos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del recuento de glóbulos rojos en la sangre basal (antes de la centrifugación) y en el E-PRP (luego de la centrifugación).

En la Figura 21 se han representado gráficamente los valores obtenidos.

Los resultados muestran que, tras la centrifugación, los valores de glóbulos rojos en el E-PRP obtenido son casi insignificantes en comparación con la sangre total. La reducción que se observa es mayor al 99%.

Tabla 5. Recuentos de hematíes antes y después de la centrifugación			
Voluntario	Hematíes Sangre total $\times 10^6/\mu\text{l}$	Hematíes E-PRP $\times 10^6/\mu\text{l}$	Porcentaje de Reducción (%)
1	4,32	0,06	98,61
2	4,28	0,03	99,30
3	3,73	0,04	98,93
4	4,37	0,02	99,54
5	3,65	0,03	99,18
6	4,28	0,04	99,07
Media	4,11	0,04	99,10
DS	0,32	0,01	0,32

DS: Desviación standard

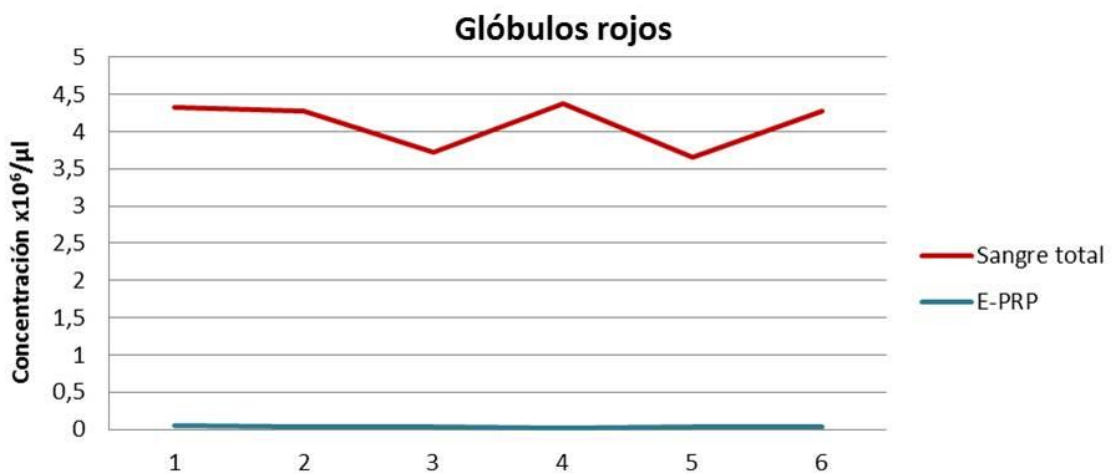


Figura 21. Concentración de hematíes en sangre total y en E-PRP.

5.3.3. Recuento de leucocitos

El recuento de leucocitos de cada uno de los individuos, antes y después de la centrifugación, se realizó por duplicado. Los valores mostrados corresponden a la media de ambos.

En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos del recuento de leucocitos en la sangre basal (antes de la centrifugación) y en el E-PRP (luego de la centrifugación).

Tabla 6. Recuentos de leucocitos antes y después de la centrifugación			
Voluntario	Leucocitos Sangre total $\times 10^3/\mu\text{l}$	Leucocitos E-PRP $\times 10^3/\mu\text{l}$	Porcentaje de Reducción (%)
1	5,20	1,40	73,08
2	4,80	0,90	81,25
3	4,60	0,70	84,78
4	5,60	1,00	82,14
5	6,00	0,60	90,00
6	6,40	1,20	81,25
Media	5,43	0,97	82,08
DS	0,70	0,30	5,52

DS: Desviación standard

En la Figura 22 se han representado gráficamente los valores obtenidos.

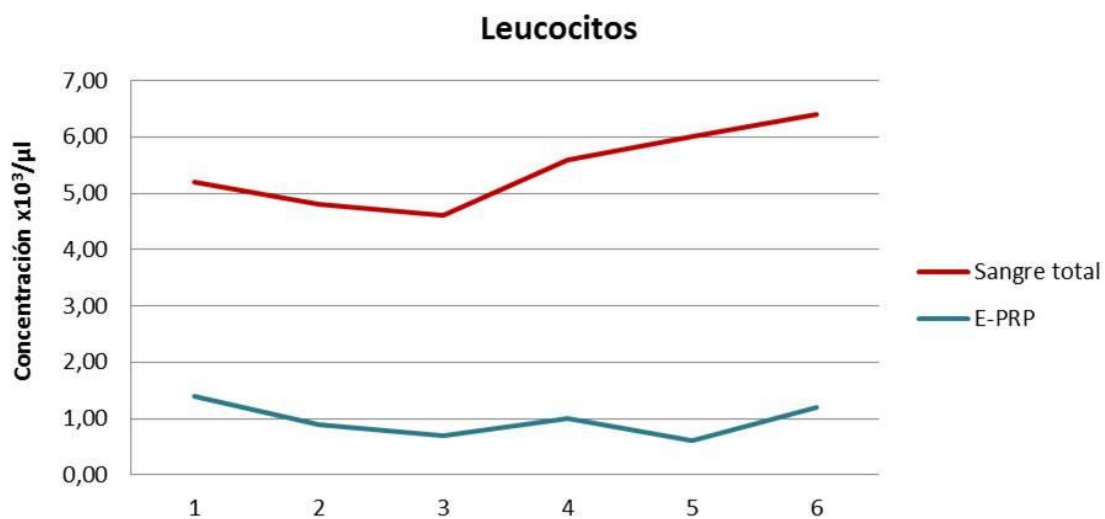


Figura 22. Concentración de leucocitos en sangre total y en E-PRP.

Los resultados reflejan que, tras la concentración de plaquetas, los valores de glóbulos blancos en el E-PRP son muy bajos en comparación con la sangre total, observándose una reducción del 82% con respecto a los valores basales.

5.4. CONCENTRACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y FIBRONECTINA

La determinación de los factores de crecimiento EGF, PDGF-BB, TGF-β, VEGF y fibronectina se realizó en las muestras de E-PRP obtenidas de los voluntarios sanos.

Estas concentraciones se determinaron en cada uno de los 4 grupos de E-PRP sometidos a los distintos procedimientos y conservación: E-PRP

fresco, E-PRP fresco centrifugado, E-PRP congelado a -20°C y E-PRP congelado a -20°C y centrifugado.

Luego de obtenida la densidad óptica de las muestras en el espectrofotómetro a 450 nm, los resultados de las concentraciones se calcularon reemplazando la “y” en la ecuación de la recta de la curva de calibrado de cada uno de los factores con la absorbancia y luego calculando “x”.

En la Tabla 7 se observan las ecuaciones para cada uno de ellos y el R².

Tabla 7. Ecuaciones de la recta y R² para cada determinación		
Moléculas	Ecuación de la recta	R²
EGF	$y = 0,0105x - 0,0335$	0,9993
PDGF-BB	$y = 0,0008x - 0,0578$	0,9997
TGF-β	$y = 0,0014x - 0,1179$	0,9879
VEGF	$y = 0,0021x - 0,0183$	0,9862
Fibronectina	$y = 0,1006x + 0,557$	0,9942
<i>R²: coeficiente de correlación</i>		

Para calcular los resultados se tuvieron en cuenta las diluciones de las muestras requeridas para algunas de las determinaciones.

Cada muestra se analizó por duplicado, pero utilizando dos viales distintos. Los valores mostrados corresponden a la media de ambas

medidas (problema y su duplicado), cuando la diferencia entre ellas no superaba el 10%. Si la diferencia era mayor al 10% se consideró solo el valor que era más cercano a la Media \pm DS del grupo.

En la Tabla 8 se muestran las concentraciones obtenidas del factor de crecimiento epidérmico (EGF) para los distintos procedimientos realizados.

Voluntario	Fresco	Fresco centrifugado	Congelado	Congelado centrifugado
1	435,24	471,24	863,84	728,60
2	176,29	109,24	554,32	473,71
3	246,38	228,29	586,70	473,36
4	503,81	402,86	707,65	529,55
5	320,19	250,38	673,36	623,84
6	347,52	335,24	647,65	534,32
Media	338,24	299,54	672,25	560,56
DS	119,92	130,49	109,36	99,03
<i>DS: Desviación standard</i>				

En la Tabla 9 se muestran las concentraciones obtenidas del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), para los distintos procedimientos realizados.

Tabla 9. Concentraciones del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) (pg/ml)				
Voluntario	Fresco	Fresco centrifugado	Congelado	Congelado centrifugado
1	2707,5	1420	10270	10232,5
2	3782,5	1545	6907,5	10145
3	3832,5	2457,5	8895	9170
4	7007,5	2732,5	10470	10182,5
5	7907,5	8407,5	19395	20132,5
6	5157,5	2557,5	15832,5	17270
Media	5065,83	3186,67	11961,67	12855,42
DS	2028,96	2615,61	4696,25	4634,59
<i>DS: Desviación standard</i>				

En la Tabla 10 se muestran las concentraciones obtenidas del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), para los distintos procedimientos realizados.

Tabla 10. Concentraciones del factor de crecimiento transformante β (TGF-β) (pg/ml)				
Voluntario	Fresco	Fresco centrifugado	Congelado	Congelado centrifugado
1	86494,29	7476,43	83258,57	51822,86
2	83065,71	6790,71	76626,43	43787,14
3	81394,29	4937,14	67690,71	26762,14
4	85315,71	10744,29	78608,57	21951,43
5	85465,71	7069,29	64422,86	30533,57
6	83258,57	5215,71	77655,00	39780,00
Media	84165,71	7038,93	74710,36	35772,86
DS	1905,18	2084,48	7151,48	11292,15
<i>DS: Desviación standard</i>				

En la Tabla 11 se muestran las concentraciones obtenidas del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), para los distintos procedimientos realizados.

Tabla 11. Concentraciones del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (pg/ml)				
Voluntario	Fresco	Fresco centrifugado	Congelado	Congelado centrifugado
1	305,52	203,14	853,14	842,67
2	179,81	89,81	299,33	286,48
3	137,43	67,90	145,05	136,00
4	241,71	243,62	273,62	277,43
5	562,19	655,05	1082,67	975,52
6	218,86	209,33	313,14	242,19
Media	274,25	244,81	494,49	460,05
DS	152,09	212,89	378,54	354,42
<i>DS: Desviación standard</i>				

En la Tabla 12 se muestran las concentraciones obtenidas de la proteína plasmática fibronectina, para los distintos procedimientos realizados.

Tabla 12. Concentraciones de la proteína plasmática fibronectina (µg/ml)				
Voluntario	Fresco	Fresco centrifugado	Congelado	Congelado centrifugado
1	571,04	563,63	560,45	572,39
2	549,22	548,34	556,62	566,26
3	571,91	558,06	551,61	560,84
4	500,97	515,94	524,94	541,74
5	548,98	535,84	550,25	556,78
6	522,47	540,30	550,25	548,74
Media	544,10	543,69	549,02	557,79
DS	27,85	17,14	12,48	11,27
<i>DS: Desviación standard</i>				

Si comparamos los valores de los FCs en el E-PRP Fresco con respecto a los niveles basales en plasma sanguíneo, en general se observa que se han visto aumentados a excepción del EGF, como se muestra en la Tabla 13. Los valores del plasma fueron obtenidos del protocolo del Kit eBioscience.

Por otro lado, se observa que todas las concentraciones de los FCs aumentan considerablemente en el E-PRP Congelado con respecto a los niveles plasmáticos.

Tabla 13. Comparación de niveles de factores de crecimiento en plasma sanguíneo y en E-PRP Fresco / Congelado.			
Moléculas	Plasma sanguíneo[§]	E-PRP Fresco*	E-PRP Congelado*
PDGF-BB	< 2000 pg/ml	5065.83 pg/ml	11961.67 pg/ml
TGF-β	1725 pg/ml	84165.71 pg/ml	74710.36 pg/ml
EGF	110 – 350 pg/ml	338.24 pg/ml	672.25 pg/ml
VEGF	47.3 pg/ml	274.25 pg/ml	494.49 pg/ml
Fibronectina	400 μg/ml	549.02 μg/ml	544.10 μg/ml

[§] Valores obtenidos del protocolo del Kit eBioscience.
^{*} Valores obtenidos de nuestros experimentos.

Los valores de Fibronectina aumentan levemente en el E-PRP ya sea Fresco o Congelado, con respecto a los niveles plasmáticos basales.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

En la Tabla 14 se muestran los valores del recuento de las diferentes células sanguíneas (plaquetas, hematíes y leucocitos) en la sangre total (antes de la centrifugación) y tras la obtención del E-PRP.

Tabla 14. Recuento de células sanguíneas						
Estadístico	Plaquetas $\times 10^3/\mu\text{l}$		Hematíes $\times 10^6/\mu\text{l}$		Leucocitos $\times 10^3/\mu\text{l}$	
	ST	E-PRP	ST	E-PRP	ST	E-PRP
Media	265,17	495,00	4,11	0,04	5,43	0,97
DS	69,75	95,14	0,32	0,01	0,70	0,30

ST: Sangre Total, DS: Desviación standard

Estos valores se utilizarán luego para hacer el análisis de las correlaciones entre los mismos y las diferentes concentraciones de los factores de crecimiento y la fibronectina.

A continuación, se muestran los valores medios y las desviaciones standard de todas las concentraciones obtenidas de los factores de crecimiento y la fibronectina, para cada uno de los 4 procedimientos realizados; E-PRP Fresco, E-PRP Fresco Centrifugado, E-PRP Congelado a -20°C y E-PRP Congelado a -20°C y Centrifugado (Tabla 15).

Tabla 15. Media y desviación standard de los factores de crecimiento y fibronectina para cada tratamiento junto con los resultados estadísticos obtenidos

		PDGF-BB (pg/ml)	TGF-β1 (pg/ml)	EGF (pg/ml)	VEGF-A (pg/ml)	FIBRONECTINA (μg/ml)
FRESCO	Media	5065.83	84165.71	338.24	274.25	544.10
	DS	2028,96	1905.18	119.92	152.09	27.85
FRESCO CENTRIFUGADO	Media	3186.67	7038.93	299.54	244.81	543.69
	DS	2387.71	2084.48	130.49	212.89	17.14
CONGELADO	Media	11961.67	74710.36	672.25	494.49	549.02
	DS	4287.07	7151.48	109.35	378.54	12.48
CONGELADO CENTRIFUGADO	Media	12855.4	35772.86	560.56	460.05	557.79
	DS	4230.79	11292.15	99.03	354.05	11.27
p valor		0.001*	0.000*	0.001*	0.198	0.471

DS: Desviación standard, F: Fresco, FC: Fresco Centrifugado, C: Congelado a -20°C 3 meses, CC: Congelado a -20°C 3 meses y Centrifugado.

* p valor ≤ 0.05: estadísticamente significativo.

La Tabla 15 recoge además los resultados obtenidos en la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis. Con un asterisco rojo se marcan los valores cuyo p valor es ≤ 0.05 y por lo tanto indican que existen diferencias significativas entre los grupos; “Fresco”, “Fresco Centrifugado”, “Congelado” y “Congelado Centrifugado”.

El análisis demuestra que no se encontraron diferencias significativas para el VEGF-A ($p=0.198$), ni para la fibronectina ($p=0.471$) entre los diferentes tratamientos aplicados al E-PRP. Por el contrario, se observaban diferencias significativas para PDGF-BB, TGF- β 1 y EGF ($p \leq 0.05$), pero dicha prueba estadística no especificaba entre qué grupos se observaban esas diferencias, por lo que para ello se realizó un análisis post-hoc utilizando el test de Tukey para comparaciones múltiples.

5.5.1. Factor de crecimiento epidérmico (EGF)

Los resultados estadísticos muestran que se establecen diferencias significativas entre los distintos tratamientos para el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

En la Tabla 16 se recogen los datos del p valor obtenidos aplicando el test de Tukey para comparaciones múltiples. Se encuentran marcados con asteriscos aquellos cuyo p valor ≤ 0.05 y por lo tanto indican diferencias significativas entre los procedimientos aplicados.

Tabla 16. Comparaciones múltiples para EGF (p valor)				
	FRESCO	FRESCO CENTRIFUGADO	CONGELADO	CONGELADO CENTRIFUGADO
FRESCO	--	0.988	0.008*	0,122
FRESCO CENTRIFUGADO	0.988	--	0.002*	0.050*
CONGELADO	0.008*	0.002*	--	0.761
CONGELADO CENTRIFUGADO	0,122	0.050*	0.761	--

* p valor ≤ 0.05 : estadísticamente significativo.

Según los resultados de la Tabla 16 existe un aumento significativo en la concentración de EGF Congelado y Congelado Centrifugado, con respecto al Fresco y al Fresco Centrifugado respectivamente, cuyos valores para dicho factor de crecimiento son significativamente inferiores.

Por su parte no se observan diferencias entre el Fresco y el Fresco Centrifugado ($p=0,988$), entre el Fresco y Congelado Centrifugado ($p=0,122$), ni entre el Congelado y Congelado Centrifugado ($p=0,761$) en las determinaciones de EGF.

En la Figura 23 se puede observar la representación gráfica de los valores obtenidos.

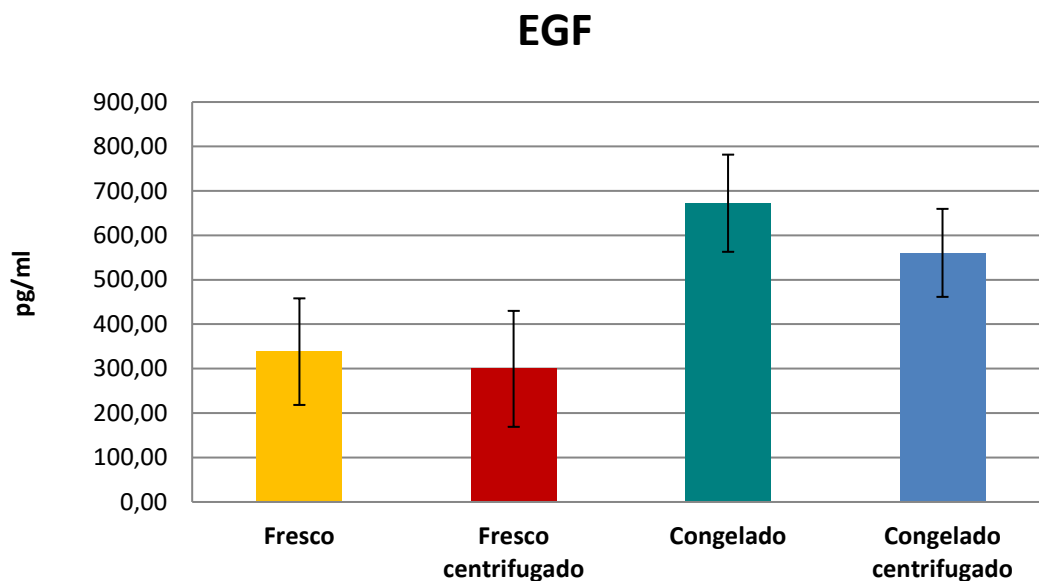


Figura 23. Concentración del factor de crecimiento epidérmico (EGF) en E-PRP tras la aplicación de 4 procedimientos.

5.5.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB)

El análisis estadístico demuestra que existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos que se aplicaron al E-PRP para el Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB). Ver Tabla 17.

En la Tabla 17 se recogen los datos del p valor obtenidos aplicando el test de Tukey para comparaciones múltiples. Se encuentran marcados con asteriscos aquellos cuyo p valor ≤ 0.05 y por lo tanto indican diferencias significativas entre los procedimientos aplicados.

Tabla 17. Comparaciones múltiples para PDGF-BB (<i>p</i> valor)				
	FRESCO	FRESCO CENTRIFUGADO	CONGELADO	CONGELADO CENTRIFUGADO
FRESCO	--	0.784	0.111	0.068
FRESCO CENTRIFUGADO	0.784	--	0.008*	0.004*
CONGELADO	0.111	0.008*	--	0.997
CONGELADO CENTRIFUGADO	0.068	0.004*	0.997	--

* *p* valor ≤ 0.05 : estadísticamente significativo.

Solo se encontraron diferencias significativas entre el E-PRP Fresco Centrifugado y el Congelado ($p=0.008$), y entre el Fresco Centrifugado y el Congelado Centrifugado ($p=0.004$).

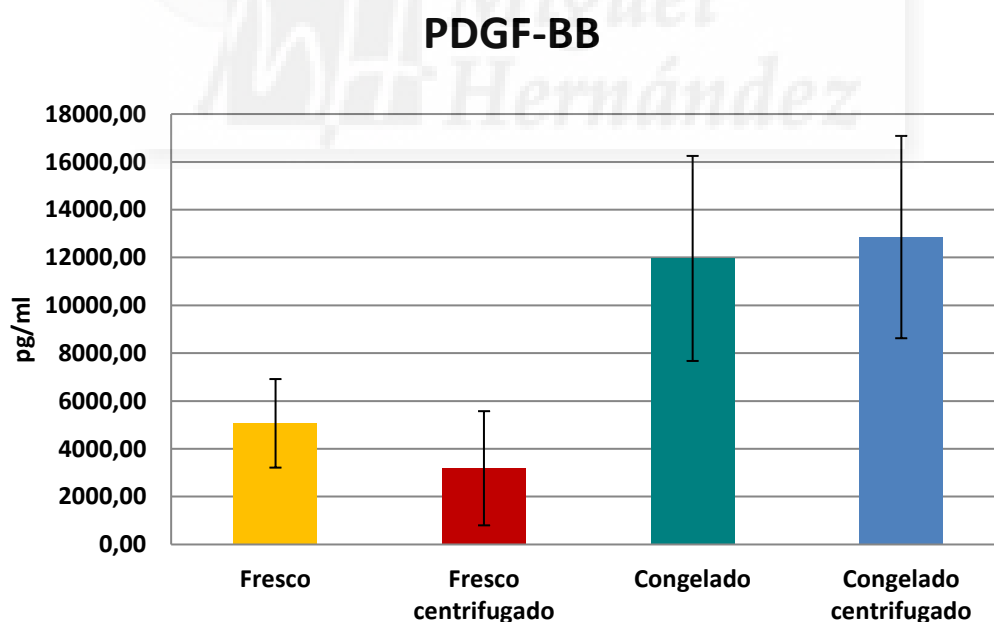


Figura 24. Concentración del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB) en E-PRP tras la aplicación de 4 procedimientos.

Tanto en la Tabla 17 como en la Figura 24 se puede observar que existen diferencias entre los distintos tratamientos aplicados al PDGF-BB. El E-PRP Congelado y el Congelado Centrifugado presentan valores más elevados, respecto al Fresco y al Fresco Centrifugado, aunque no se encuentran diferencias significativas entre el E-PRP Fresco y el resto de tratamientos.

5.5.3. Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)

En la Tabla 18 se reflejan los datos del p valor obtenidos aplicando el test estadístico de Tukey para comparaciones múltiples. Se encuentran marcados con un asterisco aquellos cuyo p valor es ≤ 0.05 y por lo tanto indican diferencias significativas entre cada uno de los procedimientos realizados.

Tabla 18. Comparaciones múltiples para TGF-β (p valor)				
	FRESCO	FRESCO CENTRIFUGADO	CONGELADO	CONGELADO CENTRIFUGADO
FRESCO	--	0.000*	0.585	0.024*
FRESCO CENTRIFUGADO	0.000*	--	0.013*	0.456
CONGELADO	0.585	0.013*	--	0.039*
CONGELADO CENTRIFUGADO	0.024*	0.456	0.039*	--

** p valor ≤ 0.05 : estadísticamente significativo.*

El análisis estadístico de los datos demuestra que existen diferencias significativas entre algunos de los tratamientos que se aplicaron al E-PRP para el Factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$).

En la Figura 25 se puede observar que los valores de concentración de TGF- $\beta 1$, son significativamente más elevados en el E-PRP sin centrifugar, Fresco y Congelado, en comparación con los valores obtenidos de las muestras centrifugadas, Fresco Centrifugado y Congelado Centrifugado.

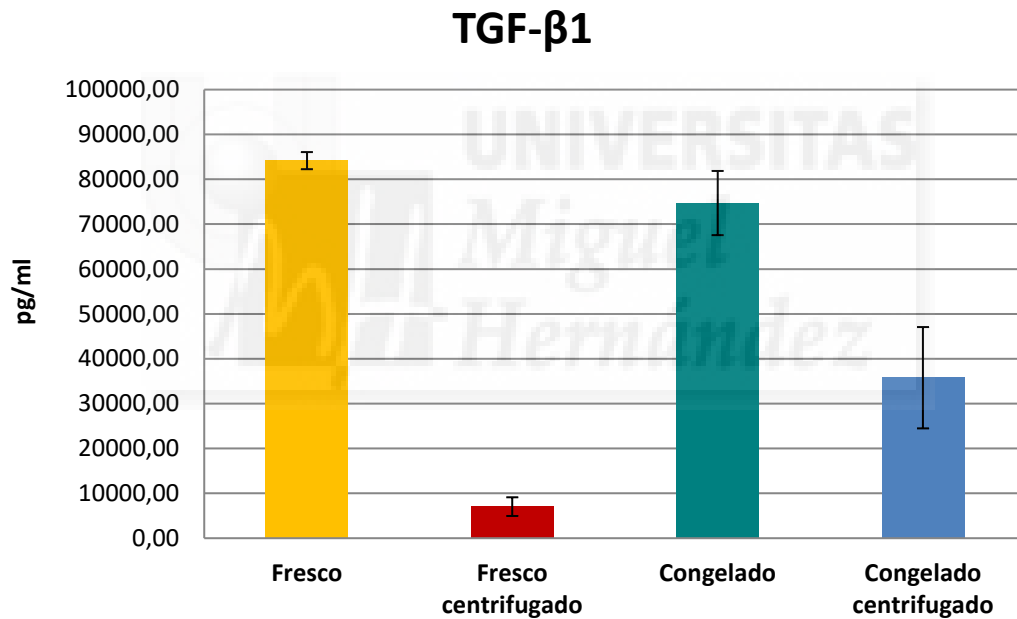


Figura 25. Concentración del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) en E-PRP tras la aplicación de 4 procedimientos.

Las concentraciones de TGF- β en el E-PRP Fresco fueron significativamente más elevadas que en el Fresco Centrifugado ($p=0.000$), así como las del E-

PRP Congelado en comparación con las del Congelado Centrifugado ($p=0.039$).

Por su parte, no se encontraron diferencias significativas en el TGF- β del E-PRP en Fresco en comparación con sus homólogos congelados, Fresco vs Congelado ($p=0.585$) y Fresco Centrifugado vs Congelado Centrifugado ($p=0.456$).

5.5.4. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A)

En la Figura 26 se muestran gráficamente los resultados de las concentraciones obtenidas para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A).

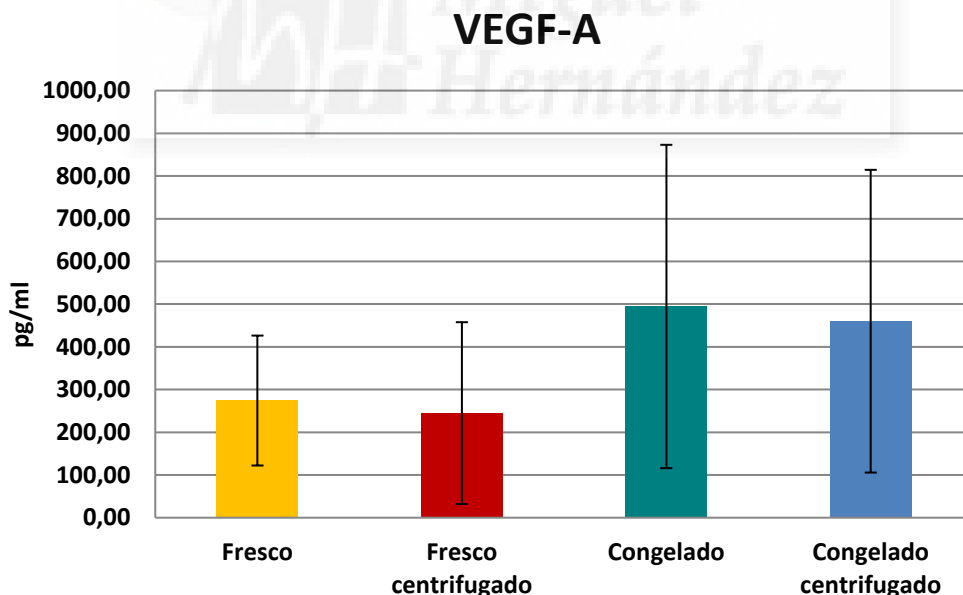


Figura 26. Concentración del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en E-PRP tras la aplicación de 4 procedimientos.

El análisis de los resultados con la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis demostró que no existían diferencias significativas entre grupos para este factor de crecimiento ($p=0.198$), por lo que no se realizó posteriormente el análisis post-hoc de comparaciones múltiples.

En la Figura 26 se aprecia que no existen diferencias significativas entre el E-PRP Fresco, el Fresco Centrifugado, el Congelado, ni el Congelado Centrifugado, en lo que respecta a las concentraciones de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A).

Aunque las concentraciones de los dos grupos de E-PRP congelados son mayores que las concentraciones de los grupos de E-PRP frescos, estas diferencias no son significativas desde el punto de vista estadístico.

5.5.5. Fibronectina

En el caso de esta proteína plasmática tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas de E-PRP en los grupos de Fresco, Fresco Centrifugado, Congelado, o Congelado Centrifugado ($p=0.471$).

La representación gráfica de los valores obtenidos para la Fibronectina se puede apreciar en la Figura 27.

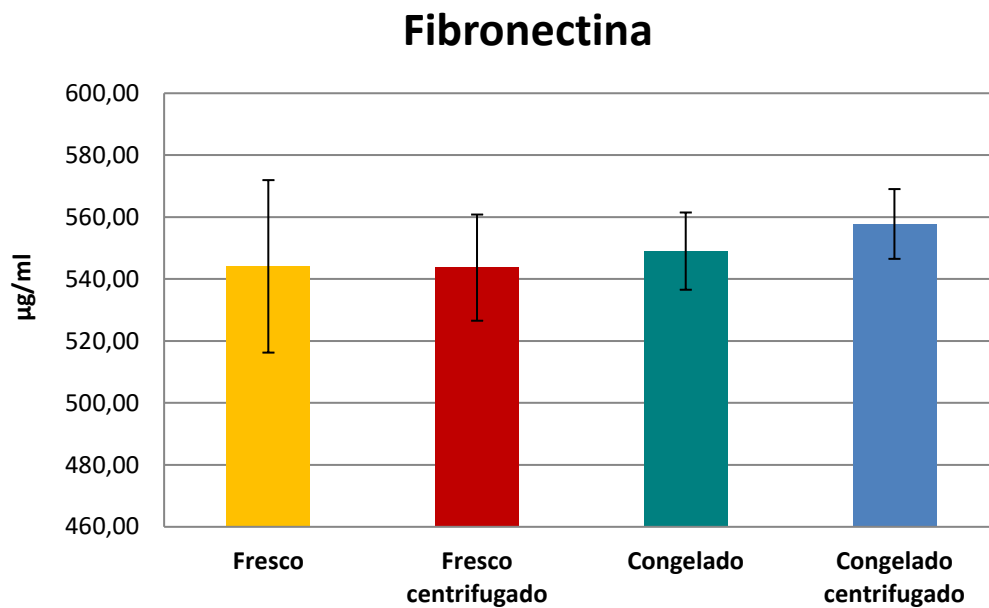


Figura 27. Concentración de la proteína plasmática Fibronectina en E-PRP tras la aplicación de 4 procedimientos.

5.6. ANÁLISIS DE CORRELACIONES

En este apartado se muestra el análisis de correlación entre la concentración de los distintos factores de crecimiento y fibronectina, y las células sanguíneas presentes en el E-PRP (Plaquetas, Hematíes y Leucocitos).

Inicialmente se realizó para cada uno de los factores de crecimiento y fibronectina globalmente, y posteriormente para cada procedimiento aplicado a cada factor de crecimiento por separado.

Los resultados dieron el coeficiente de correlación de Spearman (r) junto al p valor del contraste de este coeficiente.

5.6.1. Correlaciones E-PRP Fresco

En la Tabla 19 se muestran las correlaciones de los distintos factores de crecimiento y fibronectina con las células sanguíneas en el E-PRP Fresco.

Se encuentran marcados con un asterisco rojo aquellos p valores ≤ 0.05 , que indican que la correlación fue significativa.

Tabla 19. Correlaciones en E-PRP Fresco con células sanguíneas Coeficiente r y p valor						
	Plaquetas		Hematíes		Leucocitos	
	r	p	r	p	r	p
PDGF-BB	0.841	0.036*	-0.733	0.097	-0.512	0.299
TGF-β1	0.676	0.141	0.166	0.754	0.408	0.421
EGF	0.485	0.330	0.052	0.922	0.508	0.304
VEGF-A	0.724	0.104	-0.063	0.905	-0.276	0.596
FIBRONECTINA	-0.635	0.175	0.684	0.134	-0.104	0.845

* p valor ≤ 0.05 : estadísticamente significativo.

Como se muestra en la Tabla 19, existe una correlación significativa y positiva entre las plaquetas y el PDGF-BB con una $p=0.036$ y un coeficiente de correlación de Spearman, $r=0.841$. Esto indica que a mayor concentración de plaquetas en el E-PRP se observa una mayor concentración del factor de crecimiento PDGF-BB.

Por el contrario, no se observa ningún tipo de correlación entre el recuento de plaquetas y el resto de factores de crecimiento o la fibronectina ($p > 0.05$).

Aunque TGF- β 1, VEGF-A y Fibronectina presentan un coeficiente de correlación aceptable, el p valor de cada uno de ellos no llega al nivel de significación requerido para poder afirmar que existe una correlación significativa.

A su vez, tampoco hay correlaciones entre las concentraciones de los factores de crecimiento o fibronectina y los recuentos de hematíes o leucocitos en el E-PRP Fresco ($p > 0.05$).

Además de las correlaciones con las células sanguíneas, se realizaron las correlaciones entre los factores de crecimiento y la fibronectina entre sí en el E-PRP Fresco.

Los p valores de los contrastes y los coeficientes de correlación de Spearman se reflejan en la Tabla 20.

Tabla 20. Correlaciones en E-PRP Fresco. Coeficiente r y p valor						
		PDGF-BB	TGF- β 1	EGF	VEGF-A	FIBRONECTINA
PDGF-BB	r	1	0.086	0.200	0.371	-0.657
	p	--	0.872	0.704	0.468	0.156
TGF- β 1	r		1	0.657	0.943	-0.257
	p		--	0.156	0.005*	0.623
EGF	r			1	0.543	-0.543
	p			--	0.266	0.266
VEGF-A	r				1	-0.371
	p				--	0.468
FIBRONECTINA	r					1
	p					--

* p valor ≤ 0.05 : estadísticamente significativo.

Según los p valores obtenidos expresados en la Tabla 20, se observa que existe una correlación significativa y positiva entre TGF- β 1 y VEGF-A, (y $p=0.005$), lo que evidencia una relación entre estos dos factores.

Por el contrario, no se encontraron correlaciones entre el resto de factores de crecimiento y fibronectina en el E-PRP Fresco ($p > 0.05$).

5.6.2. Correlaciones E-PRP Congelado

En la Tabla 21 se muestran las correlaciones de los distintos factores de crecimiento y fibronectina en el E-PRP Congelado con los recuentos de las células sanguíneas en el E-PRP inicial (Fresco).

Se encuentran marcados con un asterisco rojo aquellos p valores ≤ 0.05 , que indican que la correlación fue significativa.

Tabla 21. Correlaciones en E-PRP Congelado con células sanguíneas Coeficiente r y p valor						
	Plaquetas		Hematíes		Leucocitos	
	r	p	r	p	r	p
PDGF-BB	0.606	0.203	-0.087	0.870	-0.205	0.697
TGF-β1	-0.063	0.906	0.362	0.481	0.932	0.007*
EGF	0.239	0.648	0.575	0.233	0.660	0.153
VEGF-A	0.514	0.297	0.296	0.569	-0.007	0.990
FIBRONECTINA	-0.524	0.286	0.730	0.100	0.149	0.779

* p valor ≤ 0.05 : estadísticamente significativo.

Como se muestra en la Tabla 21, existe una correlación significativa y positiva entre los leucocitos y la concentración del TGF- β 1 ($r=0.932$ y $p=0.007$). Esto indica que a mayor concentración de leucocitos en el E-PRP inicial (fresco) se observa una mayor concentración del factor de crecimiento TGF- β 1 en el E-PRP congelado.

Por el contrario, no se observa ningún tipo de correlación entre el recuento de plaquetas y el resto de factores de crecimiento o la fibronectina ($p > 0.05$).

A su vez, tampoco hay correlaciones entre las concentraciones de los factores de crecimiento o fibronectina y los recuentos de hematíes o leucocitos en el E-PRP Fresco ($p > 0.05$).

Además de las correlaciones con las células sanguíneas, se realizaron las correlaciones entre las concentraciones de los factores de crecimiento y la fibronectina entre sí, en el E-PRP Congelado.

Los p valores de los contrastes y los coeficientes de correlación se reflejan en la Tabla 22.

Tabla 22. Correlaciones en E-PRP Congelado. Coeficiente r y p valor						
		PDGF-BB	TGF-β1	EGF	VEGF-A	FIBRONECTINA
PDGF-BB	r	1	0.195	0.452	0.651	-0.623
	p	--	0.787	0.329	0.208	0.173
TGF-β1	r		1	0.419	0.017	-0.208
	p		--	0.208	0.957	0.742
EGF	r			1	0.492	-0.103
	p			--	0.397	0.827
VEGF-A	r				1	-0.295
	p				--	0.784
FIBRONECTINA	r					1
	p					--

* p valor ≤ 0.05: estadísticamente significativo.

En esta tabla se muestra que no hubo correlaciones significativas entre los distintos factores de crecimiento o la fibronectina en el E-PRP congelado ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN





6. DISCUSIÓN

El plasma rico en plaquetas para uso oftalmológico denominado como E-PRP se utiliza para el tratamiento de diferentes afectaciones de la superficie ocular desde hace bastante tiempo (8,9,98,127). Sin embargo, faltaba realizar una evaluación detallada de la composición y estabilidad biológica del preparado, para confirmar que el E-PRP autólogo conservaba su potencial biológico tras la conservación.

Los objetivos planteados al inicio de este estudio estaban orientados a realizar una evaluación detallada de la composición del preparado del plasma rico en plaquetas E-PRP, usado en Oftalmología, para determinar si el recuento de células sanguíneas y la concentración de los factores de crecimiento y proteínas de adhesión eran los esperados para un producto de estas características.

Para conseguir estos objetivos se determinaron las concentraciones de plaquetas, de leucocitos y glóbulos rojos en la sangre total y el E-PRP, y se cuantificaron los principales factores de crecimiento del E-PRP y además la proteína de adhesión fibronectina.

Paralelamente, con el objetivo de determinar la estabilidad biológica del E-PRP autólogo y demostrar que conservaba su potencial biológico tras la conservación a -20°C , se compararon las concentraciones de los factores de crecimiento del E-PRP fresco y E-PRP congelado a -20°C durante 3 meses, con o sin centrifugación posterior.

6.1. RECUENTO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

Existen diferentes opiniones acerca de cuál es el índice de concentración de plaquetas apropiado para utilizar al plasma rico en plaquetas como herramienta terapéutica en el ámbito de la regeneración tisular.

Por un lado, están los que prefieren los índices de concentración elevados o muy elevados. En este caso nos referimos a los que utilizan concentrados de las plaquetas más del doble sobre los valores basales (154) y afirman que más plaquetas proporcionan una mayor concentración de FC. En estos casos suelen ser necesarios sistemas complejos de obtención de PRP con equipos sofisticados o incluso varias centrifugaciones (131,155).

Por otro lado, se encuentran los investigadores que concentran las plaquetas moderadamente, normalmente tras solo una centrifugación y que utilizan el plasma enriquecido tal como se obtiene luego de la centrifugación (8,9,132), o los que lo diluyen para su aplicación clínica (129,130).

Y por último están los autores que prefieren que sus preparaciones no contengan plaquetas, ya sea porque utilizan sangre sin anticoagulante y obtienen suero autólogo (SA) quedando las plaquetas atrapadas en el coágulo sanguíneo conjuntamente con los leucocitos y la fibrina (111,156,157), o bien los que preparan un plasma rico en plaquetas, pero luego lo activan con cloruro cálcico o directamente con trombina, para obtener plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) (103,138,139). Ya

sea en el caso del suero autólogo o en el del PRGF, ambos preparados presentan concentraciones variables de FC (74,103).

En nuestro estudio, los resultados obtenidos tras la centrifugación de la sangre demuestran que el nivel de plaquetas para en el E-PRP es de casi el doble con respecto a los valores basales en la sangre total, ya que el índice de concentración alcanzado fue de 1,89. Por lo que la velocidad de centrifugación empleada para la elaboración del E-PRP y el tiempo establecido son adecuados para asegurar el suministro óptimo de FC para usos clínicos (155,158).

En cuanto al recuento de hematíes los resultados han mostrado que, tras la centrifugación, los valores de glóbulos rojos en el E-PRP son casi insignificantes en comparación con los recuentos de la sangre total ya que el porcentaje encontrado es de solo 0,9%, obteniéndose un índice de reducción mayor al 99%.

No se encontraron trabajos en la bibliografía consultada que expresaran la concentración de hematíes en los derivados sanguíneos usados para oftalmología. En un trabajo de Anitúa y col. (82), en el que analizaban la composición de matrices de PRGF, determinaron que la concentración de hematíes en el PRGF-Endoret estaba entre 0.02 y 0.04 ($\times 10^6/\mu\text{l}$). Otros autores encontraron concentraciones de glóbulos rojos entre 0.01 y 0.03 ($\times 10^6/\mu\text{l}$) en PRP utilizado para medicina regenerativa (159). Todos estos valores son comparables a los de nuestro estudio, que resultaron ser de 0.04 ± 0.01 ($\times 10^6/\mu\text{l}$).

Con respecto a los leucocitos, los valores que encontramos en el E-PRP fueron muy bajos en comparación con la sangre total, observándose una reducción del 82% con respecto a los valores basales. La concentración media de glóbulos blancos en el E-PRP ($0,97 \times 10^3/\mu\text{l}$), fue comparable a la que encontraron algunos autores en PRP (155,160) o ligeramente mayor a la que describen otros para el PRGF (64,82), aunque ninguno de estos últimos indica la concentración basal en sangre total de la que parten.

Estos pequeños valores de leucocitos encontrados en el E-PRP no lo catalogan como derivado sanguíneo “con” leucocitos. Esta denominación es adecuada para aquellos preparados con concentraciones elevadas de glóbulos blancos, cercanas o iguales a las que hay en la sangre total. Tal es el caso del L-PRF y el L-PRP (81–83), o el PRP preparado en dos pasos utilizado tradicionalmente en otras áreas de la medicina diferentes a la Oftalmología (29,161,162). También entrarían en esta categoría aquellos PRPs usados en Oftalmología tras una centrifugación, pero que incorporen la capa leucocitaria (129,130,155).

En la manera de lo posible, los leucocitos deberían evitarse en las preparaciones de PRP debido a su potencial efecto proinflamatorio ya que su presencia aumenta la concentración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , y las metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13 (163,164).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que los derivados sanguíneos sin leucocitos, como el SA, además de FC presentan valores de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 β , significativamente más elevados que los presentes en plasma rico en plaquetas con leucocitos (L-PRP) (81). Esto se

debe, a que en el momento de la coagulación de la sangre los leucocitos quedan atrapados en el coágulo, liberando así su contenido.

6.2. CUANTIFICACIÓN DE FACTORES DE CRECIMIENTO Y FIBRONECTINA, Y COMPARACIONES ENTRE MÉTODOS

El objetivo de determinar los FC tras someter al E-PRP a cuatro procedimientos distintos, E-PRP Fresco, E-PRP Fresco-Centrifugado, E-PRP Congelado a -20°C y E-PRP Congelado a -20°C -Centrifugado, era determinar cuál de ellos reportaba los mejores resultados para utilizarlo como tratamiento en diferentes afectaciones de la superficie ocular.

En cuanto a la elección de los FC que hemos analizado en este estudio, se han seleccionado los más representativos en el ámbito de la regeneración ocular, de la inmensa cantidad de moléculas presentes en el plasma, y que son secretados por las plaquetas.

Con la técnica ELISA se determinaron el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-BB), el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y la proteína plasmática fibronectina, para cada uno de los procedimientos realizados.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) participa activamente en la migración y proliferación del epitelio corneal en los procesos de regeneración tisular (44).

Las concentraciones de EGF en las muestras de E-PRP congelados fueron significativamente más elevadas que las correspondientes frescas, duplicando incluso sus valores. Estos valores de las muestras congeladas presentan valores más altos que los obtenidos con el PRGF de Anitúa y col. (64,103), y con el suero autólogo de López-García y col. (74).

Las concentraciones del E-PRP Congelado y el E-PRP Congelado-Centrifugado fueron comparables, no observándose variaciones entre sí. Esto indica que la centrifugación posterior que elimina las plaquetas del sobrenadante, no modifica la concentración del EGF probablemente porque todo ese EGF se haya liberado tras la congelación.

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), es un modulador de la quimiotaxis y de la mitosis celular de los fibroblastos (28). Se presenta en tres isoformas distintas, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, y para nuestro estudio hemos elegido al PDGF-BB, dado que es el que tiene mayor poder quimiotáctico de los tres (30,31).

PDGF-BB siguió el mismo patrón que el anterior EGF, observándose valores mucho más elevados en los E-PRP congelados en comparación con los frescos. Esta diferencia resultó significativa para el Fresco-Centrifugado, pero no para el Fresco cuando se comparaban con los respectivos E-PRP congelados, aunque las concentraciones encontradas fueron más del doble en estos últimos. Posiblemente esta falta de significación estadística se deba a la variabilidad de los datos en el E-PRP Congelado ($11961,67 \pm 4696,25$ pg/ml).

Las concentraciones obtenidas para el PDGF-BB son comparables a las halladas por otros autores (165,166), y muy superiores a las de otros investigadores (167). Por otra parte existen estudios interesantes que comparan los FC de muestras de PRP, PRGF y SA, pero determinan el PDGF-AB por lo que los resultados no pueden ser comparados (64,74,103). Otros autores no especifican que fracción de PDGF han analizado por lo que tampoco se pueden comparar los hallazgos (66).

Cuando se correlacionaron los distintos FC con las células sanguíneas en el E-PRP Fresco, se observó que existía una correlación significativa y positiva entre las plaquetas y el PDGF-BB ($r=0.841$ y $p=0.036$). Esto se debe a que dicho factor se libera durante la degranulación de las plaquetas cuando estas están en forma activa (144). Pero no se encontró correlación entre el recuento de plaquetas en el E-PRP y el PDGF-BB Congelado ($p=0.203$).

Varios autores han encontrado igualmente una correlación positiva entre el recuento plaquetario y el PDGF-BB (168–170), mientras que otros no han encontrado correlación entre ellos, en las preparaciones de plasma rico en plaquetas (165,166,171).

El factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) es un FC multifuncional y uno de los más importantes que intervienen en la modulación del comportamiento de los tejidos oculares (40). Favorece la quimiotaxis de fibroblastos, promueve la diferenciación de miofibroblastos e induce la producción de matriz extracelular por la estimulación de la producción de colágeno, fibronectina, y proteoglicanos y disminuye su degradación inhibiendo las metaloproteasas y otras

enzimas proteolíticas. Dependiendo del contexto puede tener efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios (172).

Las concentraciones de TGF- β 1 en el E-PRP Fresco y E-PRP Congelado fueron elevadas, no observándose diferencias estadísticas entre ellas, $84165,71 \pm 1905,18$ y $74710,36 \pm 7151,48$ pg/ml respectivamente. Pero la centrifugación posterior disminuyó drásticamente la concentración de este factor.

Dado los resultados obtenidos, cabe inferir que este FC no necesita ser activado para ejercer su función ya que no existen diferencias entre los valores frescos y tras la congelación a -20°C durante 3 meses. Y como la disminución de la concentración es significativa tras la centrifugación de ambos preparados, Fresco y Congelado, se podría suponer que las moléculas de TGF- β 1 se encuentran de alguna manera adheridas a la membrana de las plaquetas ya que cuando ellas son eliminadas los valores descienden significativamente.

Cuando se compararon los resultados obtenidos con los de la bibliografía, se observó que existía una gran variabilidad entre los diferentes ensayos, ya sea por la técnica de detección, el método de procesado de la sangre o las variaciones individuales (173,174). Nuestros valores de TGF- β 1 en el E-PRP fueron más elevados que los obtenidos por otros autores en SA (86), y en PRGF (103).

Algunos autores han encontrado una correlación positiva entre el TGF- β 1 y la concentración inicial de plaquetas (169), pero este hecho no ha

ocurrido en nuestro estudio ($r= 0.676$ y $p=0.141$), aunque a la vista de los resultados encontrados parece que existe alguna relación.

Por otro lado, se observó que existe una correlación significativa y positiva entre los leucocitos y la concentración del TGF- β 1 en el E-PRP Congelado ($r=0.932$ y $p=0.007$). Pero esta correlación, extrañamente, no era evidente cuando se contrastaban los recuentos de leucocitos con las concentraciones del TGF- β 1 en el E-PRP Fresco ($r=0.408$ y $p=0.421$). Probablemente esta diferencia se deba a cuestiones metodológicas en la realización de la técnica ELISA.

Esta correlación positiva encontrada entre los leucocitos y TGF- β 1 muy probablemente se deba a que este FC se origina en macrófagos, monocitos, neutrófilos y algunos tipos de linfocitos, además de en las plaquetas (57).

También se encontró una fuerte correlación significativa y positiva entre TGF- β 1 y VEGF-A, ($r=0.943$ y $p=0.005$). Este hecho podría explicarse debido a que la presencia de VEGF, dosis dependiente, induce la migración celular y la proliferación de células, acompañada por una sobrerregulación de RNAm TGF- β 1, mejorando la secreción de dicho factor y su bioactividad (175). Por otro lado, también se ha observado que citoquinas derivadas de leucocitos, junto con el TGF- β 1 liberado por las plaquetas y factores derivados del plasma, son capaces de inducir la expresión de genes de VEGF-A (176). De esta manera, VEGF-A y TGF- β 1 cooperan debido a que tienen una potente relación, para actuar en procesos de quimiotaxis celular y neovascularización favoreciendo la regeneración de los tejidos.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A) es un potente angiogénico y mitógeno celular endotelial que está presente en las plaquetas y en las células endoteliales estimulando la proliferación de vasos sanguíneos (57).

Con respecto a las concentraciones obtenidas de VEGF-A, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos, aunque en las muestras congeladas se encontró una concentración media ligeramente más elevada. Este hecho podría deberse a que la expresión del factor de crecimiento VEGF-A está modulada por otros factores como el EGF, TGF- α y β , PDGF, el FC derivado de queratinocitos o el FC insulínico tipo 1, así como por citoquinas. Además se ve afectado por estímulos tales como la hipoxia/isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia (HIF-1) (177).

Las concentraciones encontradas en el E-PRP Fresco fueron iguales que las halladas por otros autores en PRGF fresco, mientras que los valores del E-PRP Congelado a -20°C durante 3 meses resultaron ser el doble que los del PRGF almacenado en las mismas condiciones (103). Hay un estudio que compara las concentraciones de los FC en muestras de SA, PRGF y PRP pero que no especifica la fracción de VEGF analizada, y aunque las concentraciones se encuentran las mismas unidades que nuestro estudio (pg/ml) los valores son de otro orden de magnitud por lo que no pueden equipararse. En las comparaciones que realizan los autores entre estos tres derivados sanguíneos se observó que el SA presentaba los valores más elevados, seguido del PRGF y por último el PRP (67).

Por el contrario, en otro trabajo que compara los niveles de VEGF en SA con PRGF se encontraron que los niveles más elevados de VEGF correspondían al PRGF (64). Los autores comentan que a pesar de encontrarse valores más elevados de VEGF, no detectaron neovascularización en ninguno de los pacientes tratados con PRGF en estudios anteriores (137,138).

De este FC, a diferencia de los anteriores, nos interesaría que los valores en el E-PRP no sean muy elevados dado que una alta concentración de los mismos contribuye al desarrollo de enfermedad, ya que la sobreexpresión de VEGF puede conducir a alteraciones vasculares de la retina (50), e incluso se lo ha asociado al desarrollo y mantenimiento de tumores (51).

La fibronectina es una proteína de adhesión, que está libre en el plasma, y es uno de los constituyentes principales de la matriz extracelular. Esta proteína tiene la capacidad de interactuar con diversas moléculas y células estableciendo uniones entre ellas en la matriz extracelular. Esta molécula es de las primeras en llegar cuando se produce una herida corneal rellenando el lecho de la lesión, favoreciendo de esta manera la migración celular durante el proceso de reparación del epitelio corneal (53–55).

En nuestro ensayo no se encontraron diferencias significativas en la concentración de fibronectina, ya que los valores de esta proteína se mantuvieron constantes en los cuatro tipos de procedimientos realizados. La explicación de este hecho se fundamenta en que la fibronectina es una proteína plasmática y su presencia no depende de la activación plaquetaria.

Las concentraciones de fibronectina encontradas en nuestro estudio son ligeramente superiores a los valores de referencia del plasma sanguíneo ya que es aproximadamente de $300 \pm 100 \mu\text{g/ml}$ (52). Estas variaciones entre individuos sanos, probablemente fisiológicas, pueden deberse a las variaciones en la edad y el sexo (52).

Al igual que sucedía al intentar comparar nuestros resultados con la bibliografía para contrastar los niveles de los FC encontrados, es difícil hacerlo también para la fibronectina ya que los valores encontrados, aunque en la misma concentración ($\mu\text{g/ml}$) están en una orden de magnitud inferior y los autores aseguran que sus valores son normales como en nuestro caso (66,103). Una explicación razonable de esta situación podría ser la variabilidad en las técnicas analíticas de detección empleadas.

Aunque algunos autores encontraron una disminución de los niveles de esta proteína tras la conservación a -20°C durante 3 meses (103), no fue lo que sucedió en nuestro caso ya que las concentraciones obtenidas fueron semejantes en las muestras frescas y en las congeladas. Otros autores encontraron una fragmentación de la molécula de fibronectina que producía una declinación de su actividad, pero esto sucedía tras 4 a 12 meses de criopreservación (178).

A excepción del PDGF-BB, no se observó ningún tipo de correlación entre los factores de crecimiento EGF, TGF- β 1 y VEGF-A con el recuento de plaquetas ($p > 0.05$). Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores quienes afirman que este hecho podría explicarse por la alta variabilidad individual que existe en la producción celular y

almacenamiento de los FC en las plaquetas. El contenido de FC en los individuos podría estar influenciado por otras células diferentes de las plaquetas como los leucocitos, esto significa que cada individuo necesitaría diferentes concentraciones de plaquetas para lograr un efecto biológico comparable. De manera que, el conteo de plaquetas en sangre total o PRP no sería un factor predictivo de los valores de FC en el PRP (166,171). Otro hecho también posible es que existan otros mecanismos de interacción, no dependientes de plaquetas, entre la inmensa cantidad de moléculas presentes en el plasma sanguíneo que modulen la liberación de los factores de crecimiento.

En este estudio se han evaluado diferentes procedimientos aplicados al E-PRP con el objetivo de averiguar cómo afectaban la congelación, el tiempo de almacenaje y el centrifugado en la concentración de las diferentes moléculas bioactivas del plasma. Según los resultados obtenidos podríamos decir que la congelación a -20°C durante 3 meses proporcionó niveles más elevados de los factores de crecimiento EGF y PDGF-BB, y mantuvo las concentraciones de TGF- β 1, VEGF-A y Fibronectina.

Este comportamiento se debe a que el proceso de congelación y posterior descongelación del E-PRP provoca una potente activación de las plaquetas que contiene (167). El PRP debe activarse para que los gránulos α liberen su contenido, y esta activación puede ocurrir por la adición de colágeno, calcio y/o trombina, por el contacto con el vidrio o mediante ciclos de congelación (159,179). Con este último procedimiento se puede llegar hasta la liberación total de su contenido proporcionando así gran cantidad de FC.

Por el contrario, el centrifugado aplicado a las muestras de E-PRP frescas y congeladas, contrariamente a la idea previa de que pudiera activar el contenido de las plaquetas, no dio los resultados esperados. Todas las concentraciones de las moléculas estudiadas de los grupos “centrifugados”, exceptuando el TGF- β 1, fueron semejantes a sus homólogos sin centrifugar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

En el caso particular del TGF- β 1, las concentraciones de las muestras centrifugadas disminuyeron significativamente con respecto a sus homólogas sin centrifugar, demostrando que las plaquetas debían estar presentes para obtener valores cercanos a los iniciales.

Los parámetros de centrifugación empleados (6000 rpm durante 5 minutos) no produjeron la activación de las plaquetas presentes en el E-PRP, pero sí su agregación irreversible ya que quedaron aglomeradas en el fondo de los tubos cónicos siendo imposible su disolución.

El interés en la aplicación terapéutica del plasma rico en plaquetas ha aumentado en diferentes campos de la medicina. Se sabe que este tratamiento tiene propiedades que potencian y aceleran el proceso de regeneración tisular a través de la estimulación del crecimiento y la función de la célula. Debido a sus propiedades, ha generado grandes avances en muchas áreas de la medicina regenerativa. Este producto biológico y autólogo no genera rechazo y minimiza los posibles efectos adversos.

Numerosos estudios han demostrado la eficacia de E-PRP como tratamiento de varias enfermedades de la superficie ocular debido a su concentración de plaquetas, que permanecen viables y conservan la capacidad de proporcionar factores de crecimiento implicados en las respuestas biológicas de células (158).

E-PRP es muy versátil ya que puede aplicarse como colirio en distintas patologías de la superficie ocular como en el caso de úlceras corneales, ojo seco, disfunción de la superficie ocular tras LASIK (98–100,128), y como coágulo o membrana de fibrina autóloga para la reconstrucción quirúrgica en casos de úlceras corneales severas o perforaciones corneales (98,101,102,126,127).

Pero contrariamente a lo que cabría esperar, concentraciones elevadas de plaquetas ($1 \times 10^6/\mu\text{l}$), que producen concentraciones muy elevadas de FC no son necesarias para tratar exitosamente las lesiones corneales (167). Con concentraciones mucho menores se consiguen los efectos deseados. En nuestro estudio la concentración media de plaquetas fue de $495 \times 10^3/\mu\text{l}$ por lo que esta concentración resulta adecuada para obtener niveles suficientes de factores de crecimiento para tratar las diversas afectaciones de la superficie ocular que requieran de una terapia regenerativa.

El hallazgo de concentraciones elevadas de los factores de crecimiento EGF, PDGF-BB y Fibronectina en el E-PRP es la clave para obtener los efectos regenerativos deseados en la superficie ocular.

Esto se debe a que altos niveles de fibronectina conjuntamente con elevados valores de PDGF-BB estimulan la migración de las células

epiteliales corneales en los procesos de cicatrización corneal (180,181). Por su parte, el EGF aumenta la proliferación y la migración celular promoviendo el reordenamiento de los filamentos de actina (182), y además es capaz de estabilizar el film lagrimal y prevenir la apoptosis (183). Todas estas moléculas, conjuntamente con el FC fibroblástico (FGF) (no determinado en este estudio) facilitan la reepitelización corneal a la vez que son modulados por varias citoquinas (172).

Por lo que el E-PRP al presentar concentraciones elevadas de las mencionadas moléculas resulta ser una herramienta adecuada como terapia regenerativa de la superficie ocular.

La población de estudio denominada como “voluntarios sanos” consideramos que fue idónea dada la edad, sexo y género. Se excluyeron mujeres embarazadas, menores de 18 años, personas con enfermedades sistémicas de cualquier etiología, e individuos con molestias oculares que evidenciaran alguna posible patología de la superficie ocular. Para cumplir con este último requisito todos los voluntarios completaron el cuestionario OSDI de síntomas oculares (152). En este caso el índice debía estar en el rango considerado como normal, $OSDI \leq 12$. Este requisito se basó en que las personas con alteraciones de la superficie ocular o con patologías sistémicas presentan cantidades variables de citoquinas inflamatorias o proinflamatorias, además de otras moléculas que podrían modificar la proporción de los factores de crecimiento presentes en el E-PRP conduciendo a conclusiones erróneas (40,184).

Las posibles limitaciones de este estudio podrían relacionarse con el número de voluntarios de los que se obtuvieron las muestras de sangre

para realizar el ensayo (n=6), pero dado que había que aplicar cuatro tratamientos diferentes y hacer cinco determinaciones en cada una de ellas, no era viable aumentar el número de individuos. Para poder sacar conclusiones relevantes, se realizó un cuidadoso análisis estadístico utilizando los test más restrictivos para este tipo de estudios.

El estudio se diseñó siguiendo las pautas de otros autores para este tipo de ensayos, los cuales utilizaban tamaños muestrales semejantes para analizar las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento en sus preparados sanguíneos. Incluso, algunos de ellos utilizan muestras de 3 sujetos para caracterizar nuevos derivados sanguíneos (64,82,83,185).

Otra posible fuente de variabilidad en los resultados, podría ser que a nivel técnico los test de ELISA se realizaron en el modo manual, en lo que respecta a la adición de muestras problema, reactivos y múltiples lavados de las placas multipocillo. En los tiempos de incubación requeridos las placas se mantuvieron en un agitador mecánico orbital según protocolo y para realizar la lectura del color desarrollado se utilizó un lector de placas multipocillos complementado con el uso del software Maguellan™. Para reducir al máximo las variaciones no deseadas y controlar la reproducibilidad, todas las determinaciones incluidas las curvas standard se realizaron por duplicado.

Así mismo, los recuentos de plaquetas, hematíes y leucocitos en la sangre total y en el E-PRP, también se realizaron por duplicado para limitar la variabilidad.

Por otro lado, no se determinaron las concentraciones de los factores de crecimiento y fibronectina a tiempos intermedios de conservación entre su obtención (fresco) y los 3 meses, lo que podría haber dado una mayor información sobre la dinámica de su conservación.



CONCLUSIONES





7. CONCLUSIONES

1. Las condiciones de centrifugación empleadas para preparar el E-PRP (1400rpm, durante 10 minutos, a 5°C), son adecuadas para concentrar las plaquetas y minimizar la inclusión en el mismo de células sanguíneas.
2. La concentración media de plaquetas en el E-PRP es de $495,00 \pm 95,14 \times 10^3/\mu\text{l}$.
3. La presencia de glóbulos rojos en el E-PRP es casi inexistente ($0,04 \pm 0,01 \times 10^3/\mu\text{l}$) lo que lo hace propicio para la aplicación tópica ocular.
4. El E-PRP presenta una cantidad muy reducida de leucocitos ($0,97 \pm 0,03 \times 10^6/\mu\text{l}$) en comparación con los niveles de la sangre total.
5. El índice de concentración de plaquetas en el E-PRP (1,89) es suficiente para proporcionar una elevada cantidad de factores de crecimiento.
6. A la vista de los resultados observados este estudio ha permitido caracterizar el E-PRP, determinando las concentraciones de las células sanguíneas arriba descritas y los factores de crecimiento:
 - EGF: $672,25 \pm 109,35 \text{ pg/ml}$
 - PDGF-BB: $11961,67 \pm 4287,07 \text{ pg/ml}$
 - TGF- β 1: $7410,36 \pm 7151,48 \text{ pg/ml}$
 - VEGF-A: $494,49 \pm 378,54 \text{ pg/ml}$
 - Fibronectina: $549,02 \pm 2,48 \mu\text{g/ml}$

7. Aunque las plaquetas son el reservorio de la mayoría de los factores de crecimiento, su concentración en el E-PRP no se correlaciona necesariamente con del número de plaquetas/ μl .
8. De los cuatro procedimientos realizados, la congelación del E-PRP a -20°C durante 3 meses proporcionó niveles más elevados de los factores de crecimiento EGF y PDGF-BB, y mantuvo las concentraciones del TGF- β 1, VEGF-A y la Fibronectina.
9. La composición del E-PRP Fresco y del congelado a -20°C almacenado durante 3 meses, proporciona una combinación adecuada de moléculas bioactivas para su empleo en la regeneración de la superficie ocular.



REFERENCIAS





8. REFERENCIAS

1. Garg A, Sheppard JD, Donnenfeld ED, Meyer D, Mehta CK. Ojo seco y otros trastornos de la superficie ocular: diagnóstico y tratamiento en xero-dacriología. Madrid. España: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 2008. 472 p.
2. Cárdenas Díaz T, Capote Cabrera A, Benítez Merino M del C, Noriega Martínez JL, Montero Díaz E, Hormigó Puertas IF. Medicina regenerativa y superficie ocular. Rev Cuba Oftalmol. 2012;25(1):104–18.
3. Pikuła M, Langa P, Kosikowska P, Trzonkowski P. Stem cells and growth factors in wound healing. Postep Hig Med Dosw. 2015 Jan 2;69:874–85.
4. Coursey TG, de Paiva CS. Managing Sjögren’s syndrome and non-Sjögren syndrome dry eye with anti-inflammatory therapy. Vol. 8, Clinical Ophthalmology. 2014. p. 1447–58.
5. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, y col. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular

- cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol.* 1996 Jul;122(1):38–52.
6. Hick S, Demers PE, Brunette I, La C, Mabon M, Duchesne B. Amniotic membrane transplantation and fibrin glue in the management of corneal ulcers and perforations: a review of 33 cases. *Cornea.* 2005 May;24(4):369–77.
 7. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Kinoshita S. Ocular surface reconstruction using stem cell and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res.* 2015 Mar;51:187–207.
 8. Alio J, Arnalich-Montiel F, Rodriguez A. The role of 'eye platelet rich plasma' (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1257–65.
 9. Alio JL, Rodriguez AE, WróbelDudzińska D. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. *Curr Opin Ophthalmol.* 2015;26(4):325–32.
 10. Nugent RB, Lee GA. Ophthalmic use of blood-derived products. *Surv Ophthalmol.* 2015;60(5):406–34.
 11. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets.

- Leuk Res. 2007 Oct;31(10):1339–41.
12. Rivadeneyra L, Ivani PC, Schattner M, Pozner RG. Así comienza la vida plaquetaria: un viaje desde los megacariocitos medulares a las plaquetas circulantes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* 2016;50(2):233–45.
 13. López Farré A, Macaya C. Plaqueta: Fisiología de la activación y la inhibición. *Rev Española Cardiol Supl.* 2013;13(SUPPL.2):2–7.
 14. Farndale RW, Sixma JJ, Barnes MJ, De Groot PG. The role of collagen in thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2004;2(4):561–73.
 15. Iván Flores-Rivera O, Ramírez-Morales K, Meza-Márquez JM, Nava-López JA. Fisiología de la coagulación. *Rev Mex Anesthesiol.* 2014;37:282–386.
 16. Xu W, Wang TY, Becker RC. Enfermedades hematológicas: desde dentro del corazón. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64(7):606–13.
 17. Hidalgo Mesa CJ, Cepero Rodríguez I, Berrios Águila Jorge Eduardo, Ulloa Quintanilla FO, Polanco Rodríguez F. Infarto cerebral: complicaciones y causas de muerte. *Rev Cuba Med Mil.* 2005;34.

18. Smyth SS, Mcever RP, Weyrich AS, Morrell CN, Hoffman MR, Arepally GM, y col. Platelet functions beyond hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2009;7(11):1759–66.
19. González-Villalva A. Sangre y Hematopoyesis. In: Kierszenbaum AL, Tres LL, editors. *Histología y Biología Celular*. Barcelona, España: Elsevier España, S.L; 2012. p. 168–201.
20. Spinelli SL, Maggirwar SB, Blumberg N, Phipps RP. Nuclear emancipation: a platelet tour de force. *Sci Signal.* 2010;3(144):pe37.
21. 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 Jan;91(1):4–15.
22. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2011;105(SUPPL.1):13–33.
23. Marx RE. Platelet-Rich Plasma: Evidence to Support Its Use. Vol. 62, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2004. p. 489–96.
24. Nurden AT, Nurden P, Sanchez M, Andia I, Eduardo A. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008;2(i):3532–48.

25. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*. 2013;122(15):2550–4.
26. Peñarrocha Diago, Bielsa JMS. Puesta al día en Factores de crecimiento y proteínas que influyen en el crecimiento óseo: aplicaciones en implantología oral. *Periodoncia*. 2001;11(Nº 3):205–16.
27. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16(5):585–601.
28. Alvarez RH, Kantarjian HM, Cortes JE. Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin Proc*. 2006 Sep;81(9):1241–57.
29. Beca T, Hernandez G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodoncia*. 2007;19(1):39–52.
30. Kim WJ, Mohan RR, Mohan RR, Wilson SE. Effect of PDGF, IL-alpha, and BMP2/4 on corneal fibroblast chemotaxis: Expression of the platelet-derived growth factor system in the cornea. *Investig*

Ophthalmol Vis Sci. 1999;40(7):1364–72.

31. Colciago A, Celotti F, Casati L, Giancola R, Castano SM, Antonini G, y col. In vitro effects of PDGF isoforms (AA, BB, AB and CC) on migration and proliferation of SaOS-2 osteoblasts and on migration of human osteoblasts. *Int J Biomed Sci.* 2009;5(4):380–9.
32. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 2008;22(10):1276–312.
33. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, Robson LE, Pierce GF. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet (London, England).* 1992 Jan 4;339(8784):23–5.
34. Pierce GF, Tarpley JE, Allman RM, Goode PS, Serdar CM, Morris AB, y col. Tissue Repair Processes in Healing Chronic Pressure Ulcers Treated with Recombinant Platelet-Derived Growth Factor BB. *Am J Pathol.* 1994;145(6).
35. Pierce GF, Tarpley JE, Tseng J, Bready J, Chang D, Kenney WC, y col. Detection of platelet-derived growth factor (PDGF)-AA in actively healing human wounds treated with recombinant PDGF-BB and

- absence of PDGF in chronic nonhealing wounds. *J Clin Invest.* 1995;96(3):1336–50.
36. Smiell JM, Wieman TJ, Steed DL, Perry BH, Sampson AR, Schwab BH. Efficacy and safety of becaplermin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers: A combined analysis of four randomized studies. *Wound Repair Regen.* 1999;7(5):335–46.
37. Steed DL. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plast Reconstr Surg.* 2006 Jun;117(7 Suppl):143S–149S; discussion 150S–151S.
38. Sarment DP, Cooke JW, Miller SE, Jin Q, McGuire MK, Kao RT, y col. Effect of rhPDGF-BB on bone turnover during periodontal repair. *J Clin Periodontol.* 2006;33(2):135–40.
39. Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol.* 2003 Sep;74(9):1282–92.

40. Saika S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Investig.* 2006;86(2):106–15.
41. Costanza B, Umelo I, Bellier J, Castronovo V, Turtoi A. Stromal Modulators of TGF- β in Cancer. *J Clin Med.* 2017 Jan 6;6(1):7.
42. Stahnke T, Kowtharapu BS, Stachs O, Schmitz K-P, Wurm J, Wree A, y col. Suppression of TGF- β pathway by pirfenidone decreases extracellular matrix deposition in ocular fibroblasts in vitro. *PLoS One.* 2017;12(2):e0172592.
43. Gum S II, Kim Y-H, Jung J-C, Kim IG, Lee JS, Lee KW, y col. Cyclosporine A inhibits TGF- β 2-induced myofibroblasts of primary cultured human pterygium fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jan 22;482(4):1148–53.
44. Wang L, Wu X, Shi T, Lu L. Epidermal growth factor (EGF)-induced corneal epithelial wound healing through nuclear factor κ B subtype-regulated CCCTC binding factor (CTCF) activation. *J Biol Chem.* 2013;288(34):24363–71.
45. Hodges RR, Bair JA, Carozza RB, Li D, Shatos MA, Dartt DA. Signaling pathways used by EGF to stimulate conjunctival goblet cell secretion.

- Exp Eye Res. 2012;103:99–113.
46. Kenchegowda S, Bazan NG, Bazan HEP. EGF stimulates lipoxin A4 synthesis and modulates repair in corneal epithelial cells through ERK and p38 activation. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(5):2240–9.
 47. Khanbanha N, Atyabi F, Taheri A, Talaie F, Mahbod M, Dinarvand R. Healing efficacy of an EGF impregnated triple gel based wound dressing: In vitro and in vivo studies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–10.
 48. Ferrara N, Houck K, Jakeman LYN, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev.* 1992 Feb;13(1):18–32.
 49. Yu CQ, Zhang M, Matis KI, Kim C, Rosenblatt MI. Vascular endothelial growth factor mediates corneal nerve repair. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49(9):3870–8.
 50. Duffy AM, Bouchier-hayes DJ, Harmey JH. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. *VEGF and Cancer.* Austin (TX): Landes

Bioscience; 2004. 133-144 p.

51. Stevenson W, Cheng SF, Dastjerdi MH, Ferrari G, Dana R. Corneal neovascularization and the utility of topical VEGF inhibition: Ranibizumab (Lucentis) Vs bevacizumab (Avastin). *Ocul Surf.* 2012;10(2):67–83.
52. Lucena S, Arocha Piñango CL, Guerrero B. Fibronectin. Structure and functions associated to hemostasis. Review. *Invest Clin.* 2007 Jun;48(2):249–62.
53. Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, y col. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv wound care.* 2014;3(7):445–64.
54. Ljubimov A V, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. Vol. 49, *Progress in Retinal and Eye Research.* 2015. p. 17–45.
55. Paniagua, Ricardo., Nistal., Manuel., Sesma., Pilar., Alvarez-Uría., Manuel., Fraile., Benito., Anadón., Ramón., J. Sáez. F. *Biología Celular.* Madrid: McGraw-Hill - Interamericana de España, S. A. U.; 2007. 381 p.
56. Makogonenko E, Tsurupa G, Ingham K, Medved L. Interaction of

- fibrin(ogen) with fibronectin: Further characterization and localization of the fibronectin-binding site. *Biochemistry*. 2002;41(25):7907–13.
57. De La Mata J. Plasma rico en plaquetas: ¿un nuevo tratamiento para el reumatologo? *Reumatol Clin*. 2013;9(3):166–71.
58. Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotrophic capacity of a growth factor preparation produced from platelet concentrates on corneal epithelial cells: a potential agent for the treatment of ocular surface defects? *Transfusion*. 2004 Dec;44(12):1724–31.
59. Hartwig D, Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L, y col. Topical treatment of ocular surface defects: comparison of the epitheliotrophic capacity of fresh frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model. *Transfus Med*. 2005;15(2):107–13.
60. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, y col. Corneal epitheliotrophic capacity of three different blood-derived preparations. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(6):2438–44.

61. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(4):529–35.
62. Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zaldueño M, de la Fuente M, y col. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*. 2005 Mar;23(2):281–6.
63. Anitua E, Sánchez M, Zaldueño MM, De La Fuente M, Prado R, Orive G, y col. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif*. 2009 Apr;42(2):162–70.
64. Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Llodes 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.
65. Anitua E, Sanchez M, Merayo-Llodes J, de La Fuente M, Muruzabal F, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival

- fibroblasts and inhibits and reverts TGF- β 1-induced myodifferentiation. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Aug 1;52(9):6066–73.
66. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales M-C. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012 Aug 15;53(9):5571–8.
67. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Hernández-Moya R, Durán JA, Morales M-C. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea*. 2014 Jun;33(6):614–20.
68. Anitua E, Muruzabal F, Alcalde I, Merayo-Llodes 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.
69. Etxebarria J, Sanz-Lázaro S, Hernández-Moya R, Freire V, Durán JA, Morales MC, y col. Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol*. 2017 Mar 7;doi: 10.1111/aos.13371.

70. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo MM, De la Fuente M, Azofra J, y col. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology*. 2007 Aug 5;46(12):1769–72.
71. Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F, y col. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2015 Sep;23(9):2690–703.
72. Beitzel K, McCarthy MB, Russell RP, Apostolakos J, Cote MP, Mazzocca AD. Learning about PRP using cell-based models. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):38–45.
73. Masoudi EA, Ribas J, Kaushik G, Leijten J, Khademhosseini A. Platelet-Rich Blood Derivatives for Stem Cell-Based Tissue Engineering and Regeneration. *Curr Stem Cell Reports*. 2016;2(1):33–42.
74. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Ramírez N, Méndez MT, Raposo R. Stability of Growth Factors in Autologous Serum Eyedrops After Long-Term Storage. *Curr Eye Res*. 2015;3683(November):1–7.

75. 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.
76. Pınarlı FA, Okten G, Beden U, Fışgın T, Kefeli M, Kara N, y col. Keratinocyte growth factor-2 and autologous serum potentiate the regenerative effect of mesenchymal stem cells in cornea damage in rats. *Int J Ophthalmol*. 2014;7(2):211–9.
77. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Giménez C, Acera A, Suárez-Cortés T. Effects of Autologous Serum Eye Drops on Conjunctival Expression of MUC5AC in Patients With Ocular Surface Disorders. *Cornea*. 2016 Mar;35(3):336–41.
78. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJJ, Mouhyi J, y col. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):51–5.
79. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, y col. Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-

Inflammatory Properties. *J Periodontol.* 2007;78(4):661–9.

80. Mazzocca AD, Mccarthy BR, Intravia J, Beitzel KA, Apostolakos J, Cote MP, y col. An In Vitro Evaluation of the Anti-Inflammatory Effects of Platelet-Rich Plasma, Ketorolac, and Methylprednisolone. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg.* 2013 Apr;29(4):675–83.
81. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich Concentrates Differentially Release Growth Factors and Induce Cell Migration In Vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015 May;473(5):1635–43.
82. 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 - Part A.* 2015 Mar;103(3):1011–20.
83. Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One.* 2015;10(3):1–19.
84. Anitua E, Muruzabal F, De la Fuente M, Merayo-Llodes J, Orive G. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived

- autologous eye drop. *Exp Eye Res.* 2014;119.
85. Anitua E, Muruzabal F, de la Fuente M, Riestra A, Merayo-Llodes J, Orive G. PRGF exerts more potent proliferative and anti-inflammatory effects than autologous serum on a cell culture inflammatory model. *Exp Eye Res.* 2016 Oct;151:115–21.
86. Stenwall PA, Bergström M, Seiron P, Sellberg F, Olsson T, Knutson F, y col. Improving the anti-inflammatory effect of serum eye drops using allogeneic serum permissive for regulatory T cell induction. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(7):654–7.
87. Chiang C-C, Chen W-L, Lin J-M, Tsai Y-Y. Allogeneic serum eye drops for the treatment of persistent corneal epithelial defect. *Eye.* 2009;23(2):290–3.
88. Chiang C-C, Lin J-M, Chen W-L, Tsai Y-Y. Allogeneic serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Cornea.* 2007 Aug;26(7):861–3.
89. Na K-S, Kim MS. Allogeneic serum eye drops for the treatment of dry eye patients with chronic graft-versus-host disease. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2012;28(5):479–83.

90. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*. 2002 Dec;70(12):6524–33.
91. Tohidnezhad M, Varoga D, Podschun R, Wruck CJ, Seekamp A, Brandenburg LO, y col. Thrombocytes are effectors of the innate immune system releasing human beta defensin-3. *Injury*. 2011 Jul;42(7):682–6.
92. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. *BMC Microbiol*. 2013 Feb 25;13:47.
93. Anitua E, Muruzabal F, Orive G. Antimicrobial properties of plasma rich in growth factors (PRGF- ENDORET) technology. *Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv*. 2011;414–21.
94. Li H, Hamza T, Tidwell JE, Clovis N, Li B. Unique antimicrobial effects of platelet-rich plasma and its efficacy as a prophylaxis to prevent implant-associated spinal infection. *Adv Healthc Mater*. 2013;2(9):1277–84.
95. Bielecki T, Gazdzik TS, Szczepanski T. Benefit of percutaneous

- injection of autologous platelet-leukocyte-rich gel in patients with delayed union and nonunion. *Eur Surg Res.* 2008 Feb 15;40(3):289–96.
96. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2014;4(1):3–9.
97. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225–8.
98. 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):1286–94.
99. Alio JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J, Rodriguez A, Artola A. Treatment of ocular surface syndrome after LASIK with autologous platelet-rich plasma. *J Refract Surg.* 2007;23(6):617–9.
100. 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.

101. Alio JL, Rodriguez AE, Martinez LM, Rio AL. Autologous Fibrin Membrane Combined With Solid Platelet-Rich Plasma in the Management of Perforated Corneal Ulcers. *JAMA Ophthalmol.* 2013 Jun 1;131(6):745–751.
102. 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 May;32(5):619–24.
103. Anitua E, Muruzabal F, Pino A, Merayo-Llodes J, Orive G. Biological Stability of Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops After Storage of 3 Months. *Cornea.* 2013;32(10):1380–6.
104. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004 Nov 1;88(11):1467–74.
105. Movahedan H, Ghassemifar V. Treatment of persistent corneal epithelial defect with autologous serum. *Asian J Ophthalmol.* 2006

- Oct;8(6):236–41.
106. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Use of autologous serum in ophthalmic practice. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2007 Jan;82(1):9–20.
107. Tananuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, Yi Q, McKelvie P, McCarty DJ, y col. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea*. 2001 Nov;20(8):802–6.
108. Lagnado R, King AJ, Donald F, Dua HS. A Protocol For Low Contamination Risk of Autologous Serum Drops in The Management of Ocular Surface Disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004 Apr;88(4):464–5.
109. Noble BA, Loh RS, MacLennan S, Pesudovs K, Reynolds A, Bridges LR, y col. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(5):647–52.
110. von Hofsten J, Egardt M, Zetterberg M. The use of autologous serum for the treatment of ocular surface disease at a swedish tertiary referral center. *Int Med Case Rep J*. 2016;9:47–54.
111. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Ramírez N, Raposo R,

Méndez MT. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: Clinical and experimental comparative study. *Acta Ophthalmol.* 2014;92(1):22–9.

112. Semeraro F, Forbice E, Braga O, Bova A, Di Salvatore A, Azzolini C. Evaluation of the efficacy of 50% autologous serum eye drops in different ocular surface pathologies. *Biomed Res Int.* 2014;2014:826970.

113. Gus PI, Marinho D, Zelanis S, Bell??-Klein A, Locatelli C, Nicola F, y col. A Case-Control Study on the Oxidative Balance of 50% Autologous Serum Eye Drops. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:9780193.

114. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Geerling G. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2005 Jul 9;243(7):706–14.

115. 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 Apr;27(4):459–61.

116. Viso E, Gude F, Rodríguez-Ares MT. The association of meibomian gland dysfunction and other common ocular diseases with dry eye: a population-based study in Spain. *Cornea*. 2011 Jan;30(1):1–6.
117. Al-Saedi Z, Zimmerman A, Bachu RD, Dey S, Shah Z, Baugh R, y col. Dry Eye Disease: Present Challenges in the Management and Future Trends. *Curr Pharm Des*. 2016;22(28):4470–90.
118. Muñoz-Hernández AM, Santos-Bueso E, Cuiña-Sardiña R, Díaz-Valle D, Gegúndez-Fernández JA, Benítez-del-Castillo JM. New therapies for neurotrophic keratitis. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2016 Mar;91(3):105–7.
119. Rosenthal AR, Harbury C, Egbert PR, Rubenstein E. Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: experiments with sutureless lamellar kertaoplasty in the rabbit. *Inv Ophthalmol*. 1975;14(November):872–5.
120. Ralph R, Doane M, Dohlman C. Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump. *Arch Ophthalmol*. 1975 Oct;93(10):1039–43.
121. Semeraro F, Forbice E, Nascimbeni G, Taglietti M, Romano V, Guerra G, y col. Effect of autologous serum eye drops in patients with

- Sjögren syndrome-related dry eye: Clinical and In Vivo confocal microscopy evaluation of the ocular surface. *In Vivo* (Brooklyn). 2016;30(6):931–8.
122. Soni NG, Jeng BH. Blood-derived topical therapy for ocular surface diseases. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(1):22–7.
123. Noda-Tsuruya T, Asano-Kato N, Toda I, Tsubota K. Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK. *J Refract Surg*. 2006;22(1):61–6.
124. Pan Q, Angelina A, Marrone M, Stark WJ, Akpek EK. Autologous serum eye drops for dry eye. Pan Q, editor. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Feb 28;2:doi: 10.1002/14651858.CD009327.pub3. Review.
125. Anitua E, Muruzabal F, Tayebba A, Riestra A, Perez VL, Merayo-Llves J, y col. Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol*. 2015 Dec;93(8):e605-14.
126. Ortuño-Prados VJ, Alio JL. Tratamiento de úlcera corneal neurotrófica con plasma rico en plaquetas y Tutopatch®. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2011;86(4):121–3.
127. Arnalich F, Rodriguez AE, Luque-Rio A, Alio JL. Solid Platelet Rich

- Plasma in Corneal Surgery. *Ophthalmol Ther.* 2016;5(1):31–45.
128. Javaloy J, Alió JL, Rodriguez AE, Vega A, Muñoz G. Effect of platelet-rich plasma in nerve regeneration after LASIK. *J Refract Surg.* 2013;29(3):213–9.
129. Kim KM, Shin Y-T, Kim HK. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Jpn J Ophthalmol.* 2012 Nov 13;56(6):544–50.
130. Lee JH, Kim MJ, Ha SW, Kim HK. Autologous Platelet-rich Plasma Eye Drops in the Treatment of Recurrent Corneal Erosions. *Korean J Ophthalmol.* 2016 Apr;30(2):101–7.
131. Avila MY. Restoration of human lacrimal function following platelet-rich plasma injection. *Cornea.* 2014;33(1):18–21.
132. Figueroa MS, Govetto A, Arriba-Palomero P De. Short-term results of platelet-rich plasma as adjuvant to 23-G vitrectomy in the treatment of high myopic macular holes. *Eur J Ophthalmol.* 2015;26(5):491–6.
133. Del Cid RMDA, Escoriaza IMDE. Subconjunctival application of regenerative factor-rich plasma for the treatment of ocular alkali burns. *Eur J Ophthalmol.* 2009;19(6):909–15.

134. Anitua E, Alkhraisat MH, Orive G. Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors. *J Control Release*. 2012 Jan 10;157(1):29–38.
135. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Padilla S. A biological therapy to osteoarthritis treatment using platelet-rich plasma. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 Aug 12;13(8):1161–72.
136. Anitua E, Pino A, Martinez N, Orive G, Berridi D. The Effect of Plasma Rich in Growth Factors on Pattern Hair Loss: A Pilot Study. *Dermatol Surg*. 2017 May;43(5):658–70.
137. López-Plandolit S, Morales M-C, Freire V, Etxebarria J, Durán J a. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 2010;29(8):843–8.
138. Lopez-Plandolit S, Morales M-C, 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.
139. Merayo-Lloves J, Sanchez-Avila RM, Riestra AC, Anitua E, Begoña L, Orive G, y col. Safety and Efficacy of Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops for the Treatment of Evaporative Dry Eye.

- Ophthalmic Res. 2016;56(2):68–73.
140. Merayo-Llodes J, Sanchez RM, Riestra AC, Anitua E, Begoña L, Orive G, y col. Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eyedrops in Refractory Cases of Ocular Surface Disorders. *Ophthalmic Res.* 2016;55(2):53–61.
141. Sanchez-Avila RM, Merayo-Llodes J, Riestra AC, Fernandez-Vega Cueto L, Anitua E, Begoña L, y col. Treatment of patients with neurotrophic keratitis stages 2 and 3 with plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) eye-drops. *Int Ophthalmol.* 2017 Jun 15;doi: 10.1007/s10792-017-0582-7.
142. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea.* 2005 Nov;24(8 Suppl):S2–11.
143. De Pascale MR, Sommese L, Casamassimi A, Napoli C. Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update. Vol. 29, *Transfusion Medicine Reviews.* 2015. p. 52–61.
144. González M, Arteaga-Vizcaíno M, Benito M, Benito M. Application of platelet rich plasma (PRP) and its derivatives in dental implantologie

and plastic surgery. Invest Clin. 2012 Dec;53(4):408–18.

145. Rodriguez IA, Growney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-rich plasma in bone regeneration: Engineering the delivery for improved clinical efficacy. Vol. 2014, BioMed Research International. 2014. p. 1–15.
146. Hegab AF, Ali HE, Elmasry M, Khallaf MG. Platelet-rich plasma injection as an effective treatment for temporomandibular joint osteoarthritis. J Oral Maxillofac Surg. 2015;73(9).
147. Leo MS, Kumar AS, Kirit R, Konathan R, Sivamani RK. Systematic review of the use of platelet-rich plasma in aesthetic dermatology. Vol. 14, Journal of Cosmetic Dermatology. 2015.
148. Anitua E, Muruzabal F, de la Fuente M, Merayo J, Durán J, Orive G. Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Ocular Surface Diseases. Curr Eye Res. 2016 Jul;41(7):875–82.
149. De Pascale MR, Lanza M, Sommese L, Napoli C. Human Serum Eye Drops in Eye Alterations: An Insight and a Critical Analysis. J Ophthalmol. 2015;2015:1–14.
150. Fischer KR, Opitz A, Böeck M, Geerling G. Stability of Serum Eye

- Drops After Storage of 6 Months. *Cornea*. 2012 Nov;31(11):1313–8.
151. General Assembly of the World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Am Coll Dent*. 2014;81(3):14–8.
152. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol*. 2000 May;118(5):615–21.
153. Ruiz Argüelles GJ. Fundamentos de hematología. V. Madrid. España: Ed. Médica Panamericana; 2009. 344 p.
154. Tanidir ST, Yuksel N, Altintas O, Yildiz DK, Sener E, Caglar Y. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea*. 2010;29(6):664–9.
155. Mazzocca AD. Platelet-Rich Plasma Differs According to Preparation Method and Human Variability. *J Bone Jt Surg*. 2012 Feb 15;94(4):308.
156. Urzua C a., Vasquez DH, Huidobro A, Hernandez H, Alfaro J. Randomized Double-Blind Clinical Trial of Autologous Serum Versus Artificial Tears in Dry Eye Syndrome. *Curr Eye Res*. 2012;37(8):684–8.

157. Celebi ARC, Ulusoy C, Mirza GE. The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye syndrome: A randomized double-blind crossover study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252(4):619–26.
158. Stellos K, Kopf S, Paul A, Marquardt JU, Gawaz M, Huard J, y col. Platelets in regeneration. *Semin Thromb Hemost.* 2010 Mar;36(2):175–84.
159. Amable PR, Carias RBV, Teixeira MVT, da Cruz Pacheco I, Corrêa do Amaral RJF, Granjeiro JM, y col. Platelet-rich plasma preparation for regenerative medicine: optimization and quantification of cytokines and growth factors. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):67.
160. Pochini A de C, Antonioli E, Bucci DZ, Sardinha LR, Andreoli CV, Ferretti M, y col. Analysis of cytokine profile and growth factors in platelet-rich plasma obtained by open systems and commercial columns. *Einstein (São Paulo).* 2016;14(3):391–7.
161. Dhurat R, Sukesh M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 2014;7(4):189–97.

162. Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, y col. In vivo comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrates vs. platelet-rich plasma. PLoS One. 2012;7(7):e40833.
163. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of Leukocyte Concentration in Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Tendinopathy. J Bone Jt Surgery-American Vol. 2012 Oct 3;94(19):1–8.
164. Sundman EA, Cole BJ, Fortier LA. Growth Factor and Catabolic Cytokine Concentrations Are Influenced by the Cellular Composition of Platelet-Rich Plasma. Am J Sports Med. 2011 Oct;39(10):2135–40.
165. González M, Arteaga-vizcaíno M, Ruiz A, Briceño O, Quintero M, Atencio R, y col. Niveles del factor de crecimiento derivado de plaquetas en el plasma rico en plaquetas antes y después de antiagregantes plaquetarios (PDGF levels in platelet-rich plasma before and after anti platelets drugs). Av en Biomed. 2013;2(3):127–36.
166. Weibrich G, Kleis WKG, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in

- platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 2002 Apr;30(2):97–102.
167. Ronci C, Ferraro AS, Lanti A, Missiroli F, Sinopoli S, Del Proposto G, y col. Platelet-rich plasma as treatment for persistent ocular epithelial defects. *Transfus Apher Sci.* 2015 Jun;52(3):300–4.
168. Kobayashi Y, Saita Y, Nishio H, Ikeda H, Takazawa Y, Nagao M, y col. Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci.* 2016 Sep;21(5):683–9.
169. Yuan N, Wang C, Wang Y, Yu T, Long Y, Zhang X, y col. Preparation of autologous platelet-rich gel for diabetic refractory dermal ulcer and growth factors analysis from it. *Chinese J reparative Reconstr Surg.* 2008 Apr;22(4):468–71.
170. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, y col. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion.* 2001 Oct;41(10):1217–24.
171. Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth

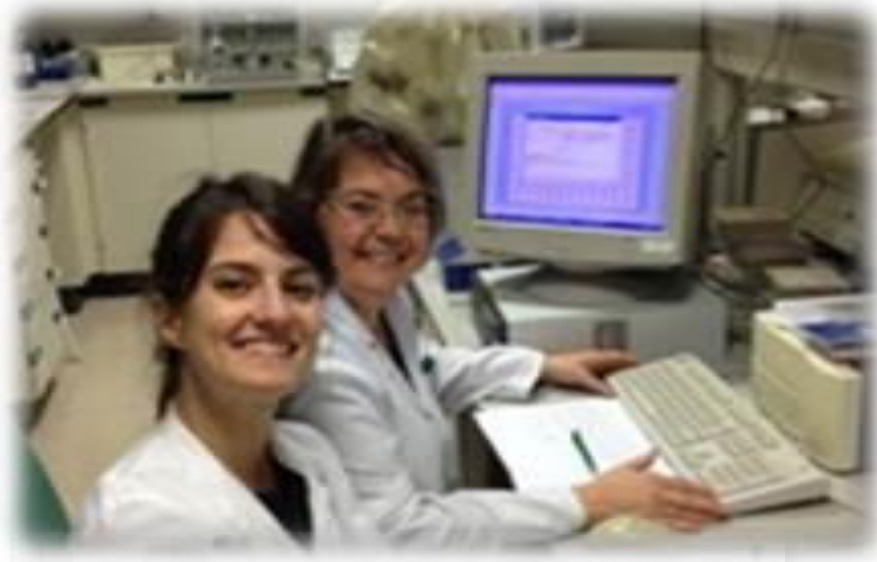
- factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Nov;114(6):1502–8.
172. Ambroziak AM, Szaflik J, Szaflik JP, Ambroziak M, Witkiewicz J, Skopinski P. Immunomodulation on the ocular surface: A review. *Cent Eur J Immunol.* 2016;41(2):195–208.
173. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems. *Am J Sports Med.* 2011 Feb 1;39(2):266–71.
174. Grainger DJ, Mosedale DE, Metcalfe JC. TGF-beta in blood: a complex problem. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11(1–2):133–45.
175. Li ZD, Bork JP, Krueger B, Patsenker E, Schulze-Krebs A, Hahn EG, y col. VEGF induces proliferation, migration, and TGF-beta1 expression in mouse glomerular endothelial cells via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 9;334(4):1049–60.
176. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis.

Pharmacol Rev. 2004;56(4):549–80.

177. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26(1):25–35.
178. Blumenstock FA, Valeri CR, Saba TM, Cho E, Melaragno A, Gray A, y col. Progressive loss of fibronectin-mediated opsonic activity in plasma cryoprecipitate with storage. Role of fibronectin fragmentation. *Vox Sang*. 1988;54(3):129–37.
179. Plöderl K, Strasser C, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Gabriel C. Development and validation of a production process of platelet lysate for autologous use. *Platelets*. 2011;22(3):204–9.
180. Nishida T. Translational research in corneal epithelial wound healing. *Eye Contact Lens*. 2010 Sep;36(5):300–4.
181. Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. *Ocul Surf*. 2007 Jul;5(3):228–39.
182. Shen EP, Hu F-R, Lo S-C, Chen Y-M, Sun Y-C, Lin C-T, y col. Comparison of Corneal Epitheliotropic Capacity Among Different Human Blood-derived Preparations. *Cornea*. 2011 Feb;30(2):208–14.

183. Xiao X, He H, Lin Z, Luo P, He H, Zhou T, y col. Therapeutic Effects of Epidermal Growth Factor on Benzalkonium Chloride–Induced Dry Eye in a Mouse Model. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2012 Jan 20;53(1):191–7.
184. Bradley JC, Bradley RH, McCartney DL, Mannis MJ. Serum growth factor analysis in dry eye syndrome. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008 Nov;36(8):717–20.
185. Anitua E, Prado R, Azkargorta M, Rodriguez-Suarez E, Iloro I, Casado-Vela J, y col. High-throughput proteomic characterization of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret)-derived fibrin clot interactome. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Nov;9(11):E1-12.





UNIVERSITAS
*Miguel
Hernández*

Alejandra E. Rodríguez Zunino

y Sandra Gisbert