



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT  
Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

---

# TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

---

ESTUDIO DE LOS SUEROS RICOS EN  
FACTORES DE CRECIMIENTO Y DE SU  
EFECTO SOBRE CÉLULAS DE  
EPITELIO CORNEAL

**Alumno/a:** *del Val Alonso, Marina*

**Fecha:** Junio 2014

**Director/a**  
*Dr./a. M<sup>a</sup> Noelia Andollo Victoriano*

**Curso Académico**  
*2013/14*



## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	III
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 LA CórNEA .....	1
1.1.1 Anatomía de la córnea.....	1
1.1.1.1 Epitelio corneal .....	2
1.1.1.2 Capa de Bowman .....	3
1.1.1.3 Estroma .....	3
1.1.1.4 Membrana de Descemet.....	4
1.1.1.5 Endotelio .....	4
1.2 REEPITELIZACIÓN O CICATRIZACIÓN DE LA CórNEA.....	5
1.3 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA CórNEA .....	6
1.4 TRATAMIENTOS.....	6
1.4.1 Tratamientos alternativos: plasma rico en plaquetas (PRPs).....	7
1.5 EL ÁCIDO HIALURÓNICO EN OFTANMOLOGÍA.....	8
<b>2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>9</b>
2.1 OBJETIVOS GENERALES .....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
2.3 HIPÓTESIS .....	10
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
3.1 PREPARACIÓN DE LOS HEMODERIVADOS .....	11
3.1.1 Suero autólogo (AS).....	11
3.1.2 Suero derivado del plasma rico en factores de crecimiento (s-PRGF) .....	11
3.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO.....	12

3.3 LÍNEA CELULAR DE EPITELIO CORNEAL HUMANO (HUMAN CORNEAL EPITHELIUM, HCE).....	14
3.4 PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA LOS ENSAYOS CELULARES.....	15
3.5 ENSAYOS CELULARES .....	16
3.5.1 Ensayo de proliferación celular <i>in vitro</i> .....	16
3.5.2 Ensayo de migración celular <i>in vitro</i> .....	17
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	18
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS HEMODERIVADOS.....	19
4.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR <i>IN VITRO</i> .....	23
4.3 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR <i>IN VITRO</i> .....	27
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>35</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>36</b>
ANEXO.....	39

**ABREVIATURAS**

AS	Suero autólogo (Autologous Serum)
BSA	Albúmina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
Compl.-	Complemento inactivado
EGF	Factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor)
F.A.	Filtro Amarillo
F.V.	Filtro Verde
FBS	Suero bovino fetal (Fetal Bovine Serum)
HaNa	Ácido hialurónico
HCE	Epitelio corneal humano (Human Corneal Epithelium)
HGF	Factor de crecimiento hepatocítico (Hepatocyte Growth Factor)
MMC	Mitomicina C
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platelet-derived Growth Factor)
S.F.	Sin Filtrar
s-PRGF	Suero derivado del plasma rico en factores de crecimiento (serum derived from Plasma Rich in Growth Factors)
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 LA CÓRNEA

La cornea y esclerótica constituyen la capa externa o túnica fibrosa del ojo. La cornea es la porción transparente de esta túnica, que cubre el iris, la pupila y la cámara anterior.

La córnea de un humano adulto mide de 11 a 12 mm en su diámetro horizontal y de 9 a 11 mm en el vertical. Su espesor es de 0.5 mm en el centro y se incrementa gradualmente hacia la periferia donde alcanza hasta 0.7 mm. La forma de la superficie anterior es convexa siendo su curvatura mayor en la periferia que en el centro siendo una geometría esférica (Nieto, 2011).

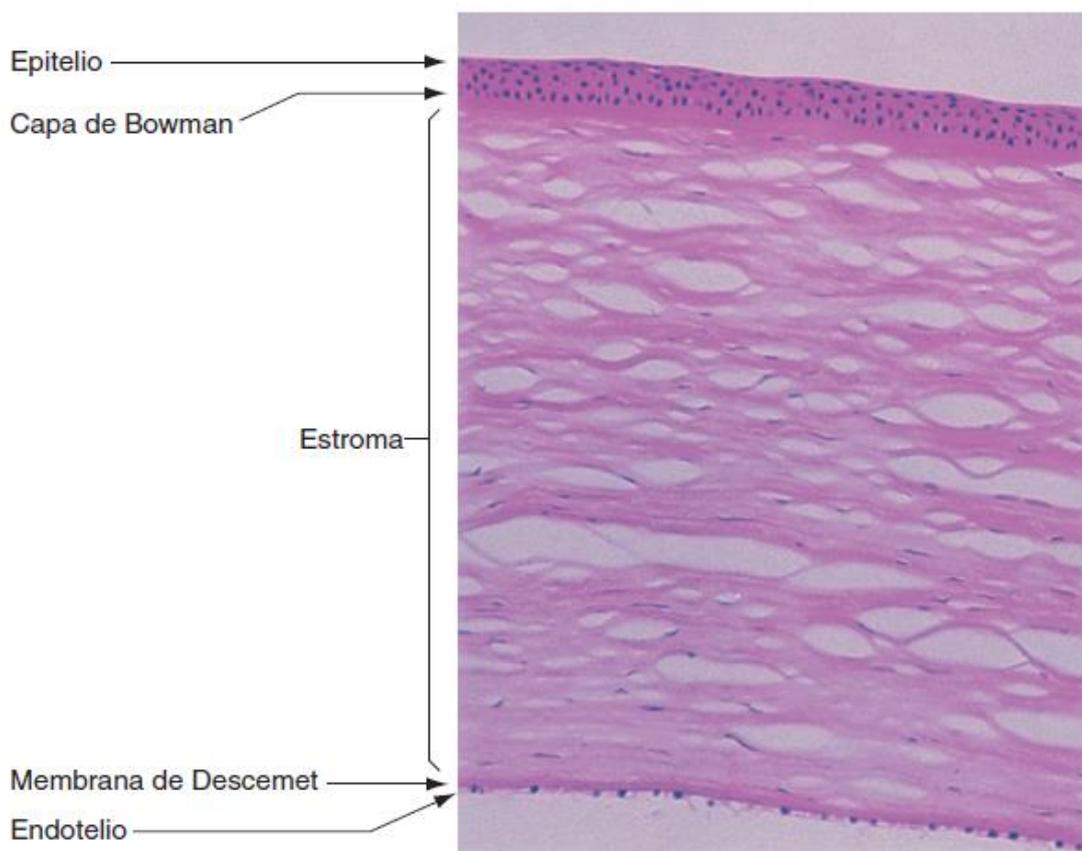
La luz se introduce en el ojo a través de la córnea, que es la estructura ocular con la capacidad de refracción más importante y que hace que la luz quede enfocada en la retina. Constituye un ejemplo excelente de unidad de estructura y función debido a que es un tejido óptico casi perfectamente transparente y avascular, que también actúa como barrera física entre el medio ambiente y el interior del ojo.

La característica más importante de la córnea es su transparencia. La pérdida de dicha transparencia produce efectos visuales secundarios debido al modo en que los fotones de luz interactúan con los electrones de los átomos y de las moléculas corneales.

La córnea tiene una de las densidades más altas de terminaciones nerviosas de todo el cuerpo. Está inervada por la rama oftálmica del nervio trigémino a través de los nervios ciliares anteriores y los de la conjuntiva adyacente. Es uno de los tejidos del organismo con mayor sensibilidad y ésta tiene una función protectora. Así, la mayor parte de los receptores existentes en la córnea son nociceptores cuya estimulación da lugar a la percepción del dolor (Rada y Johnson, 2005).

### 1.1.1 Anatomía de la córnea

Microscópicamente la córnea puede dividirse en las siguientes cinco capas (**Figura 1**): epitelio corneal, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio corneal.



**Figura 1. Corte histológico de la córnea teñido con hematoxilina-eosina.** En la figura se muestran las cinco capas nombradas en sentido de exterior a interior: una capa externa formada por el epitelio, la capa de Bowman, una capa media o estroma corneal, una membrana basal denominada membrana de Descemet y una capa interna o endotelio corneal.

#### 1.1.1.1 Epitelio corneal

Es un epitelio plano, estratificado, no queratinizado y no secretor que presenta un grosor de 5-7 células, representando un 10% del espesor de la córnea. Está formada por tres tipos celulares: células superficiales, células aladas y células basales. La capa de células basales cuboideas, es la única fuente de las células nuevas que se incorporan al epitelio corneal. Las células aladas denominadas de esta manera por sus prolongaciones laterales, forman entre una y tres capas celulares en una fase intermedia de diferenciación. Las células superficiales muestran diferenciación terminal y están en proceso de degeneración (Edelhauser y Ubels, 2004).

Un epitelio sano es necesario para mantener una correcta superficie ocular y por tanto, una buena transparencia. La transparencia corneal también es secundaria a una característica arquitectura estromal y un correcto funcionamiento del endotelio, encargado de la regulación de la hidratación corneal. El epitelio también está encargado de mantener una correcta película lagrimal, la cual aporta calidad óptica. Además, proporciona una barrera mecánica de defensa efectiva contra patógenos, debido a la interdigitación de membranas celulares y a los complejos de unión entre células (uniones estrechas, desmosomas, uniones comunicantes o de “tipo gap”) y en la unión entre células y membrana basal (hemidesmosomas).

A su vez, la película lagrimal contiene factores de crecimiento que favorecen la correcta epitelización de la córnea, tanto de modo basal como en situaciones de defecto epitelial. La película lagrimal contiene, entre otros, factores neurotróficos tales como NGF (Neural Growth Factor), sustancia P y IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) (Matsumoto *et al.*, 2004).

#### 1.1.1.2 Capa de Bowman

La capa de Bowman, que en los mamíferos sólo existe en los primates, se localiza por debajo del epitelio y tiene un grosor aproximado de 12  $\mu\text{m}$ . Con el microscopio óptico se observa que está formada por fibrillas de colágeno dispuestas de manera aleatoria. Esta capa es acelular y se puede considerar una modificación de la capa superficial del estroma. La función de esta parte de la córnea se desconoce, se ha sugerido que es un elemento estabilizador pero no hay resultados contundentes (Edelhauser y Ubels, 2004).

#### 1.1.1.3 Estroma

El estroma es una matriz extracelular constituida por fibrillas de colágeno con disposición laminar exquisitamente ordenada y dispuestas en paralelo a la superficie corneal pero con un ángulo de 90° una capa respecto a la inmediatamente inferior. Las fibrillas individuales de colágeno están separadas por una matriz de proteoglicanos. Se disponen queratocitos con densidades y tamaños variables a lo largo del estroma, formando una red tridimensional en espiral a través de la córnea. Su aspecto es el de

fibroblastos aplanados entre las lamelas de colágeno. Estos fibroblastos corneales digieren y fabrican continuamente las moléculas del estroma.

La distribución y el tamaño de las fibrillas de colágeno embebidas en la matriz extracelular son parcialmente responsables de la transparencia corneal. Este patrón actúa como una rejilla de difracción para reducir la dispersión de la luz mediante la interferencia destructiva. Para mantener la transparencia es necesario que la distancia existente entre las fibrillas de colágeno sea inferior a la longitud de onda de la luz visible. La transparencia también depende de mantener el contenido de agua del estroma corneal. Esta hidratación está controlada principalmente por las barreras epiteliales y endoteliales (Edelhauser y Ubels, 2004).

#### 1.1.1.4 Membrana de Descemet

El endotelio corneal descansa sobre una membrana de Descemet, que en el ojo del adulto tiene un grosor de 10-15  $\mu\text{m}$ . Las células endoteliales elaboran esta membrana basal, que aumenta de grosor durante la vida. Los componentes fundamentales son colágeno, laminina y fibronectina (Edelhauser y Ubels, 2004).

#### 1.1.1.5 Endotelio

El endotelio es una monocapa celular de morfología hexagonal, regular, situada en la superficie corneal posterior y que se encuentra en contacto directo con el humor acuoso de la cámara anterior.

La función más importante del endotelio es regular el contenido de agua en el estroma. Por ello, las células endoteliales están interconectadas mediante uniones estrechas y uniones comunicantes. Las uniones estrechas hacen que el endotelio constituya una barrera de filtro entre el humor acuoso y el estroma que, aunque impide el flujo libre de agua y solutos, no constituye una barrera tan eficaz como la que representan los epitelios. Las uniones comunicantes se observan en las membranas laterales y su función principal es la comunicación intercelular (Edelhauser y Ubels, 2004).

## 1.2 REEPITELIZACIÓN O CICATRIZACIÓN DE LA CÓRNEA

La integridad de la superficie ocular y su capacidad de cicatrización depende de un balance entre proliferación, diferenciación, motilidad y apoptosis. Existen una serie de factores de crecimiento presentes en la lágrima (Rolando y Zierhut, 2001) y en el humor acuoso (Welge-Lüssen, 2001) y producidos por las células de epitelio corneal que son esenciales en el mantenimiento y renovación del epitelio corneal, así como para prevenir reacciones inmunes o angiogénicas indeseables. Dichos factores de crecimiento, mediante un complejo mecanismo de interrelación, facilitan la cicatrización corneal mediante la proliferación del epitelio corneal y estromal así como la formación de la matriz extracelular.

Es probablemente debido a la necesidad de tanta precisión estructural que el estroma de la córnea experimenta remodelación homeostática a un ritmo considerablemente más lento que la dermis de la piel y la mayoría de otros tejidos de colágeno. El colágeno del estroma de la córnea se somete inusualmente a bajas tasas de reemplazo y las células del estroma o queratocitos, dispersos por el estroma, tienen una tasa replicativa muy baja. Aun así se cree que son el principal tipo de células que contribuye a reparar el tejido durante la cicatrización de heridas de la córnea (Fini y Stramer, 2005).

Cuando la córnea se daña y se produce un defecto epitelial, se activan los queratocitos. Además, las células epiteliales adyacentes a la herida migran hacia el defecto epitelial activándose las células madre limbares, con intención de rellenar el defecto lo antes posible.

Por tanto, para mantener un epitelio corneal sano, debe existir un correcto equilibrio entre la función de las células madre limbares, la cantidad y calidad de la lágrima, la anatomía y funcionamiento de los párpados y la sensibilidad corneal (Tseng y Tsubota 1997). Cualquier alteración en alguno de estos elementos puede conllevar a un defecto epitelial persistente.

Las células epiteliales corneales se renuevan continuamente a través de células basales en área de limbo esclero-corneal (únicas con capacidad de proliferación en el epitelio corneal), van diferenciándose a medida que suben a estratos más superficiales y proliferan centripetamente hasta, finalmente, descamarse.

Otro aspecto importante de la córnea que afecta a su reparación, es su naturaleza avascular. Tanto en la piel como en la córnea una matriz de fibrina y fibronectina se deposita y polimeriza en el sitio dañado. En la piel las plaquetas procedentes del sistema vascular se quedan atrapadas en esta matriz formando un coágulo. En cambio, el coágulo que se forma en la reparación de la córnea no contiene plaquetas (Fini y Stramer, 2005).

### **1.3 PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA CÓRNEA**

Entre las lesiones superficiales más habituales se encuentran las erosiones epiteliales, el edema epitelial y la neovascularización superficial. Estas patologías remiten fácilmente con los tratamientos habituales, como las lágrimas artificiales, lentes de contacto terapéuticas y antibióticos, entre otros.

En cambio, el tratamiento de la patología corneal de origen neurotrófico sigue siendo uno de los caballos de batalla más retantes en oftalmología. El espectro clínico de dicha alteración puede ir desde la queratitis punteada superficial, pasando por la úlcera neurotrófica hasta el defecto epitelial persistente e, incluso, la perforación corneal.

El defecto epitelial persistente (DEP), es una perforación de la córnea que se mantiene durante más de dos semanas y es resistente a los tratamientos convencionales. Aunque tenga varias causas, estos defectos tienen en común la incapacidad de la córnea para cerrar el epitelio dañado. Las formas de DEP con peor pronóstico son las asociadas con el ojo seco y las úlceras neurotróficas. En el caso del ojo seco la ausencia de lágrima conlleva la carencia de factores de crecimiento y en el caso de la úlcera neurotrófica, los factores necesarios para el metabolismo neuronal están ausentes (López-Plandolit *et al.*, 2010).

### **1.4 TRATAMIENTOS**

Son muchos los tratamientos médicos y quirúrgicos que se han descrito para la resolución del defecto epitelial persistente (DEP):

1. Tratamientos habituales como lubricantes oculares y antibióticos tópicos
2. Métodos quirúrgicos para mejorar el tropismo de la superficie ocular

3. Tratamientos médicos basados en la aplicación de moléculas específicas como colirio de NGF (Neural Growth Factor) (Lambiase *et al.*, 1998), colirio de EGF (Epithermal Growth Factor) (Pastor y Calonge, 1992) y colirio de FGF (Fibroblast Growth Factor) (Tripathi *et al.*, 1990) entre otros.

#### **1.4.1 Tratamientos alternativos: plasma rico en plaquetas (PRPs)**

Viendo la ineficacia de los tratamientos habituales en los últimos años se están investigando nuevas terapias. Desde finales de los años 90, se ha puesto de moda la utilización de plaquetas como vehículos liberadores de concentraciones suprafisiológicas de factores cicatrizantes para favorecer y acelerar, el cierre de heridas de diferentes tejidos (Anitua, 1999) como músculo, tendón, piel, etc. Estos preparados se llaman genéricamente PRPs (Platelet-Rich Plasma serums, plasma rico en plaquetas) y ya han sido utilizados para acelerar el cierre de heridas en piel (Molina-Miñano *et al.*, 2009) y quemaduras. También se han utilizado en diferentes tipos de cirugía como cosmética, plástica, dental (Marx *et al.*, 1998), ortopédica (Anitua *et al.*, 2007) y cardiorácica.

En oftalmología también se han descrito ya los tratamientos con gotas de hemoderivados para el cierre de defectos epiteliales persistentes. La descripción del AS, (Autologous Serum, suero autólogo) un tipo de PRPs, fue la primera revolución (Tsubota *et al.*, 1999a, b) porque presenta unas características muy similares a las de la lágrima en cuanto a pH y osmolaridad. Además contiene factores de crecimiento, vitaminas y componentes bacteriostáticos tales como IgG y lisozima. Desde entonces, el AS se ha utilizado con frecuencia para el tratamiento tópico en pacientes con trastornos oculares, ya que se asocia con una mejora de la cicatrización (Freire *et al.*, 2012).

Más recientemente, se ha desarrollado un nuevo derivado de la sangre. Se caracteriza por el procesamiento fácil y rápido y la capacidad de estimular la liberación de plaquetas en ausencia de trombina y leucocitos (Freire *et al.*, 2012). El s-PRGF (serum derived from Plasma Rich in Growth Factors, suero derivado del plasma rico en factores de crecimiento) es un tipo de PRPs que fue originalmente descrito para acelerar defectos maxilares y traumatológicos (Anitua, 1999) y que ya ha demostrado

su eficacia para el cierre de defectos en piel (Anitua *et al.*, 2007; Molina-Miñano *et al.*, 2009).

Nuestro grupo de investigación ha aplicado el s-PRGF en colirio de forma novedosa como tratamiento novel en defectos epiteliales persistentes (López-Plandolit *et al.*, 2010) y el síndrome del ojo seco (López-Plandolit *et al.*, 2011). Más recientemente, hemos adaptado la metodología de obtener s-PRGF para utilizarlo por primera vez en el modelo animal de conejo como un paso previo a su estudio mediante ensayos clínicos (Freire *et al.*, 2014).

## **1.5 EL ÁCIDO HIALURÓNICO EN OFTANMOLOGÍA**

El ácido hialurónico (HaNa) comprende N-acetil-D-glucosamina y moléculas de ácido glucurónico alternativamente distribuidos en cadenas largas, que en condiciones fisiológicas (pH = 7,4) está presente en forma de una sal tal como hialuronato de sodio. Es una molécula larga pero flexible que se comporta como un fluido newtoniano, es decir, su viscosidad depende del grado de movimiento. La disposición aleatoria de sus moléculas y la interacción entre ellas confieren alta resistencia y viscosidad a bajas tasas de cizallamiento, proporcionando propiedades protectoras. Sin embargo, a altas velocidades de cizalladura que se produce durante el parpadeo, las moléculas se distribuyen en alineación en la dirección del movimiento, que exhibe menos viscosidad y fácilmente se extiende sobre la superficie ocular. Esta pseudoplasticidad hace que las soluciones de ácido hialurónico sean más cómodas para el ojo.

Estudios preliminares han demostrado que el hialuronato de sodio, utilizado en oftalmología en forma de lágrimas artificiales para el tratamiento del ojo seco, aumenta la adhesión al epitelio de la córnea y la biodisponibilidad de agentes terapéuticos en la superficie ocular (López-García *et al.*, 2014).

## **2. OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

El presente Trabajo Fin de Grado se puede encuadrar dentro de la línea de investigación “Regeneración de la superficie ocular mediante terapias avanzadas: células madre y sueros autólogos ricos en factores de crecimiento” que está siendo desarrollado por el departamento de Biología Celular e Histología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Noelia Andollo Victoriano.

### **2.1 OBJETIVOS GENERALES**

1. Estudiar la variación en las concentraciones de determinados factores de crecimiento presentes en los sueros como consecuencia de modificaciones en el protocolo de obtención de los mismos.

Actuaciones aparentemente inofensivas como son la filtración de los sueros o el calentamiento del suero para inactivar el complemento, entre otros, pueden afectar drásticamente a la concentración de moléculas bioactivas como son los factores de crecimiento.

2. Efecto sobre la proliferación y migración de células de epitelio corneal humano con la utilización de un biopolímero adhesivo co-administrado con el suero rico en factores de crecimiento.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado *in vivo* en el modelo animal de conejo la eficacia de los sueros ricos en factores de crecimiento en la cicatrización de la superficie ocular. Estos hemoderivados requieren una aplicación de un mínimo de cuatro veces al día y la disponibilidad de una nevera porque se tienen que mantener a 4°C. Se quiere estudiar la aplicación conjunta del suero enriquecido con un biopolímero adhesivo que aumente el tiempo de permanencia del suero sobre la superficie ocular, disminuyendo así el número de aplicaciones diarias.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Estudiar cómo afecta a la concentración de determinados factores de crecimiento presentes en los sueros:

- la filtración (utilizado como método de esterilización)

- el tratamiento por calor (utilizado para la inactivación del complemento)

2. Estudiar el efecto de un biopolímero adhesivo (ácido hialurónico), aplicado solo o conjuntamente con el suero rico en factores de crecimiento (s-PRGF), sobre la capacidad de las células de epitelio corneal para:

- proliferar

- migrar

### **2.3 HIPÓTESIS**

Los PRPs contienen factores de crecimiento y biomoléculas activas que favorecen la reepitelización y proliferación celular en caso de erosión corneal. Las distintas concentraciones de estas moléculas en los distintos tipos de PRPs como consecuencia del protocolo de obtención podrían influir en su efecto terapéutico. Por otra parte, la administración de estos hemoderivados junto al bioadhesivo podría aumentar el tiempo de persistencia en la superficie ocular, permitiendo un menor número de aplicaciones diarias del tratamiento.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 PREPARACIÓN DE LOS HEMODERIVADOS**

La sangre de voluntarios sanos se extrajo por venopunción después de obtener el consentimiento informado de los pacientes y el informe favorable del comité ético de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU), de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

Para recolectar la sangre se utilizaron tubos con citrato de sodio como anticoagulante en el caso del s-PRGF y sin anticoagulante en el caso de AS. Durante la extracción se trabajó en condiciones de asepsia. La sangre se procesó por diferentes métodos para conseguir el derivado correspondiente.

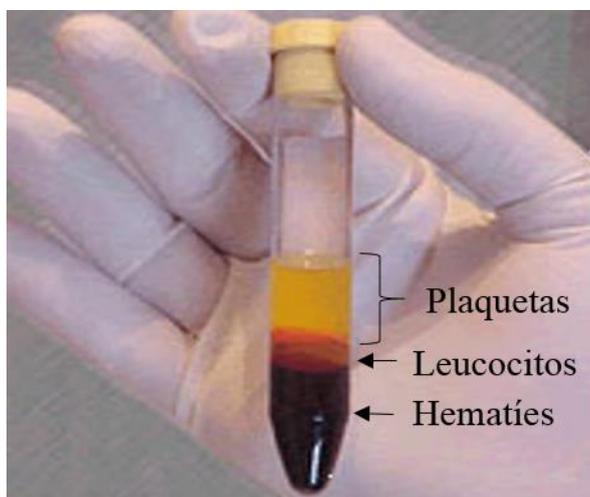
##### **3.1.1 Suero autólogo (AS)**

Una vez extraída la sangre, los tubos se dejan a temperatura ambiente para que la sangre coagule espontáneamente. Una vez coagulada la sangre, se centrifuga a 1000 g durante 15 minutos para separar el suero de los demás componentes. Se recoge el sobrenadante, que corresponde al suero autólogo (Freire *et al.*, 2012).

##### **3.1.2 Suero derivado del plasma rico en factores de crecimiento (s-PRGF)**

La sangre se recogió en tubos con el interior estéril utilizando el citrato sódico como anticoagulante, con el fin de no dañar ni alterar las propiedades de las plaquetas. Los tubos se centrifugaron a 460 g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se obtiene la separación de los diferentes contenidos de la sangre (**Figura 1**), con lo que se consigue concentrar las plaquetas en la zona superior a la serie roja. La serie blanca leucocitaria se sedimenta en una fase intermedia entre la fase de las plaquetas y los hematíes. Se recoge la fase superior a la fase blanca que contiene las plaquetas con pipetas estériles. Se añade cloruro de calcio a una concentración final de 22,8 mM para inducir la activación de las plaquetas y la formación de la matriz de fibrina. Se deja reposar 2 horas a 37°C, para que se forme el coágulo. Tras retirar el coágulo el sobrenadante obtenido, que constituye el s-PRGF, está enriquecido en factores de crecimiento y otros componentes del secretoma plaquetario (Freire *et al.*, 2012).

En todos los casos los hemoderivados se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 1: Separación de los diferentes contenidos de la sangre.** Se recoge la fase inmediatamente superior a la leucocitaria, que constituye el s-PRGF.

### 3.2 CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Se midió mediante kits ELISA comerciales la concentración de las siguientes biomoléculas: EGF (Epidermal Growth Factor, factor de crecimiento epidérmico), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, factor de crecimiento del endotelio vascular), HGF (Hepatocyte Growth Factor, factor de crecimiento hepatocítico), PDGF (Platelet-derived Growth Factor, factor de crecimiento derivado de plaquetas) y la Fibronectina. La técnica de ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) se basa en la unión antígeno-anticuerpo. En este caso se utilizaron kits ELISA tipo sándwich. Los antígenos de una muestra se unen a una superficie que contiene un anticuerpo monoclonal específico que se pueda unir a ellos. A continuación, se le añade un anticuerpo secundario unido a biotina que va a reconocer el antígeno inmovilizado. En el último paso se añade el enzima estreptavidina-HRP y luego un sustrato que al unirse con el enzima produce una señal detectable, lo más común es un cambio de color (**Figura 2**). Una vez añadido el enzima y el sustrato, se mide la absorbancia a 450 nm con un lector de placas (ELx800 Microplate Reader; BioTek

Instruments, Winooski, VT). La cuantificación de EGF, VEGF y HGF se hizo con kits de Invitrogen™. La cuantificación de PDGF se hizo con un kit de RayBiotech, Inc. y la Fibronectina se cuantificó con un kit de Biorbyt. En todos los casos se siguieron las instrucciones proporcionadas por la casa comercial.

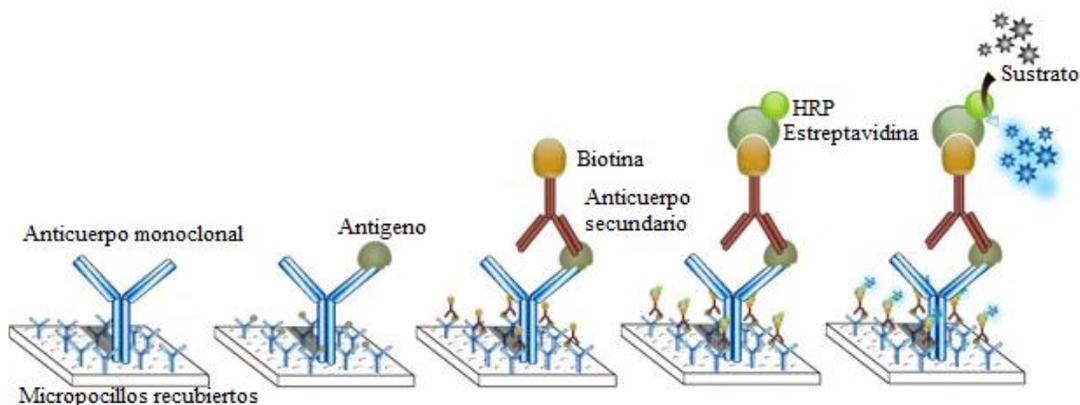


Figura 2: Esquema de la técnica ELISA tipo sándwich.

Los factores de crecimiento se cuantificaron tras someter a los hemoderivados a tres procedimientos diferentes:

- Filtración:** una parte de los sueros se mantuvo sin filtrar (S.F.). Otra parte se filtró con un filtro Millipore Express™ que presenta una membrana de poliéster de sulfona (PES) un polímero hidrofílico. La fracción filtrada con Millipore Express™ se va a denominar filtro verde (F.V.). Otra tercera parte se filtró con un filtro millipore Durapore® que presenta una membrana de un polímero hidrofílico llamado polifluoruro de vinilideno (PVDF). La fracción filtrada con este filtro de va a denominar filtro amarillo (F.A.). Ambos filtros son unidades de filtración Millex (Millipore) y presentan un poro con un tamaño de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- Inactivación del complemento (Compl.-)** por calentamiento a 56°C durante 30 minutos.
- Obtención de un pool de varios individuos:** mezcla del suero con el complemento inactivado (calentado a 56°C durante 30 minutos) de varios individuos. Este procedimiento es habitual cuando se necesita obtener gran

cantidad de suero para posteriores experimentos. Además reduce la variabilidad experimental característica de los sueros por individual.

Cada factor se analizó por duplicado en el suero de tres individuos diferentes.

### **3.3 LÍNEA CELULAR DE EPITELIO CORNEAL HUMANO (HUMAN CORNEAL EPITHELIUM, HCE)**

La línea celular HCE, inmortalizada mediante el adenovirus SV40 fue amablemente cedida por Araki-Sasaki *et al.*, (1995). Las células se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en frascos T25 (25 mm<sup>2</sup>) especialmente tratados para cultivo celular sembrándolas para obtener una concentración final de 10<sup>6</sup> células/ml (**Figura 3**). Se incubaron con medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM):Ham's F12 (1:1; Lonza, Verviers, Belgium) con 2mM de L-glutamina (Lonza), 1% de penicilina-estreptomicina (Lonza). El medio fue suplementado con 10 ng/mL de EGF (Sigma, St. Louis; MO), 5 µg/mL de insulina (Sigma), 0,1 µg/mL de toxina colérica (Gentaur molecular Products, Brussels, Belgium), 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) y FBS al 10% (Fetal Bovine Serum, suero bovino fetal; Lonza).

Los subcultivos se hicieron cada dos o tres días, manteniendo las células hasta que alcanzan aproximadamente el 90% de confluencia, momento que se lavan con PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, tampón fosfato salino; Sigma) y se incuban con tripsina al 0,5% y con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,2% (Sigma) durante 5 minutos a 37°C. Seguidamente la acción de la tripsina-EDTA se neutraliza con medio de cultivo DMEM:Ham's F12 suplementado con FBS. La suspensión celular se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm, desechando el sobrenadante y volviendo a resuspender las células en medio de cultivo. Se siembra a dilución 1:10 en cada flask T25.

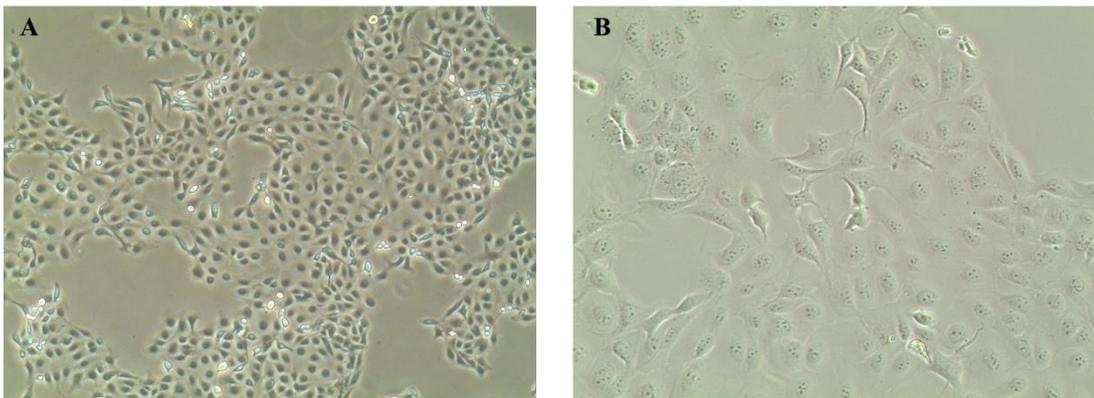


Figura 3. Fotografía de las células de epitelio corneal humano (HCE) tomada con el microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse TS 100; Nikon, Tokyo, Japan) utilizando el software ProgRes CapturePro 2.6 (Jenoptik, Jena, Germany). A está tomada a 40X y la B está tomada a 100X.

### 3.4 PREPARACIÓN DE TRATAMIENTOS PARA LOS ENSAYOS CELULARES

Tanto en el ensayo de proliferación como en el de migración celular se testaron cinco tratamientos. Los tratamientos están compuestos de los siguientes componentes:

1. Medio de cultivo estándar (FBS al 10%): es el que se utiliza habitualmente para el mantenimiento de las células. Sus componentes se han explicado en el apartado anterior.
2. Medio con BSA (Bovine Serum Albumin, Albumina sérica bovina) al 1%: contiene los componentes del cultivo estándar menos el FBS al 10%. Este medio se filtró con un filtro millipore Durapore® (FA) con tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ .
3. Medio con s-PRGF al 45% se utilizó un *pool* de seis individuos de s-PRGF con el complemento inactivado (56°C a 30 minutos) y se disolvió en medio de cultivo estándar sin FBS al 10%.
4. Medio con ácido hialurónico al 0,1% (HaNa): El ácido hialurónico se encuentra formulado como hialuronato sódico de grado oftálmico (Abarán Materias Primas S.L. Barcelona, España). El stock se encuentra en una concentración del polímero bioadhesivo en PBS al 2,2%. Se disuelve el HaNa con medio cultivo estándar sin FBS al 10%.

5. Medio con s-PRGF al 45% en ácido hialurónico al 0,1%: pool de seis individuos de s-PRGF a una concentración final del 45% con el complemento inactivado disuelto en HaNa al 0,1%.

Todos los tratamientos se prepararon en condiciones estériles, el material de plástico empleado es estéril y el material de vidrio se ha esterilizado por calor seco. En el caso del bioadhesivo se utilizaron micropipetas especiales para materiales viscosos.

### **3.5 ENSAYOS CELULARES**

#### **3.5.1 Ensayo de proliferación celular *in vitro***

Se midió la viabilidad y proliferación de las células HCE bajo los cinco tratamientos descritos anteriormente. Para ello usamos el ensayo MTT, que está basado en la utilización de una sal de tetrazolio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolio bromuro; Sigma-Aldrich) de color amarillo, cargada positivamente y que penetra en las células eucariotas vivas. Las células viables reducen el MTT por la acción de las succinato deshidrogenasas que se encuentran en las mitocondrias. Se forma el formazan un compuesto de color púrpura, que es medida por absorbancia, siendo la cantidad de color directamente proporcional a la cantidad de células viables. La señal generada es dependiente de la concentración de MTT, del tiempo de incubación, del número de células viables y de su actividad metabólica.

Las células HCE se sembraron a una concentración de 3000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se dejó incubando 24 horas. Se sembraron cuatro placas para los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas; cada una con 20 pocillos. Una vez las células se adhirieron al sustrato se sustituyó el medio de cultivo estándar por BSA al 1% y se dejó incubando 12 horas. Después de la incubación se midió la absorbancia de la placa denominada tiempo 0 h a 540 nm con el lector de placas. Las placas restantes se lavaron con PBS y a continuación se añadieron los cinco tratamientos correspondientes: medio de cultivo estándar, BSA, s-PRGF, s- PRGF con HaNa y HaNa. De cada tratamiento se hicieron cuatro réplicas. Después de 24, 48 y 72 horas las células se lavaron con PBS y se incubaron con 0,5 mg/mL de MTT durante tres horas. Es muy importante incubar el mismo tiempo las tres placas con el MTT porque la conversión del MTT al formazan es dependiente del tiempo. Posteriormente se

elimina el reactivo MTT y se añade DMSO para que se disuelva el precipitado, adquiriendo un color azul. Se mide la absorbancia a 540 nm con el lector de placas (Freire *et al.*, 2012). En el lector se utilizó la opción “Area Scan” para obtener varias lecturas de absorbancia correspondientes a diferentes puntos del pocillo.

La proliferación se expresó como tasa de proliferación  $\pm$  la desviación estándar (SD) de células viables respecto a las células viables antes de la exposición a los tratamientos (t=0 horas). El experimento se repitió con tres lotes distintos de células HCE.

### **3.5.2 Ensayo de migración celular *in vitro***

Utilizamos el método de la herida (*Scratch wound-healing assay*). Se sembraron 25000 células por pocillo en placas de 96 pocillos con medio de cultivo estándar y se dejaron incubando a 37°C hasta que se formó una monocapa. A continuación se cambió el medio por BSA al 1% y se dejó incubando 8 horas. Después con la punta de un palillo se produjo un raspado o desepitelización (herida) con forma de círculo en el centro de la monocapa de cada pocillo. Se tomaron fotos con el microscopio de contraste de fases de cada pocillo y utilizando el software ProRes CapturePro 2.6. se hizo una primera medida de las áreas de los agujeros utilizando el software ImageJ (Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD) con el objeto de repartir equitativamente agujeros de área similar entre los diferentes tratamientos (Freire *et al.*, 2014).

Luego, se hizo un lavado con PBS y se añadió Mitomicina C (MMC) a una concentración de 0,01 mg/mL a cada pocillo, dejándolo incubar dos horas. Después de la incubación con MMC se hizo un lavado con PBS y se añadieron los tratamientos. Para cada tratamiento se hicieron cinco réplicas. Las áreas desepitelizadas se fotografiaron cada 12 horas con el microscopio de contraste de fases y el software ProgRes CapturePro 2.6. Se tomaron fotos hasta que se cerraron las áreas denudadas de los pocillos que tenían los tratamientos de s-PRGF al 45% y s-PRGF al 45% con ácido hialurónico.

La velocidad de cierre se describe en términos de la media del área denudada  $\pm$ SD en milímetros cuadrados. Cada tratamiento se aplicó en cinco pocillos y el experimento se repitió con tres lotes diferentes de células HCE.

### **3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Las medias y las desviaciones estándar (SD) de todas las variables se calcularon utilizando el software Excel de Windows. Para determinar el grado de significación estadística, se hizo la prueba t de Student de dos colas, utilizando Excel.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CUANTIFICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS HEMODERIVADOS

A partir de la sangre de cada voluntario (n=3) se obtuvieron los dos tipos de hemoderivados (AS y s-PRGF). Se midió por duplicado (réplicas técnicas) la concentración de algunos factores de crecimiento en cada suero mediante un ensayo colorimétrico. Los datos presentados en este apartado corresponden a la media de las tres réplicas biológicas (hemoderivados de los tres individuos). Como material complementario en el Anexo se muestran los datos correspondientes a las réplicas técnicas.

En las muestras sin filtrar (S.F.), se ha observado que la concentración de VEGF es similar en los dos hemoderivados y que la concentración de HGF es superior en el AS (**Tabla 1**).

**Tabla 1. Concentración de los factores de crecimiento en los hemoderivados AS y s-PRGF bajo diferentes condiciones de filtración:** S.F.: sin filtrar, F.V.: filtro verde, F.A.: filtro amarillo. Los resultados están expresados como media de las concentraciones de las tres réplicas biológicas  $\pm$  su desviación estándar (SD). No se han encontrado diferencias significativas en ningún caso.

Suero	Condición	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	EGF (pg/mL)	PDGF (ng/mL)	Fibronectina ( $\mu$ g/mL)
AS	S.F.	188,33 $\pm$ 42,51	303,71 $\pm$ 49,75	-	275,18 $\pm$ 260,51	534,58 $\pm$ 335,57
	F.V.	183,69 $\pm$ 42,33	246,30 $\pm$ 69,21	-	99,34 $\pm$ 144,06	276,08 $\pm$ 244,46
	F.A.	158,63 $\pm$ 38,13	205,58 $\pm$ 54,18	-	18,18 $\pm$ 21,60	42,88 $\pm$ 13,86
PRGF	S.F.	187,65 $\pm$ 35,42	86,89 $\pm$ 32,84	579,04 $\pm$ 167,00	-	-
	F.V.	195,22 $\pm$ 56,84	71,21 $\pm$ 8,02	478,05 $\pm$ 74,87	-	-
	F.A.	173,67 $\pm$ 55,95	60,17 $\pm$ 4,88	420,00 $\pm$ 83,39	-	-

Uno de los objetivos es estudiar cómo afecta la filtración del hemoderivado en la concentración de los factores de crecimiento. Para ello, se han comparado las muestras

biológicas sin filtrar con las muestras biológicas filtradas con F.V. y F.A. Se ha observado que tanto en el AS como en el s-PRGF la filtración con el F.V. no supone una reducción de la concentración de VEGF, pero con el F.A. sí que hay una reducción entre el 10-15 % (**Tabla 2**). En cuanto al HGF, en los dos hemoderivados se ha observado una reducción tras la filtración; con el F.V. una reducción del 20% y con el F.A. una reducción entre el 15-30%.

**Tabla 2. Porcentaje de reducción en la concentración de factores de crecimiento tras la filtración en los hemoderivados AS y s-PRGF.** Se compara la concentración del filtro verde (F.V.) y filtro amarillo (F.A.) respecto a la muestra sin filtrar (S.F.).

Suero	Condición	VEGF %	HGF %	EGF %
AS	F.V. / S.F.	2	19	-
	F.A. / S.F.	16	32	-
PRGF	F.V. / S.F.	-4	18	17
	F.A. / S.F.	11	16	27

Viendo que el porcentaje de reducción era similar en ambos tipos de hemoderivados para los factores VEGF y HGF decidimos realizar la cuantificación con el resto de factores (EGF, PDGF y Fibronectina) solo en uno de los hemoderivados. Así la filtración del EGF con el F.V. disminuye la concentración en un 17%, siendo superior con el F.A., concretamente un 27% (**Tabla 2**). En cuanto a las concentraciones de PDGF y Fibronectina, se han incluido los datos pero no se van a comentar porque no son concluyentes. Al realizar el enzimoimmunoensayo de cada molécula la recta patrón es adecuada, indicando que la técnica se realizó correctamente. Sin embargo, en ambos casos hay que utilizar las muestras muy diluidas y pensamos que hemos cometido algún error al hacer las diluciones, dando lugar a cuantificaciones que no se corresponden con lo descrito en la bibliografía. Por lo tanto, a de repetirse nuevamente la cuantificación de ambas moléculas.

Otro de los objetivos es estudiar cómo afecta el calentamiento de las muestras (56°C durante 30 minutos) en la concentración de los factores de crecimiento. Este procedimiento se utilizó para inactivar el complemento presente en los sueros, ya que, podría ser responsable de la lisis de las células en cultivo.

En primer lugar, quisimos comparar la concentración de las muestras filtradas con F.V. y calentadas (Compl.-) con las muestras filtradas con F.V. (Control) (**Tabla 3**).

Se observa que en el caso del VEGF, la reducción obtenida en la concentración del factor de crecimiento es negativa. Esto indica que el calentamiento no afecta a la concentración de VEGF en ninguno de los dos hemoderivados (**Tabla 4**). En cambio, el calentamiento sí que afecta a la concentración de HGF y EGF. En el HGF supone una reducción del 94-100%, de manera que se ha considerado que el tratamiento por calor destruye completamente este factor. Existen diferencias estadísticamente significativas respecto al control para ambos hemoderivados. Por último, en el EGF se observa una reducción de la concentración del 50-60% (**Tabla 4**) siendo solo estadísticamente significativa respecto al control en el caso del s-PRGF (**Tabla 3**).

**Tabla 3. Concentración de los factores de crecimiento tras el calentamiento en los hemoderivados AS y s-PRGF.** Control: muestras biológicas filtradas con el filtro verde (F.V.). Compl.-: muestras biológicas filtradas con el filtro verde (F.V.) y calentadas a 56°C durante 30 minutos. Los resultados están expresados como media de las concentraciones de las tres réplicas biológicas  $\pm$  su desviación estándar (SD).

Suero	Condición	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	EGF (pg/mL)
AS	Control	183,69 $\pm$ 42,33	246,30 $\pm$ 69,21	397,37 $\pm$ 115,42 <sup>a</sup>
	Compl.-	212,24 $\pm$ 51,97	0,00 $\pm$ 0,00 *	185,29 $\pm$ 56,32
PRGF	Control	195,22 $\pm$ 56,84	71,21 $\pm$ 8,02	390,72 $\pm$ 87,92 <sup>a</sup>
	Compl.-	219,71 $\pm$ 24,79	4,18 $\pm$ 1,48 **	154,11 $\pm$ 31,02 *

Diferencias estadísticamente significativas respecto al control. \*P  $\leq$  0,05. \*\*P  $\leq$  0,01.

<sup>a</sup> Los datos provienen de otro ensayo ELISA diferente al realizado para la filtración

**Tabla 4. Porcentaje de reducción en la concentración de factores de crecimiento tras el calentamiento en los hemoderivados AS y s-PRGF.** Se compara la concentración de las muestras con el complemento inactivado (Compl.-) respecto a las muestras control (sin calentar).

Suero	Condición	VEGF %	HGF %	EGF %
AS	Compl.- / Control.	-16	100	53
PRGF	Compl.- / Control.	-13	94	61

En el segundo lugar, quisimos estudiar si mezclar las muestras de diferentes individuos que tienen el complemento inactivado, afecta en la concentración de los diferentes factores. Para ello, se va a comparar la media de la concentración de tres individuos con un *pool* de esos tres individuos (ver materiales y métodos) para cada factor y en ambos sueros. El VEGF, HGF y EGF muestran concentraciones similares tanto en el *pool* como en la media de las réplicas biológicas para los dos hemoderivados (**Tabla 5**). No se han encontrado diferencias significativas entre ambas muestras. Por lo tanto, juntar suero de varios individuos tras inactivar el complemento no afecta a la concentración de los factores de crecimiento. Nuevamente desestimamos los datos de PDGF y Fibronectina.

**Tabla 5. Comparación de las concentraciones de los factores de crecimiento en una mezcla de hemoderivados (*pool*) respecto a los sueros por separado.** Una muestra es la media de la concentración de cada una de las tres muestras biológicas con complemento inactivado ( $\bar{X}$ , Compl.-) y la otra un *pool* de esos tres individuos mezclados después de inactivar el complemento (*Pool* 3, Compl.-). Los resultados están expresados como media de las concentraciones de las tres réplicas biológicas  $\pm$  su desviación estándar

Suero	Condición	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	EGF (pg/mL)	PDGF (ng/mL)	Fibronectina ( $\mu$ g/mL)
AS	$\bar{X}$ (Compl.-)	212,24 $\pm$ 51,97	0,00 $\pm$ 0,00	185,29 $\pm$ 56,32	258,69 $\pm$ 122,51	169,28 $\pm$ 108,11
	<i>Pool</i> 3 (Compl.-)	185,67 $\pm$ 12,18	0,00 $\pm$ 0,00	212,52 $\pm$ 3,87	0,00 $\pm$ 0,00	287,00 $\pm$ 5,88
PRGF	$\bar{X}$ (Compl.-)	219,71 $\pm$ 24,79	4,18 $\pm$ 1,48	154,11 $\pm$ 31,02		
	<i>Pool</i> 3 (Compl.-)	227,71 $\pm$ 11,73	7,06 $\pm$ 2,68	146,65 $\pm$ 0,92		

#### 4.2 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR *IN VITRO*

Con objeto de estudiar el efecto del hemoderivado s-PRGF o de éste combinado con el bioadhesivo HaNa, sobre la proliferación de las células de epitelio corneal (HCE), se expusieron éstas a 24, 48 y 72 horas a diferentes tratamientos. Los tratamientos (añadidos al medio base de cultivo junto con los suplementos según se describe en materiales y métodos) fueron los siguientes:

- FBS al 10% al que llamamos medio de cultivo estándar que se utiliza para el cultivo habitual de células HCE
- BSA al 1% que lo vamos a utilizar como control porque con este tratamiento las HCE no proliferan al carecer de factores de crecimiento, moléculas de señalización celular etc
- El hemoderivado s-PRGF al 45%, nos interesa estudiar si aumenta la proliferación respecto al tratamiento estándar
- El hemoderivado s-PRGF al 45% combinado con HaNa al 0,1%, para evaluar si la adicción del bioadhesivo tiene algún efecto beneficioso sobre la proliferación. Parece ser que *in vivo* el bioadhesivo aumenta la adhesión a la superficie corneal y la persistencia del tratamiento (López-García *et al.*, 2014)

- El bioadhesivo HaNa al 0,1% para evaluar si aplicado solo tiene algún efecto en la proliferación

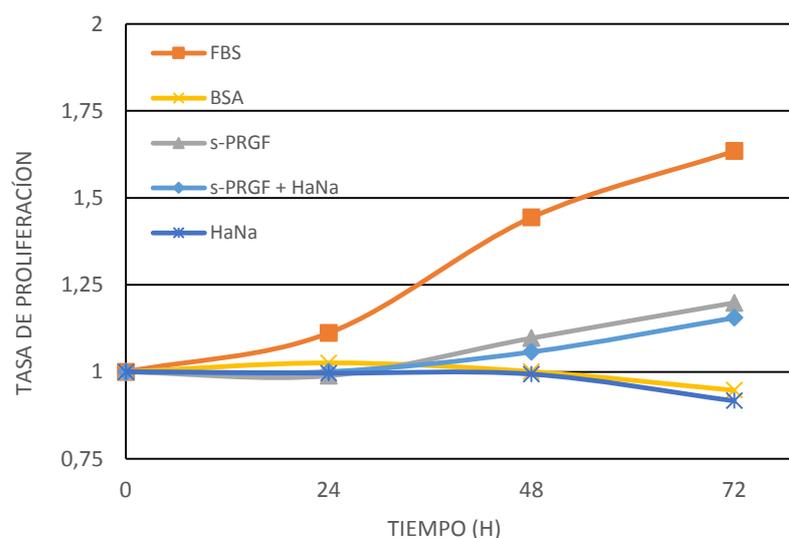
En un principio se realizaron tres repeticiones del ensayo MTT, pero en dos de ellos hubo un problema de contaminación en el hemoderivado s-PRGF y esto hizo que los resultados obtenidos no sean fiables. Por tanto, los resultados que se van a mostrar a continuación corresponden a un solo ensayo MTT (**Tabla 6**). Lo más llamativo es que en los tratamientos con FBS y con los dos tratamientos de s-PRGF la tasa de proliferación aumenta a lo largo del tiempo; mientras que en el caso del control (BSA) y el tratamiento con HaNa se mantiene constante.

**Tabla 6. Tasa de proliferación de células de epitelio corneal (HCE) expuestas a 24, 48 y 72 horas con BSA al 1% como control, FBS al 10%, s-PRGF al 45%, s-PRGF al 45% con HaNa 0,1% y HaNa al 0,1%. Los resultados se han expresado en términos de tasa de proliferación  $\pm$  SD de las células viables con respecto a las células viables antes de la exposición con los tratamientos (t=0 horas).**

Tratamiento	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
Control	1,03 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,02	0,95 $\pm$ 0,03
FBS	1,11 $\pm$ 0,04	1,44 $\pm$ 0,08	1,63 $\pm$ 0,06
s-PRGF	0,99 $\pm$ 0,05	1,10 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,07
s-PRGF + HaNa	1,00 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,03	1,16 $\pm$ 0,05
HaNa	1,00 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,03

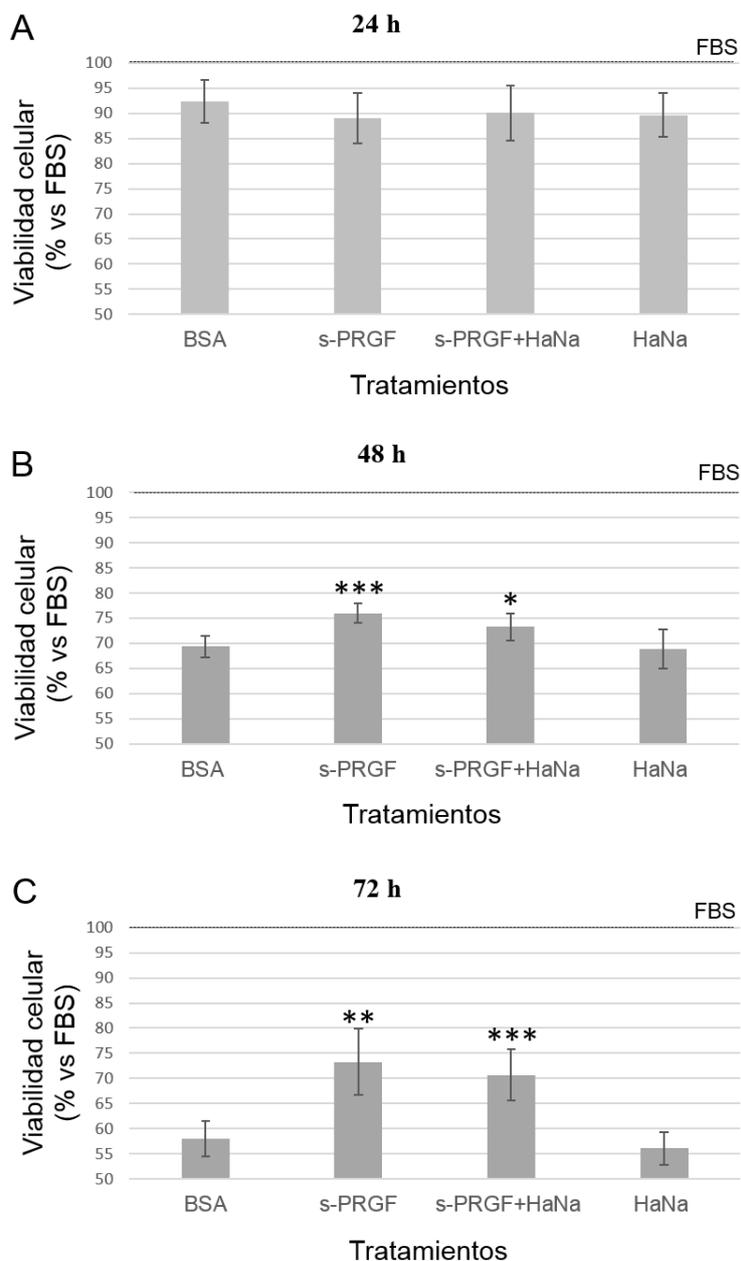
Si se analiza la proliferación celular a lo largo del tiempo con los distintos tratamientos (**Figura 4**) se observa como el medio de cultivo estándar obtiene el crecimiento más rápido y se desmarca de los demás a lo largo del tiempo. Analizando la tendencia de los tratamientos con s-PRGF se puede apreciar como en las primeras 24 horas no hay un aumento de la proliferación respecto al tiempo cero y que es a partir de las 24 horas cuando se observa una proliferación progresiva. Entre los dos tratamientos con s-

PRGF parece que el hemoderivado solo, presenta una tasa de proliferación ligeramente superior. El control y el ácido hialurónico siguen la misma tendencia, en las primeras 48 horas la proliferación se mantiene constante, manteniendo la misma cantidad que en el tiempo 0. A partir de las 48 horas se observa como decrece levemente la proliferación debido a que estos tratamientos no tienen los factores de crecimientos básicos para que las HCE se mantengan vivas.



**Figura 4. Progresión de la proliferación (medidos con el ensayo MTT) de células HCE expuestas a 24, 48, 72 horas a los diferentes tratamientos.** Los resultados están expresados como tasa de proliferación de células viables respecto a las células viables antes de la exposición a los tratamientos a t=0 horas.

Si comparamos la viabilidad celular en respuesta a los dos tratamientos con hemoderivados, la BSA y el HaNa con la respuesta obtenida con FBS (**Figura 5**), encontramos que a 24 h los cuatro tratamientos presentan una viabilidad celular muy parecida en torno al 90% (**Figura 5A**). A 48 h la diferencia entre los tratamientos es más apreciable obteniendo mayor viabilidad en los tratamientos que se ha utilizado el hemoderivado (**Figura 5B**). Tanto el s-PRGF solo, como combinado con el ácido hialurónico muestran diferencias estadísticamente significativas respecto al BSA. A 72 h la viabilidad con los dos tratamientos que contienen s-PRGF se mantiene constante, siendo levemente superior la del hemoderivado solo (**Figura 5C**). También hay diferencias estadísticamente significativas respecto al BSA a este tiempo.



**Figura 5: Viabilidad (ensayo MTT) de células HCE expuestas a los diferentes tratamientos.** La viabilidad se midió a 24, 48 y 72 horas después de aplicar los tratamientos. Los resultados se han expresado como porcentaje de la media  $\pm$  SD con respecto a la viabilidad de las células tratadas con FBS. Diferencias estadísticamente significativas respecto a las células expuestas a BSA (Control). \* $P \leq 0,05$ . \*\* $P \leq 0,01$ . \*\*\* $P \leq 0,001$ .

Un aspecto interesante a estudiar es comprobar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre el s-PRGF y el s-PRGF combinado con ácido

hialurónico. Parece que el s-PRGF aumenta más la proliferación que el combinado con ácido hialurónico pero aun así, no se ha visto que sean estadísticamente diferentes (**Tabla 7**). El FBS es estadísticamente significativo respecto a todos los tratamientos a apartir de las 24 h en adelante. A partir de las 48 h el s-PRGF es estadísticamente significativo respecto al ácido hialurónico. A partir de 72 h también el s-PRGF combinado con HaNa es estadísticamente diferente respecto al HaNa.

**Tabla 7. Significaciones estadísticas al comparar los diferentes tratamientos entre sí. Prueba t de Student.**

24 h	BSA	FBS	s-PRGF	s-PRGF+HaNa	HaNa
BSA		*P≤ 0,05	No	No	No
FBS			††P≤ 0,01	†P≤ 0,05	††P≤ 0,01
s-PRGF				No	No
s-PRGF+HaNa					No
48 h	BSA	FBS	s-PRGF	s-PRGF+HaNa	HaNa
BSA		**P≤ 0,01	***P≤ 0,001	*P≤ 0,05	No
FBS			††P≤ 0,01	†††P≤ 0,001	†††P≤ 0,001
s-PRGF				No	‡‡P≤ 0,01
s-PRGF+HaNa					No
72 h	BSA	FBS	s-PRGF	s-PRGF+HaNa	HaNa
BSA		***P≤ 0,001	**P≤ 0,01	***P≤ 0,001	No
FBS			†††P≤ 0,001	†††P≤ 0,001	†††P≤ 0,001
s-PRGF				No	‡‡‡P≤ 0,001
s-PRGF+HaNa					‡‡‡P≤ 0,001

Diferencias estadísticamente significativas respecto al control. \*P≤ 0,05. \*\*P≤ 0,01. \*\*\*P≤ 0,001.

Diferencias estadísticamente significativas respecto al FBS. †P≤ 0,05. ††P≤ 0,01. †††P≤ 0,001.

Diferencias estadísticamente significativas respecto a s-PRGF y s-PRGF+HaNa. †P≤ 0,05. ‡P≤ 0,01.

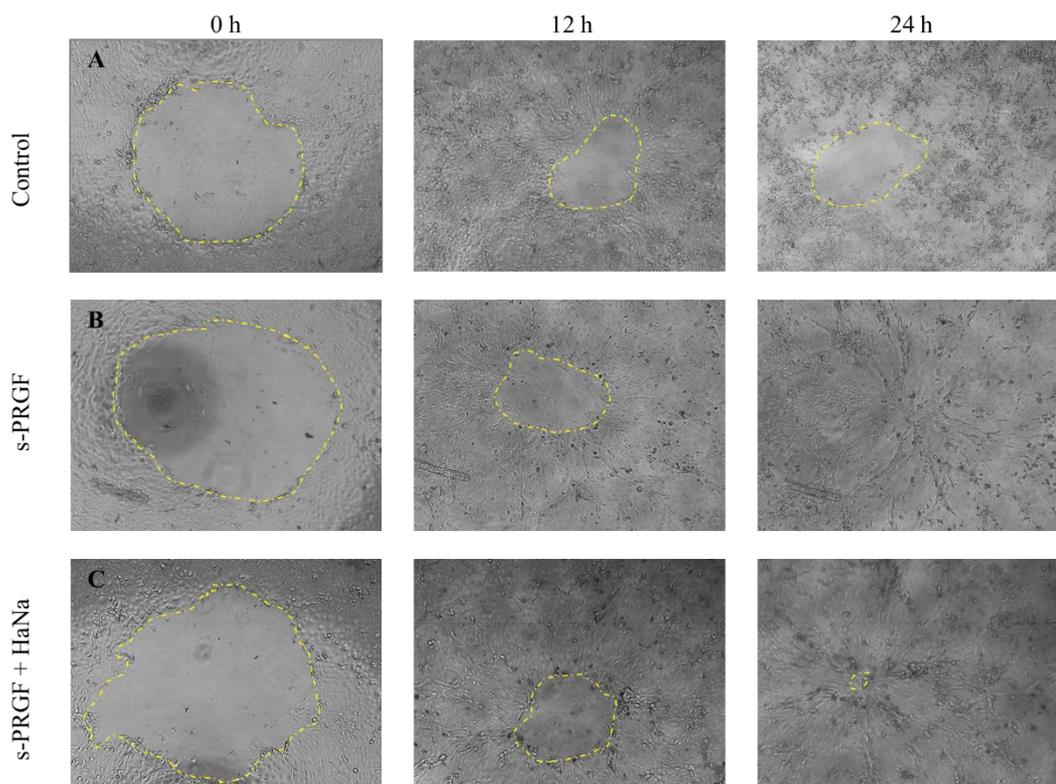
‡‡P≤ 0,001)

### 4.3 ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR *IN VITRO*

Se utilizó el método de la herida conocido como *Scratch wound-healing assay* en células HCE para testar la habilidad de diferentes tratamientos (los mismos que se utilizan en el ensayo MTT) para promover *in vitro* la migración y la reepitelización. En un principio, se hicieron tres repeticiones pero como ocurrió con los ensayos MTT, debido a un problema de contaminación con el s-PRGF se ha decidido no introducir esos datos ya que no son fiables. Los datos que se van a mostrar corresponden a un

solo ensayo de migración, por tanto, como en el caso del ensayo MTT van a ser resultados preliminares que posteriormente, se tendrán que repetir otros dos ensayos para corroborar los resultados.

Analizando el área reepitelizada de la herida, observamos que el tratamiento con s-PRGF es el que primero cierra, recuperándose la monocapa a 24 horas (**Figura 6**).



**Figura 6.** Fotografías tomadas con el microscopio de contraste de fases a 40X ilustrando la migración de las células HCE tratadas con el tratamiento control (A), con s-PRGF (B) y con s-PRGF + HaNa (C). A 24 horas se puede observar que con el s-PRGF la herida está cerrada completamente, en el combinado con ácido hialurónico casi está cerrada y la herida tratada con el tratamiento control se mantiene sin cerrar.

Analizando la progresión de cierre observamos que el control y el tratamiento con HaNa siguen la misma tendencia, de forma que se ha reepitelizado el área (en  $\text{mm}^2$ ) en más de un 50% a las 12 h y de este tiempo en adelante ese porcentaje se mantiene constante (**Tabla 8**). Entre estos dos tratamientos no se han observado diferencias estadísticamente significativas. En cambio, a las 12 h los tratamientos con FBS, s-

PRGF solo y el combinado con HaNa muestran una tendencia parecida, siendo el porcentaje de cierre a este tiempo de alrededor de un 64%. A 24 h los pocillos tratados con s-PRGF están completamente cerrados. En este tiempo, los tratados con FBS y s-PRGF combinado con HaNa todavía no han cerrado completamente, pero cabe destacar que el cierre está más acelerado en los tratados con el hemoderivado (**Figura 7**). Los tratamientos con FBS y s-PRGF son estadísticamente significativos respecto al control a partir de las 12 h. En el caso del s-PRGF combinado con hialurónico es estadísticamente significativo respecto al control a partir de las 24 h. También se han encontrado diferencias significativas entre el ácido hialurónico respecto al tratamiento con s-PRGF a partir de las 12 horas y respecto al s-PRGF combinado con ácido hialurónico a partir de las 24 horas (**Tabla 8**).

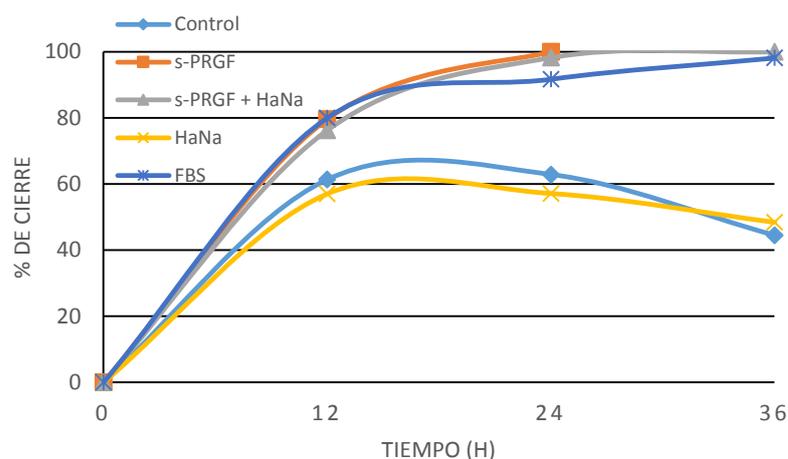
Solo se muestran los datos obtenidos hasta las 36 horas, pero se hicieron fotos también a las 48 horas y tanto las heridas tratadas con el tratamiento control como las tratadas con el ácido hialurónico no habían cerrado, se mantenían como a 36 h.

**Tabla 8.** Cierre a lo largo del tiempo de las áreas denudadas en cultivos HCE incubados con BSA al 1% como control, FBS al 10%, s-PRGF al 45%, s-PRGF al 45% con HaNa al 0,1% y HaNa al 0,1 %. Los resultados se han expresado como media del área reepitelizada  $\pm$  SD de los diferentes pocillos en mm<sup>2</sup>.

Tratamiento	Tiempo			
	0 horas	12 horas	24 horas	36 horas
Control	0,69 $\pm$ 0,10	0,27 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,10
FBS	0,71 $\pm$ 0,16	0,14* $\pm$ 0,07	0,06*** $\pm$ 0,05	0,01** $\pm$ 0,00
s-PRGF	0,75 $\pm$ 0,08	0,15* $\pm$ 0,06	Cerrado	Cerrado
s-PRGF+ HaNa	0,70 $\pm$ 0,10	0,17 $\pm$ 0,09	0,01** $\pm$ 0,00	Cerrado
HaNa	0,70 $\pm$ 0,15	0,30# $\pm$ 0,08	0,30## $\pm$ 0,10	0,36## $\pm$ 0,08

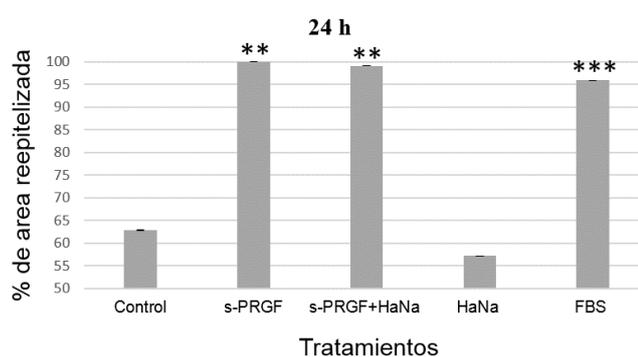
Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (BSA). \*P $\leq$  0,05. \*\*P $\leq$  0,01. \*\*\*P $\leq$  0,001.

Diferencias estadísticamente significativas respecto a s-PRGF. #P $\leq$  0,05. ##P $\leq$  0,01)



**Figura 7. Progresión de la migración de células HCE a 12, 24 y 36 horas al ser expuestas a los diferentes tratamientos.** Se puede observar que a lo largo del tiempo los cultivos tratados con los hemoderivados y con el medio estándar se van cerrando de manera progresiva, mientras que a partir de las 12 h las heridas tratadas con HaNa y con el tratamiento control se mantienen más o menos constante. Los resultados se han expresado como porcentaje de área reepitelizada o cierre a lo largo del tiempo.

Respecto al área reepitelizada a 24 horas, con el tratamiento de s-PRGF el 100% de las heridas se han cerrado, recuperándose la monocapa. Los resultados se han expresado como porcentaje de área reepitelizada o de cierre  $\pm$  SD. Diferencias estadísticamente significativas respecto a las células expuestas a BSA. **(Figura 8).**



**Figura 8. Porcentaje de área reepitelizada a 24 horas con los diferentes tratamientos.** Al término de este periodo todas las heridas tratadas con s-PRGF se han cerrado, recuperándose la monocapa. Los resultados se han expresado como porcentaje de área reepitelizada o de cierre  $\pm$  SD. Diferencias estadísticamente significativas respecto a las células expuestas a BSA. **\*\*P**  $\leq$  0,01. **\*\*\*P**  $\leq$  0,001.

## 5. DISCUSIÓN

Hemos investigado dos hemoderivados, el suero autólogo (AS) y el suero derivado del plasma rico en factores de crecimiento (s-PRGF). Desde hace alguna década, el AS se ha utilizado como agente terapéutico para varios defectos de la superficie ocular (Tsubota *et al.*, 1999 a, b). En cambio, el hemoderivado s-PRGF se ha introducido recientemente en el área de la oftalmología obteniendo resultados satisfactorios para en el tratamiento de defectos epiteliales de la córnea y síndrome de ojo seco (López-Plandolit *et al.* 2010 y 2011).

Se sabe que las plaquetas son vehículos liberadores de concentraciones suprafisiológicas de factores cicatrizantes para favorecer y acelerar el cierre de heridas de diferentes tejidos, entre ellos el epitelio corneal. Entre los genéricamente denominados PRPs se encuentran los hemoderivados que se van a estudiar. La diferencia principal entre los dos hemoderivados radica en que en la obtención del AS la coagulación ocurre de manera espontánea y en presencia de leucocitos; en cambio, en el s-PRGF la coagulación es inducida, concentrando las plaquetas en la fase superior y eliminando la serie roja y los leucocitos, antes de la activación de las plaquetas. Así, se evitan los efectos pro-inflamatorios de las proteasas y de las hidrolasas que se encuentran en los glóbulos blancos.

Siguiendo la línea de investigación del grupo, se han estudiado los efectos *in vitro* del hemoderivado s-PRGF solo y también combinado con un bioadhesivo, como es el ácido hialurónico, sobre la proliferación y migración de células HCE utilizando concentraciones que habitualmente se utilizan en la práctica clínica.

En primer lugar, se determinó la concentración de ciertos factores de crecimiento en el AS y s-PRGF para caracterizar su contenido. Estos factores pueden influir en la proliferación y migración celular y su diferente concentración en los hemoderivados puede explicar los diferentes efectos biológicos de los mismos. Nuestros resultados de cuantificación son congruentes con los obtenidos en trabajos anteriores (Freire *et al.*, 2012; López-Plandolit *et al.*, 2010 y 2011) y en estudios de otros autores (Anitua *et al.*, 2013).

Hemos observado que la filtración disminuye la concentración de la mayoría los factores de crecimiento que se estudian, estando menos afectado el VEGF. Además, hemos comprobado que se produce una pérdida mayor con el filtro amarillo (membrana Durapore®). Consultando la ficha técnica de la casa comercial Millipore sobre los filtros Millex para la filtración de soluciones biológicas (disponible en <http://www.emdmillipore.com/ES/es>) indica que el filtro Durapore® tiene una adsorción proteica ultra baja si lo comparamos con el de membrana Millipore Express™ al que hemos denominado como filtro verde. Por la propia experiencia del grupo y como comenta López-García *et al.* (2007), esto lo hemos atribuido a que el material del filtro hace que se sature y obstruya más fácilmente quedándose los factores retenidos.

Estudios de otros autores han demostrado que el calentamiento inactiva el complemento (Anitua *et al.*, 2014) afectando a la concentración de diferentes factores de crecimiento. Nosotros hemos observado que la concentración de EGF y HGF se reduce considerablemente tanto en el AS y en el s-PRGF. Sin embargo, esta reducción de la concentración del s-PRGF no parece afectar a la capacidad de las células de epitelio corneal para promover la proliferación y migración celular, al menos *in vitro* (Anitua *et al.*, 2014).

Para realizar los ensayos funcionales de proliferación y migración celular, se necesita un volumen importante del hemoderivado. Por ello y apoyándonos en lo anteriormente citado, los ensayos celulares *in vitro* se han realizado con un *pool* de individuos con el complemento inactivado. Así obtenemos mayor volumen de suero, el potencial biológico *in vitro* del s-PRGF se mantiene y además el calor disminuye los componentes relacionados con el sistema inmune, evitando así las interacciones de las moléculas de los diferentes individuos al mezclar las muestras.

La cicatrización del epitelio corneal requiere migración de las células epiteliales para cubrir el área desepitelizada, además de la proliferación y la diferenciación celular. Las células distales al área de la herida son estimuladas para migrar hacia el centro de la herida, para formar de nuevo una monocapa sobre el área desepitelizada y así restaurar la función epitelial corneal (Fini *et al.*, 2005).

En el caso de las lesiones corneales se utilizan hemoderivados de uso tópico para compensar la ausencia de angiogénesis de este tejido avascular. Como hemos comentado anteriormente estos hemoderivados contienen factores de crecimiento, citoquinas y otras moléculas bioactivas que son esenciales para el reemplazo de células de tejidos epiteliales y estromales en la cicatrización corneal (Freire *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta el papel de la proliferación y migración celulares en los procesos de cicatrización hemos realizado dos ensayos diferentes.

En primer lugar, hemos utilizado un ensayo MTT para estudiar la viabilidad y la proliferación celular *in vitro* bajo diferentes tratamientos. Se ha observado que los dos tratamientos que contienen s-PRGF siguen la misma tendencia que las células tratadas con el medio estándar, manteniendo una viabilidad creciente y progresiva a lo largo del tiempo. Esto nos indica que la aplicación conjunta con el ácido hialurónico no tiene efectos tóxicos sobre las células de epitelio corneal. Aun así, si comparamos el tratamiento con bioadhesivo con el que no lo contiene no parece existir ningún efecto beneficioso en cuanto a viabilidad celular se refiere.

Cabe destacar que las células tratadas con el medio estándar muestran un crecimiento más desmarcado y rápido respecto a los de los hemoderivados. Sin embargo, el medio estándar contiene FBS, un suero xenobiótico que en ningún caso se puede utilizar para la expansión *in vitro* de células para su uso en terapia celular. Por ello, el crecimiento progresivo de las células con hemoderivados humanos, plantea su uso como una opción muy atractiva para las amplificaciones celulares en medicina regenerativa.

En segundo lugar, utilizamos el método de la herida (*Scratch wound-healing assay*) para determinar *in vitro* la capacidad migratoria de células bajo ciertos tratamientos.

Una variación en el protocolo del método utilizado anteriormente en el grupo de investigación, ha sido la aplicación del agente antiproliferativo mitomicina C (MMC) antes de aplicar los tratamientos en el ensayo de migración. La MMC es un agente antibiótico-antineoplásico aislado del hongo *Streptomyces caespitosus* que inhibe la síntesis del ADN (ácido desoxirribonucleico), ARN (ácido ribonucleico) y proteínas en células de crecimiento rápido y por ello, la proliferación celular. Recientemente la mitomicina C ha ganado aceptación clínica generalizada en la comunidad oftalmológica como antifibrótico profiláctico en la terapia para prevenir la

cicatrización de la córnea y la opacidad siguiente a los procedimientos quirúrgicos por láser, tales como la queratectomía fotorrefractiva (PRK) y queratomileusis asistida por láser *in situ* (LASIK) (Jester *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que el retraso de la cicatrización y el daño celular que produce es dependiente de la dosis (Ando *et al.*, 1992), nosotros hemos aplicado una concentración mínima para que este efecto no sea excesivo *in vitro*. Hemos observado que la aplicación de este agente no afecta al ritmo de migración puesto que los resultados son equivalentes a los de experimentos anteriores (Freire *et al.*, 2014). Luego, el cierre de la monocapa se debe solo a la migración y no a la proliferación celular.

El análisis realizado indica que los dos tratamientos que contienen s-PRGF favorecen la migración de las células si se comparan con el tratamiento control. Anitua *et al.* (2013) también realizan un estudio parecido sobre el aumento de la cicatrización con s-PRGF, pero en su caso realizan solo una comparación entre dos preparados de s-PRGF con FBS al 0,1% como control. Los resultados obtenidos son que los dos tratamientos con s-PRGF aceleran la cicatrización respecto al control. Estos resultados son lógicos ya que la concentración utilizada del FBS es muy inferior a la utilizada por los hemoderivados e insuficiente para el correcto crecimiento celular. Nosotros en cambio, hemos comparado más tratamientos incluyendo un control de BSA al 1% carente de suero y un tratamiento con FBS al 10%, medio estándar habitual utilizado para cultivar células de epitelio corneal. Así hemos observado que los dos tratamientos con hemoderivados favorecen la migración celular y lo que es más importante, lo hacen más rápidamente que el FBS. Por otra parte, el aporte de HaNa junto con el s-PRGF no favorece la migración celular.

## 6. CONCLUSIONES

Modificaciones en el protocolo de obtención de los hemoderivados tales como son la filtración o el calentamiento disminuyen la concentración de ciertos factores de crecimiento. En el caso de la filtración, se observa una mayor pérdida de factores utilizando un filtro con una membrana de PVDF (Durapore®) para todos los factores estudiados. El calentamiento produce una reducción de la concentración superior al 50% en el caso del HGF y EGF, manteniéndose constante en el caso del VEGF. La mezcla de diferentes muestras con el complemento inactivado para formar un *pool* no presenta cambios en la concentración al compararlo con la media de las muestras utilizadas. Por tanto, la utilización de un *pool* del hemoderivado no supone pérdida de factores de crecimiento, haciendo de ello un procedimiento perfectamente aceptable para los ensayos celulares.

El tratamiento con s-PRGF y el combinado con el bioadhesivo promueven la proliferación y migración de las células de epitelio corneal (HCE) *in vitro* de manera similar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Cabe destacar, que la adicción del bioadhesivo no produce efecto tóxico en las células, sin embargo, no se han encontrado efectos beneficiosos en cuanto a proliferación y migración se refiere. A este respecto, creemos que hay que dar un paso más haciendo comprobaciones *in vivo*, ya que, a diferencia de la experimentación *in vitro* los componentes de los hemoderivados no están indefinidamente en contacto con las células sino por un espacio de tiempo muy reducido. Por ello la concentración de factores de crecimiento en la aplicación *in vivo* es especialmente importante, y no sería conveniente reducirla mediante procedimientos físicos como la filtración o el calentamiento. Por otra parte, los ensayos *in vivo* permitirían comprobar si la aplicación del bioadhesivo conjuntamente con el hemoderivado aumenta el tiempo de contacto de éste en la superficie ocular y posibilita un menor número de aplicaciones del tratamiento.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Ando, H., Ido, T., Kawai, Y., Yamamoto, T., Kitazawa, Y. 1992. Inhibition of corneal epithelial wound healing. A comparative study of mitomycin C and 5-fluorouracil. *Ophthalmology*. 99: 1809-1814.

Anitua E. 1999. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants*. 14: 529–535.

Anitua, E., Muruzabal, F., Alcalde, I., Merayo-Llodes, J., Orive, G. 2013. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Exp. Eye. Res*. 115: 153-161.

Anitua, E., Muruzabal, F., De la Fuente, M., Merayo-Llodes, J., Orive, G. 2014. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop. *Exp. Eye. Res*. 119: 27-34.

Anitua, E., Sánchez, M., Orive, G., Andía, I. 2007. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 28: 4551-4560.

Araki-Sasaki, K., Ohashi, Y., Sasabe, T., Hayashi, K., Watanabe, H., Tano, Y., Handa, H. 1995. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 36: 614–621.

Chen, J., Chen, Y., Han, S.N. 2013. Comparison of TGF- $\beta$ 1 in tears and corneal haze following Epi-LASIK with and without mitomycin C. *Int. J. Ophth*. 6: 312-315.

Edelhauser, H.F., Ubels, J.L. 2004. *Córnea y esclerótica*, en Kaufman, P.L., Alm, A. Adler fisiología del ojo, versión en español de la 10ª edición de la obra original en inglés Adler's Physiology of the Eye, Elsevier España, S.A., pp. 47-114.

Fini, M.E., Stramer, B.M. 2005. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 24: S2-S11.

Freire, V., Andollo, N., Etxebarria, J., Durán, J.A., Morales, M.C. 2012. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 53: 5571-5578.

- Freire, V., Andollo, N., Etxebarria, J., Hernáez-Moya, R., Durán, J.A., Morales, M.C. 2014. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea*. 0: 1-7.
- Jester, J.V., Nien, C.J., Vasiliou, V., Brown, D.J. 2012. Quiescent keratocytes fail to repair MMC induced DNA damage leading to the long-term inhibition of myofibroblast differentiation and wound healing. *Mol. Vis.* 18: 1828-1839.
- Lambiase, A., Rama, P., Bonini, S., Caprioglio, G., Aloe, L. 1998. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N. Engl. J. Med.* 338: 1174-1180.
- López-García, J.S, García-Lozano, I., Rivas, L., Martínez-Garchitorena, J. 2007. Use of autologous serum in ophthalmic practice. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 82: 9–20.
- López-García, J.S., García-Lozano, I., Rivas, L., Ramirez, N., Raposo, R., Méndez, M.T. 2014. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: clinical and experimental comparative study. *Acta Ophthalmol.* 92: 22-29.
- López-Plandolit, S., Morales, M.C., Freire, V., Etxebarria, J., Durán, J.A. 2010. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 29: 843–848.
- López-Plandolit, S., Morales, M.C., Freire, V., Grau, A.E., Durán J.A. 2011. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea*. 30: 1312–1317.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R. 1998. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod.* 85: 638-646.
- Matsumoto, Y., Dogru, M., Goto, E., Ohashi, Y., Kojima, T., Ishida, R., Tsubota, K. 2004. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology*. 111: 1115–1120.
- Millipore Corporation, Bedford, MA. 2002. Millex® Syringe Filter Units, Sterile, 33mm. Data Sheet. Product Catalog Number: MM\_NF-C7610. Disponible en <http://www.emdmillipore.com/ES/es>.

- Molina-Miñano, F., López-Jornet, P., Camacho-Alonso, F., Vicente-Ortega, V. 2009. The use of plasma rich in growth factor on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int. Wound. J.* 2: 145-148.
- Nieto, A. 2011. Cambios fisiológicos de la córnea en la respuesta al uso de ortoqueratología nocturna. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Pastor, J.C., Calonge, M. 1992. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea.* 11: 311-314.
- Rada, J.A., Johnson, J.M. 2005. Sclera, en: Krachmer, J.H., Mannis, M.J., Holland, E.J. *Cornea*, 2nd ed. Elsevier/Mosby, Philadelphia, Vol 1, pp. 27-35.
- Rolando, M., Zierhut, M. 2001. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv. Ophthalmol.* 45: 203-210.
- Tripathi, B.J., Kwait, P.S., Tripathi, R.C. 1990. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea.* 9: 2-9.
- Tseng, S.C., Tsubota, K. 1997. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am. J. Ophthalmol.* 124: 825-835.
- Tsubota, K., Goto, E., Fujita, H., Ono, H., Inoue, H., Saito, I., Shimmura, S. 1999a. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* 83: 390-395.
- Tsubota, K., Goto, E., Shimmura, S., Shimazaki, J. 1999b. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology.* 106: 1984-1989.
- Welge-Lüssen, U., May, C.A., Neubauer, A.S., Priglinger, S. 2001. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 12: 94-99.

## ANEXO

**Tabla A. 1. Concentración de los factores de crecimiento en los hemoderivados AS y s-PRGF bajo diferentes condiciones de filtración** S.F.: sin filtrar, F.V.: filtro verde, F.A.: filtro amarillo. Los resultados están expresados como media de las concentraciones de las réplicas técnicas  $\pm$  su desviación estándar (SD).

Suero	Condición	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	EGF (pg/mL)	PDGF (ng/mL)	Fibronectina ( $\mu$ g/mL)
AS	S.F. Ind 1	169,82 $\pm$ 30,91	274,54 $\pm$ 10,76	-	19,40 $\pm$ 2,81	454,00 $\pm$ 25,26
	S.F. Ind 2	158,21 $\pm$ 9,67	361,15 $\pm$ 85,06	-	266,00 $\pm$ 2,81	246,00 $\pm$ 25,25
	S.F. Ind 3	236,97 $\pm$ 29,75	275,43 $\pm$ 3,17	-	540,00 $\pm$ 12,79	903,00 $\pm$ 27,93
	F.V. Ind 1	143,28 $\pm$ 4,22	219,37 $\pm$ 33,22	-	7,19 $\pm$ 5880,00	28,60 $\pm$ 5,88
	F.V. Ind 2	180,09 $\pm$ 17,63	324,92 $\pm$ 15,98	-	25,50 $\pm$ 5790,00	43,80 $\pm$ 5,79
	F.V. Ind 3	227,70 $\pm$ 1,87	194,60 $\pm$ 41,86	-	265,00 $\pm$ 12300,00	56,30 $\pm$ 12,30
	F.A. Ind 1	123,28 $\pm$ 4,81	143,01 $\pm$ 1,24	-	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00
	F.A. Ind 2	153,57 $\pm$ 34,43	236,19 $\pm$ 6,91	-	12,50 $\pm$ 17,66	465,00 $\pm$ 40,42
	F.A. Ind 3	199,04 $\pm$ 12,84	237,52 $\pm$ 7,54	-	42,10 $\pm$ 24,15	363,00 $\pm$ 2,10
PRGF	S.F. Ind 1	185,23 $\pm$ 3,04	124,00 $\pm$ 5,59	391,00 $\pm$ 48,97	-	-
	S.F. Ind 2	153,51 $\pm$ 5,43	74,45 $\pm$ 2,49	632,93 $\pm$ 29,40	-	-
	S.F. Ind 3	224,22 $\pm$ 11,72	62,09 $\pm$ 1,25	712,45 $\pm$ 184,82	-	-
	F.V. Ind 1	175,39 $\pm$ 27,93	64,74 $\pm$ 3,75	392,39 $\pm$ 26,83	-	-
	F.V. Ind 2	150,95 $\pm$ 7,84	68,71 $\pm$ 8,12	510,24 $\pm$ 100,37	-	-
	F.V. Ind 3	259,33 $\pm$ 3,13	80,18 $\pm$ 1,87	530,98 $\pm$ 147,93	-	-
	F.A. Ind 1	135,19 $\pm$ 12,04	54,56 $\pm$ 1,88	345,80 $\pm$ 0,00	-	-
	F.A. Ind 2	147,97 $\pm$ 13,27	62,53 $\pm$ 0,63	510,24 $\pm$ 66,10	-	-
	F.A. Ind 3	237,85 $\pm$ 31,00	63,41 $\pm$ 1,87	403,95 $\pm$ 22,27	-	-

**Tabla A.2. Concentración de los factores de crecimiento tras el calentamiento en los hemoderivados AS y s-PRGF.** Control: muestras biológicas filtradas con el filtro verde (F.V.). Compl.-: muestras biológicas filtradas con el filtro verde (F.V.) y calentadas a 56°C durante 30 minutos. Los resultados están expresados como media de las concentraciones de las dos réplicas técnicas  $\pm$  su desviación estándar (SD).

Suero	Condición	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	EGF (pg/mL)	PDGF (ng/mL)	Fibronectina ( $\mu$ g/mL)
<b>AS</b>	Compl.- Ind 1	183,55 $\pm$ 26,16	148,6 $\pm$ 5,54	148,6 $\pm$ 5,54	2,23 $\pm$ 3880	45,1 $\pm$ 3,88
	Compl.- Ind 2	180,94 $\pm$ 15,20	250,14 $\pm$ 11,85	250,14 $\pm$ 11,85	289 $\pm$ 1740	220 $\pm$ 1,74
	Compl.- Ind 3	272,23 $\pm$ 21,37	157,13 $\pm$ 8,36	157,13 $\pm$ 8,36	485 $\pm$ 28000	245 $\pm$ 28
<b>PRGF</b>	Compl.- Ind 1	244,86 $\pm$ 28,59	4,2 $\pm$ 1,37	118,34 $\pm$ 0,91	-	-
	Compl.- Ind 2	195,29 $\pm$ 43,98	2,69 $\pm$ 3,5	170,34 $\pm$ 8,46	-	-
	Compl.- Ind 3	218,98 $\pm$ 5,54	5,64 $\pm$ 0,68	173,65 $\pm$ 5,64	-	-

