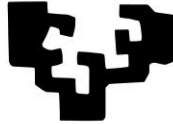


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA**  
Departamento de Biología Celular e Histología

**TESIS DOCTORAL**

**Derivados hemáticos en la regeneración  
del epitelio corneal:  
estudio comparativo *in vitro* e *in vivo***

**Vanesa Freire Vallejo**

**Leioa, 2016**



Trabajo de investigación financiado por el Instituto Clínico Quirúrgico de Oftalmología (ICQO) de Bilbao, la Fundación Jesús de Gangoiti Barrera y el Ministerio de Ciencia e Innovación (PTQ-09-02-01236).



***A mis aitas***



## AGRADECIMIENTOS

Bueno... ¡¡por fin!!

Después de haber pasado por todos los estados de ánimo posibles, ya está, he terminado “La Tesis”, la famosa tesis. Cualquiera que me conozca un poquito sabe de lo que hablo. No sé cuántas veces la habré nombrado en estos últimos años... ¡realmente ha formado parte de mi vida!

Quién me lo iba a decir... para nada entraba en mis planes pero se cruzó en mi camino, hace ya ocho años, cuando me incorporé al ICQO. Poco a poco, casi sin darme cuenta, ya tenía el grosor del trabajo de experimentación hecho, algo con lo que disfrute mucho e hizo fomentar mi interés por la investigación. Tengo muy buen recuerdo de esos momentos, fue muy gratificante ver los resultados y ser consciente de todos los conocimientos que estas adquiriendo.

Más complicada ha sido la fase de redacción, “*Thesis writing in progress*”, pero bueno ¡ya está!

Tengo que dar las gracias a tanta gente que no sé por dónde empezar... así que empezaré por el principio.

Esta tesis no hubiera sido posible sin la dedicación y el esfuerzo de mis dos directoras de tesis, Celia y Noelia. Celia, siempre te tendré que agradecer que me eligieras como candidata para aquella *Beca Gangoiti del 2008*, dándome la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación; gracias por confiar en mí desde el principio. Noelia, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y por todo el tiempo dedicado a esta tesis, que sé que no te sobra; también por transmitirme tu buen hacer y tu rigurosidad en el trabajo.

Gran parte del trabajo de la tesis lo he desarrollado en el ICQO, gracias a esta institución por apoyar el proyecto. Y cómo no, gracias al Dr. Durán, por seguir de cerca el desarrollo de este trabajo y por transmitirme sus múltiples inquietudes, manteniendo mi mente despierta y activa.

También tengo que dar las gracias a mis compañeros y compañeras del ICQO, en especial a mi compi Ainhoa, me ha ayudado mucho, siempre dándome ánimos e intentando motivarme para que siguiera pasito a pasito, sin prisa pero sin pausa, incluso mediante aplicaciones informáticas, ¡lo que nos hemos reído!. También compañeros como Silvia López-Plandolit o Iñaki Rodríguez Agirretxe, que han vivido una situación parecida a la mía con sus tesis y me han ayudado a ver que esto tenía final.



Por otro lado están los compañeros del departamento de Biología Celular, aquí tengo que agradecer a Raquel esos buenos momentos y risas que hemos pasado en el laboratorio y en algún que otro congreso, así se trabaja mucho mejor. También a Amaia, Patri, María, Eli, Rocío, Erika, Yoana,... ¡siempre animándome! Y cómo no, a Jaime, por su ayuda en los experimentos con los conejos y por aparecer siempre por el laboratorio con una sonrisa en la cara y con su optimismo por delante.

Tampoco me puedo dejar a mi equipo, el Leioa Waterpolo, a todas esas compañeras y amigas que durante años, porque han sido años... me han ido preguntando: ¿Qué tal? ¿Cómo va la tesis? ¿Te podemos ayudar?... yo creo que alguna pensaba que no lo conseguía, ¡je-je! La verdad que motivos tenían para pensarlo porque anda que no he paseado los apuntes de una punta a otra en los infinitos viajes que hemos hecho juntas. Del mismo modo tengo que agradecer a mis compañeras de la universidad, con las que me involucré en el mundo de la Biología, a ellas también se les ha hecho largo.

Y como no, a mis amigas, a esas que he tenido amenazadas con que no iban a aparecer en los agradecimientos por no hacerme más que planes, planes y más planes divertidos. Sin embargo, evidentemente, les tengo que dar las gracias por todos los ánimos que me han dado, sobretodo en esta última etapa que ha sido la más dura. Ya no tengo excusa, ¡me apunto a lo que sea!

Por supuesto a mi familia, en especial a mi hermano, a mi cuñada, a mis primas y primos, a los más txikis,... gracias por apoyarme en todo momento, y por comprender que muchas veces no he podido dedicarles todo el tiempo que me hubiera gustado, ¡espero poder devolvéroslo!

Reservo para el final A MIS AITAS, a quienes dedico esta tesis, sin ellos no lo hubiera conseguido. GRACIAS, GRACIAS, GRACIAS. A mi aita porque siempre me animó para que siguiera formándome, no se cansaba de aprender, me ha dado mucha fuerza. Y a mi amatxu por animarme siempre que lo he necesitado, por estar siempre ahí y por la paciencia infinita que ha tenido. No sé quien tenía más ganas de que la acabara, ella o yo.

¡¡Mil gracias a todos y todas!! ¡¡GRACIAS DE CORAZÓN!!

¡Ah! Se me olvidaba dar las gracias a los voluntarios y voluntarias que altruistamente han donado su sangre para poder llevar a cabo cada uno de los experimentos.

## ABREVIATURAS

**A:** absorbancia

**ADP:** adenosín difosfato

**AS:** *Autologous serum*. Suero autólogo

**ATP:** adenosín trifosfato

**BSA:** *Bovine serum albumin*. Seroalbúmina bovina

**cDNA:** DNA complementario

**CEISH:** Comité de Ética para las Investigaciones relacionadas con Seres Humanos

**Cq:** *Quantification cycle*

**Ctrl:** Control

**Cx:** Conexina

**DDSA:** *DoDecenyl Succinic Anhydride*

**DEP:** defecto epitelial persistente

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DMP30:** *2, 4, 6-tri Dimethylamino Methyl Phenol*

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**SD:** *Standard deviation*. Desviación estandar

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

**FGF:** *Fibroblast Growth Factor*. Factor de crecimiento fibroblástico

**h:** horas

**HBSS:** *Hanks Balanced Salt Solution*

**HCE:** *Human Corneal Epithelial*. Epitelio corneal humano

**HGF:** *Hepatocyte Growth Factor*. Factor de crecimiento de hepatocitos

**HRP:** *Horseradish-peroxidase*. Peroxidasa de rábano picante

**Ig:** inmunoglobulina

**IGF-1:** *Insuline-like Growth Factor-1*. Factor de crecimiento insulínico tipo 1

**IL-1:** Interleucina-1

**IL-6:** Interleucina-6

**KGF:** *Keratinocyte Growth Factor*. Factor de crecimiento de queratocitos

**L-PRF:** *Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin*. Fibrina rica en plaquetas y leucocitos

**L-PRP:** *Leukocyte and Platelet-Rich Plasma*. Plasma rico en plaquetas y leucocitos

**MIQE:** *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*

**MMPs:** *Matrix metalloproteinase*. Metaloproteasas de la matriz

**MTT:** *3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio*

**NMA:** *Nadic Methyl Anhydride*

**NGF:** *Nerve Growth Factor*. Factor de crecimiento nervioso

**OD:** *Optical density*. Densidad óptica

**p:** probabilidad (nivel de significación estadístico)

**PBS:** *Phosphate buffered saline*. Tampón fosfato salino

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

**PDGF:** *Platelet Derived Growth Factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PDWHF:** *Platelet-Derived Wound Healing Factor*

**PES:** polietersulfona

**P-PRF:** *Pure Platelet-Rich Fibrin*. Fibrina pura rica en plaquetas

**P-PRP:** *Pure Platelet-Rich Plasma*. Plasma puro rico en plaquetas

**PRF:** *Platelet-Rich Fibrin*. Fibrina rica en plaquetas

**PRGF:** *Plasma Rich in Growth Factors*. Plasma rico en factores de crecimiento

**PRP:** *Platelet-Rich Plasma*. Plasma rico en plaquetas

**qPCR:** *quantitative Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RPCE (cultures):** *Rabbit Primary Corneal Epithelial*. Cultivos primarios de epitelio corneal de conejo

**RT:** retrotranscripción

**RT-qPCR:** *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*. Transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**SBF:** Suero bovino fetal

**SEM:** *Scanning Electron Microscopy*. Microscopía electrónica de barrido

**Spl:** suplementos

**s-PRGF:** *Serum derived from Plasma Rich in Growth Factors*. Suero derivado de plasma rico en factores de crecimiento

**TEM:** *Transmission electron microscopy*. Microscopía electrónica de transmisión

**TGF- $\alpha$ :** *Transforming Growth Factor- $\alpha$* . Factor de crecimiento transformante  $\alpha$

**TGF- $\beta$ :** *Transforming Growth Factor- $\beta$* . Factor de crecimiento transformante  $\beta$

**Tm:** *Melting temperature*. Temperatura de fusión

**TMB:** tetrametilbencidina

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* . Factor de necrosis tumoral- $\alpha$

**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*. Factor de crecimiento vascular endotelial.

**$\bar{x}$ :** media aritmética

**$\chi^2$ :** Chi cuadrado

**– Supp:** sin suplementos

# INDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. SUPERFICIE OCULAR</b> .....	<b>3</b>
1.1. Conjuntiva	4
1.2. Limbo	4
1.3. Córnea	5
1.3.1. Epitelio corneal	6
1.3.1.1. Renovación del epitelio corneal	9
1.3.2. Membrana de Bowman	11
1.3.3. Estroma corneal	11
1.3.4. Membrana de Descemet	12
1.3.5. Endotelio	12
1.3.6. Capa de Dua	13
1.3.7. Inervación corneal	13
1.4. Película lagrimal	13
<b>2. DEFECTO EPITELIAL</b> .....	<b>16</b>
2.1. Definición y conceptos generales	16
2.2. Reparación y regeneración corneal	18
2.3. Tratamientos del defecto epitelial	24
<b>3. LAS PLAQUETAS EN LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN TISULAR</b> .....	<b>25</b>
3.1. Fisiología de la plaqueta	25
3.2. Factores de crecimiento	28
3.2.1. Factores de crecimiento y su relevancia en el cierre de heridas corneales	29
3.2.1.1. EGF	30
3.2.1.2. FGF	31
3.2.1.3. VEGF	32
3.2.1.4. HGF	33
3.2.1.5. PDGF	33
3.2.1.6. Fibronectina	34
3.2.1.7. Otros factores de crecimiento	34
<b>4. HEMODERIVADOS EN LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN TISULAR</b> .....	<b>35</b>
4.1. Definición y conceptos generales	35
4.2. Hemoderivados y su aplicación en oftalmología	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<b>1. ELABORACIÓN DE LOS HEMODERIVADOS</b> .....	<b>53</b>
1.1. Hemoderivados humanos	53
1.2. Hemoderivados de conejo	55
<b>2. CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS EN SANGRE Y DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS HEMODERIVADOS HUMANOS</b> .....	<b>56</b>

<b>3. CULTIVO CELULAR</b> .....	62
3.1. Mantenimiento de los cultivos celulares y recuento celular	62
3.2. Tipos celulares utilizados	63
3.2.1. Línea celular de epitelio corneal humano (HCE)	63
3.2.2. Cultivos primarios de células de epitelio corneal de conejo (RPCE)	65
<b>4. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR</b> .....	66
4.1. Método MTT	66
4.2. Curva de crecimiento	67
4.3. Ensayos de proliferación celular	69
<b>5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA</b> .....	70
5.1. Microscopía óptica de contraste de fases	70
5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	71
5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	72
<b>6. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR</b> .....	73
6.1. Extracción y purificación de RNA total en la línea celular HCE	74
6.2. Cuantificación de RNA	75
6.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	75
6.4. Retrotranscripción	76
6.5. Elección de cebadores	77
6.6. RT-qPCR con SYBR Green	79
6.7. Optimización de las parejas de cebadores	81
6.8. Controles endógenos	83
6.9. Análisis de los resultados de la RT-qPCR	84
<b>7. ENSAYOS DE REEPITELIZACIÓN</b> .....	85
7.1. Reepitelización <i>in vitro</i>	85
7.2. Reepitelización <i>in vivo</i>	85
<b>8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS CÓRNEAS</b> .....	87
<b>9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b> .....	88
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>91</b>
<b>1. CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS EN SANGRE Y DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS HEMODERIVADOS HUMANOS</b>	<b>93</b>
<b>2. CULTIVO CELULAR: INFLUENCIA DE LOS SUPLEMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA VIABILIDAD CELULAR</b>	<b>96</b>
<b>3. EFECTO DE LOS HEMODERIVADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR</b>	<b>99</b>
3.1. Cultivos de células de epitelio corneal humano (HCE)	99
3.2. Cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE)	102

<b>4. EFECTO DE LOS HEMODERIVADOS HUMANOS SOBRE LA.....</b>	<b>105</b>
<b>DIFERENCIACIÓN CELULAR</b>	
4.1. Análisis morfológico mediante microscopía de contraste de fases	105
4.2. Estudio de la ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM)	107
4.3. Expresión génica de marcadores de diferenciación corneal mediante RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR)	112
<b>5. EFECTO DE LOS HEMODERIVADOS SOBRE LA REEPITELIZACIÓN.....</b>	<b>115</b>
5.1. Reepitelización <i>in vitro</i> : migración celular inducida por los hemoderivados	115
5.1.1. Células HCE	115
5.1.2. Cultivos RPCE	117
5.2. Reepitelización <i>in vivo</i> en un modelo de conejo	119
<b>6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS CÓRNEAS DE CONEJO TRAS LA.....</b>	<b>122</b>
<b>REEPITELIZACIÓN</b>	
<b>DISCUSIÓN_____</b>	<b>125</b>
<b>CONCLUSIONES_____</b>	<b>149</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA_____</b>	<b>153</b>
<b>ANEXO_____</b>	<b>175</b>



# Introducción

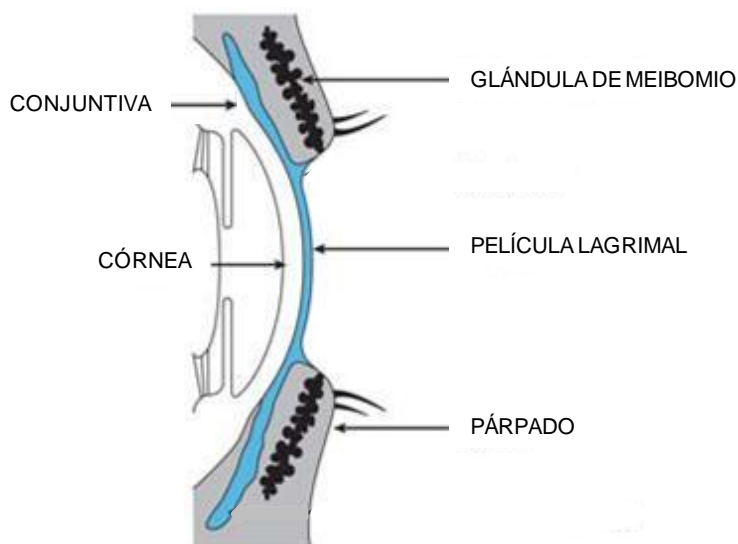




## 1. SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular es una unidad anatómica funcional que engloba diversas estructuras del ojo y sus anejos (Figura 1), las cuales permiten mantener la adecuada transparencia corneal, y proteger el ojo de la agresión externa. Bajo esta definición se incluye a la conjuntiva, el limbo esclerocorneal, la córnea y la película lagrimal (Fine & Yanoff, 1979). Los párpados, las glándulas lagrimales y el sistema de drenaje lagrimal constituyen anejos esenciales para la adecuada homeostasis de la superficie ocular, contribuyendo a la humectación y eliminación de sustancias. Para el mantenimiento de esta homeostasis se necesitan también unas vías nerviosas aferentes y eferentes intactas.

Para mantener la transparencia e integridad de la córnea son necesarias las siguientes funciones: hidratación, oxigenación, nutrición, eliminación de materiales de desecho, estabilidad de la barrera inmunológica y capacidad de reparación. Además, para poder mantener el epitelio corneal íntegro, es necesario un equilibrio anatómico y funcional entre todas las estructuras de la superficie ocular. Por ejemplo, la ausencia de queratina en el epitelio corneal lo hace susceptible a la desecación y traumatismos, por lo que la función de los párpados y de la película lagrimal es esencial para mantener la transparencia corneal. Por ello, la creación y el mantenimiento de una película lagrimal estable son de vital importancia para proteger el epitelio corneal.



**Figura 1.** Anatomía de la superficie ocular que incluye diversas estructuras del ojo y sus anejos. (Adaptado de [www.maths.ox.ac.uk](http://www.maths.ox.ac.uk); Copyright by Oxford Centre for Collaborative Applied Mathematics)

## 1.1. Conjuntiva

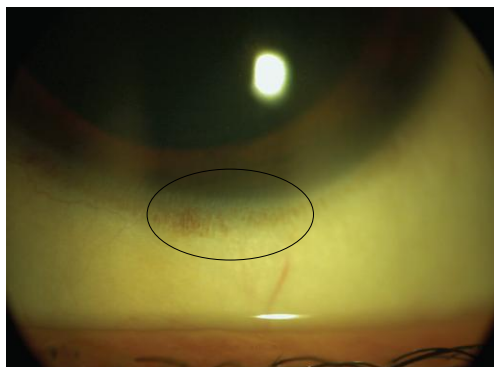
La conjuntiva es una membrana mucosa compuesta por un epitelio estratificado no queratinizado entre el que se distribuyen las células caliciformes productoras de mucina, la cual es esencial para la estabilidad lagrimal y transparencia corneal. A diferencia del epitelio corneal, carece de una membrana basal organizada y descansa sobre un tejido conectivo fibrovascular conocido como sustancia propia. Este tejido se divide en una capa más superficial, donde residen los linfocitos y una más profunda, con vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas.

Posee un enorme potencial de respuesta a la infección dada su alta vascularización, gran cantidad de células inmunitarias y secreción de inmunoglobulinas y enzimas bactericidas. El epitelio de la conjuntiva es capaz de absorber sustancias diluidas en la película lagrimal por endocitosis o por difusión a través de las uniones intercelulares (Arntz & Durán, 2004). Esta propiedad facilita el efecto terapéutico de la instilación de colirios en los fondos de saco.

## 1.2. Limbo

El limbo o unión esclerocorneal es una zona circular correspondiente a la franja de transición entre la córnea y la esclera. Esta última es una capa blanca externa de tejido conjuntivo denso que se sitúa a continuación de la córnea hacia la parte posterior del globo ocular, y recubierto por la conjuntiva en la zona contigua a la córnea.

El limbo está implicado en múltiples funciones, como la nutrición de la córnea periférica, la cicatrización corneal y las respuestas de sensibilidad. A nivel del limbo la conjuntiva adopta una disposición papilar con pliegues orientados radialmente por los cuales discurren vasos sanguíneos y fibras nerviosas, denominados empalizadas de Vogt (Figura 2). Esta zona es de gran importancia ya que en ella se encuentran las células madre limbares (*limbal stem cells*). El limbo proporciona un entorno ideal, también llamado nicho, para el desarrollo correcto de estas células madre aportando protección física contra los peligros ambientales y dotando de un aporte vascular e inervacional correctos para mantener su capacidad reproductiva indefinida (Zieske *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2008). Dichas células, fenotípicamente indiferenciadas, son las responsables de la repoblación centrípeta y regeneración de la superficie corneal y evitan el avance del epitelio conjuntival sobre la córnea (Schermer *et al.*, 1986). En caso de producirse un daño en el área limbar, se produce un retraso o un fracaso en la reepitelización de la córnea (Huang & Tseng, 1991).



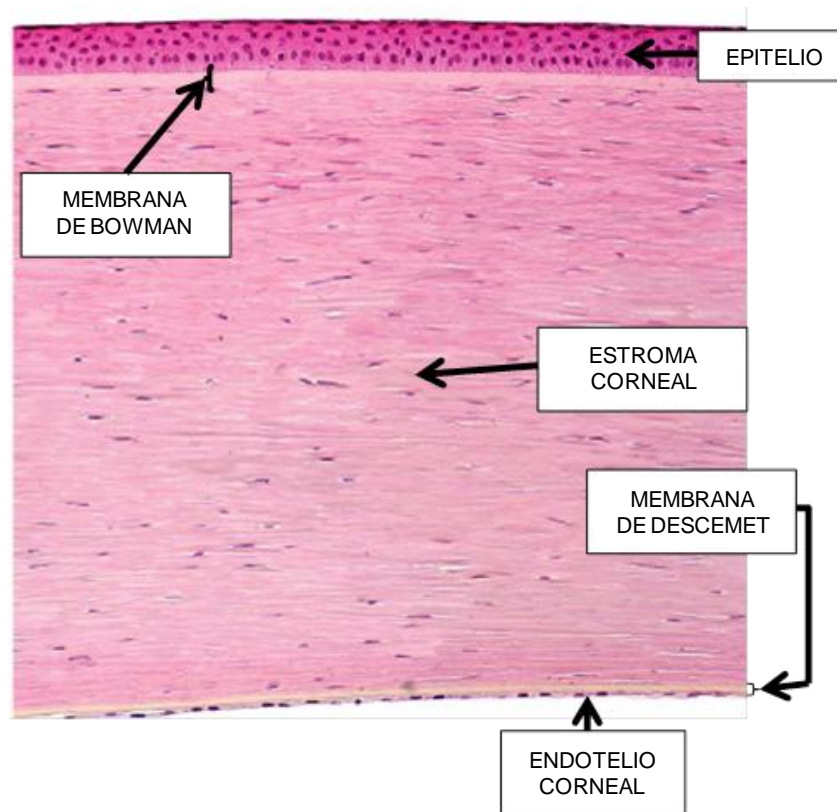
**Figura 2.** Empalizadas de Vogt en el limbo esclerocorneal.

### 1.3. Córnea

La córnea es un tejido altamente diferenciado que permite la refracción y la transmisión de la luz y su integridad es fundamental para una visión normal, siendo el principal elemento óptico del ojo. Presenta unas características específicas en cuanto a morfología, tensión, permeabilidad y transparencia óptica que la diferencia del resto de los tejidos del organismo. Estructuralmente, consiste básicamente en una lente cóncavo-convexa con su cara anterior en contacto íntimo con la película lagrimal precorneal, y su cara posterior bañada por el humor acuoso. Estas relaciones permiten a la córnea carecer de vascularización para conservar su transparencia, ya que estos fluidos, lágrima y humor acuoso, junto con los vasos sanguíneos del limbo, son los máximos responsables de mantener sus requerimientos fisiológicos.

La córnea alcanza un grosor de casi 1 mm en la periferia y es algo menor en la zona central. Histológicamente, está formada por un epitelio estratificado no queratinizado, una zona acelular de unas 10  $\mu\text{m}$  bajo la membrana basal del epitelio que se conoce como membrana de Bowman, un estroma de tejido conectivo, una membrana basal de unos 10  $\mu\text{m}$  producida por el endotelio que se denomina membrana de Descemet y una monocapa de células hexagonales, sin capacidad de división, denominada endotelio (Figura 3). Aunque este tejido avascular es aparentemente simple en su composición, la enorme regularidad y uniformidad de su estructura son las que permiten su precisa transmisión y refracción de la luz.

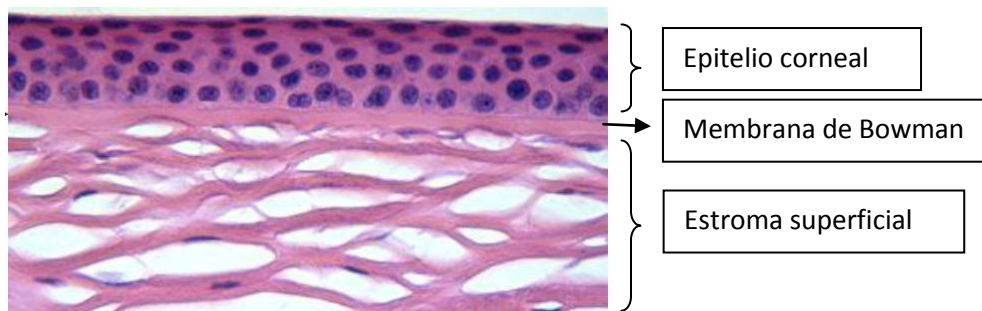
La córnea presenta una de las densidades más altas en cuanto a terminaciones nerviosas de todo el organismo, lo que le dota de una sensibilidad extrema, que resulta ser unas 100 veces superior a la de la conjuntiva adyacente y entre 300 a 400 veces superior a la de la piel (Rózsa & Beuerman, 1982). Esto indicaría que la lesión sobre una sola célula epitelial sería suficiente para provocar la percepción dolorosa (Müller *et al.*, 1997).



**Figura 3.** Sección histológica de la región central de la córnea humana teñida con hematoxilina eosina. Se señalan las diferentes capas que la constituyen. (Aumentos 40x)

### 1.3.1. Epitelio corneal

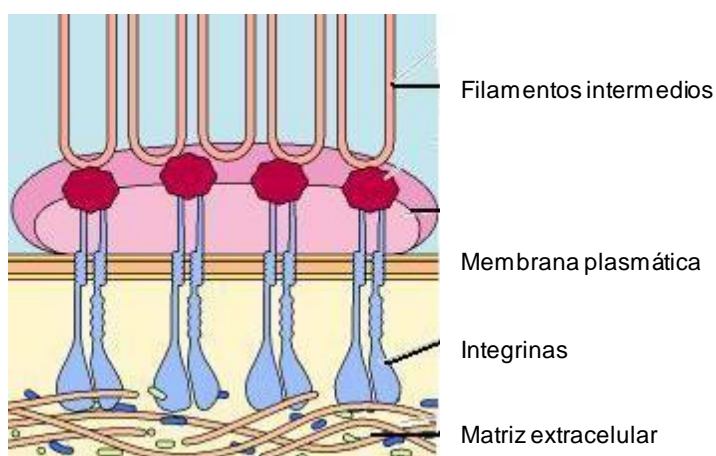
El epitelio corneal es un epitelio de descamación, estratificado plano no queratinizado, formado por varias capas de células, con una estructura muy uniforme, salvo en la periferia donde se hace más grueso e irregular. El espesor medio en humano es de 50 micras en su zona central. En esta zona está constituido por 5-6 capas celulares, mientras que, se observan 8-10 en la periferia. El aspecto de estas células es diferente dependiendo del estrato del epitelio que se trate (Figura 4).



**Figura 4.** Sección histológica de una córnea humana teñida con hematoxilina-eosina. Se observan el epitelio corneal y el estroma superficial humano. (Aumentos 200x)

Dentro del epitelio, se distinguen tres tipos celulares: células basales, aladas y superficiales. Entre todas ellas existen unas uniones intercelulares muy desarrolladas con membranas celulares interdigitadas que confieren una gran estabilidad al epitelio, hemidesmosomas que anclan el epitelio a su membrana basal y abundantes desmosomas. Todas estas estructuras de unión confieren impermeabilidad y adherencia al epitelio.

En la capa más profunda del epitelio corneal se encuentran las **células basales**, de aspecto poligonal, de 10  $\mu\text{m}$  de ancho y 20 de alto. Estas células se anclan por medio de hemidesmosomas a la membrana basal. Es característico de estas células la gran cantidad de filamentos intermedios así como un núcleo prominente. Estos filamentos intermedios se fijan a fibrillas de anclaje situadas en la membrana basal, a través de proteínas **integrinas** presentes en la membrana plasmática basal de las células epiteliales (McMenamin PG *et al.*, 1997). El sistema de anclaje incluye una compleja red de fibras de colágeno tipo VII y placas de anclaje de colágeno tipo IV, que conectan la lámina densa de la membrana basal a las fibras de colágena de la capa de Bowman (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema representativo de un complejo de anclaje entre una célula epitelial corneal y la membrana basal, constituido por la fijación de un hemidesmosoma de una célula epitelial basal a fibras de colágeno tipo VII que atraviesan la membrana basal y penetran intraestromalmente. (Adaptado de [www.genomasur.com](http://www.genomasur.com))

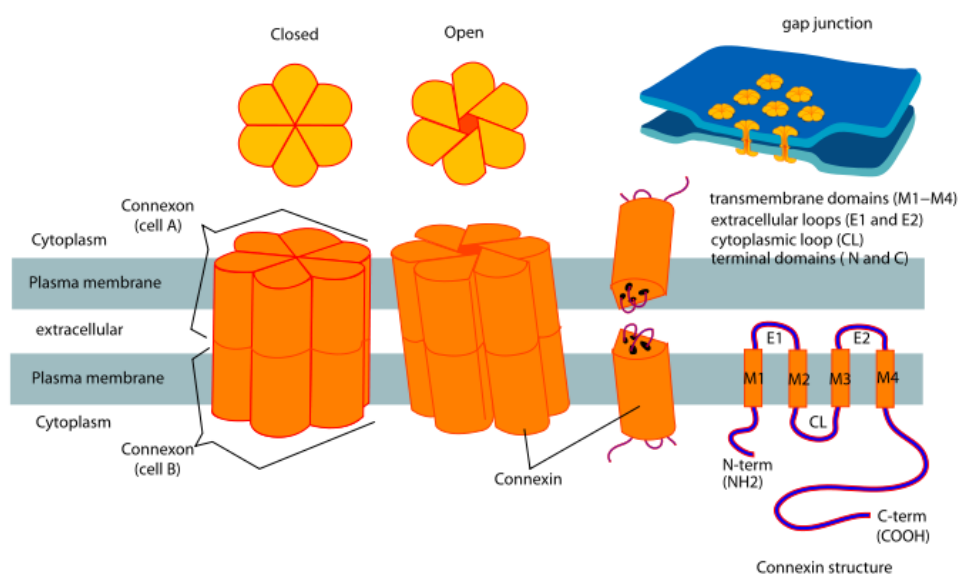
Las integrinas son una familia de glicoproteínas que actúan como receptores de membrana. Algunas integrinas pueden reconocer varios ligandos (fibronectina, vitronectina, colágeno, laminina), otras son específicas para una sola molécula. En el interior celular están ligadas a moléculas del citoesqueleto como la actina o filamentos intermedios como queratinas (Humphries, 2000). Estas integrinas tienen un importante papel en el anclaje de las células a la matriz extracelular, interviniendo en múltiples procesos biológicos como la adhesión y la migración celular y, en menor medida, también participan en las uniones intercelulares (Hynes, 2002). Además, como cualquier otro receptor, también intervienen en la

transducción de señales mediando en procesos como la división, la diferenciación y el crecimiento celular.

Las células suprabasales del epitelio corneal se conocen como **células aladas**, y resultan de la mitosis de las células basales. Presentan formas poligonales diversas y un gran núcleo oval. Se observan en ellas abundantes uniones intercelulares desmosómicas, que son uniones puntuales entre la superficie de dos células contiguas.

Por último, las **células superficiales**, que son células anchas y aplanadas, ocupan los estratos más superficiales. Su citoplasma es escaso en orgánulos y abundante en filamentos intermedios, y el núcleo suele estar disgregado o ausente. La capa celular más superficial contiene característicamente microvesollidades y micropliegues con un glicocalix que permite la adherencia de la capa mucinosa, estabilizando la película lagrimal. Además, las células superficiales presentan abundantes desmosomas y uniones estrechas. Estas últimas, compuestas por proteínas denominadas *claudinas* y *occludinas*, forman un sistema estanco impidiendo el paso de moléculas por los espacios intercelulares.

Las uniones intercelulares tipo gap se encuentran en todos los estratos del epitelio. Estas uniones se componen de conexones (hemicanales), cada uno de ellos formado por 6 moléculas de conexina (Cx), que son proteínas transmembrana, y crean canales para el paso de iones y moléculas hidrofílicas entre dos células contiguas (Figura 6). La familia génica de las conexinas es variada, con 21 miembros identificados en el genoma humano secuenciado.



**Figura 6.** Esquema de unión tipo gap entre dos células contiguas, donde se observa como las conexinas se unen entre sí en grupos de seis para formar los conexones y los conexones se combinan para formar el enlace gap.

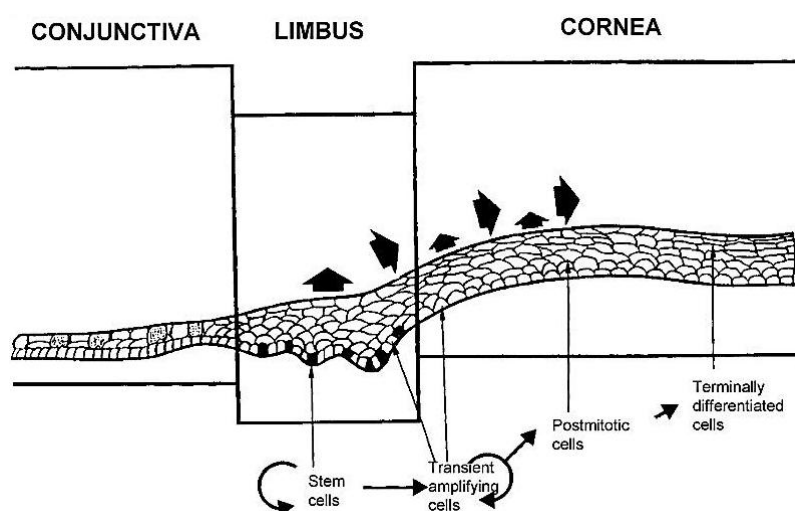
Estas uniones tipo gap, pueden contribuir, mediante el paso de señales a su través, a la regulación de las funciones de las células epiteliales corneales, tales como crecimiento celular, diferenciación, adhesión y migración (Suzuki *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010).

Finalmente, la presencia de esta membrana basal es imprescindible para el mantenimiento de la polaridad de las células epiteliales corneales y además proporciona una matriz para la migración celular, por lo que es de enorme importancia en el proceso de regeneración y cicatrización corneal epitelial.

Todo este delicado entramado celular y extracelular permite mantener una barrera al paso de fluidos desde la lágrima al estroma y protege la córnea de infecciones bacterianas.

### 1.3.1.1. Renovación del epitelio corneal

El epitelio corneal es la única capa de la córnea que está expuesta al ambiente externo, de manera que existe una continua pérdida del mismo mediante descamación de las células superficiales que deberán ser continuamente reemplazadas (Kolli *et al.*, 2009). Se estima un recambio fisiológico de todo el epitelio cada siete días. Para explicar este fenómeno, se requiere la presencia de las células madre del limbo esclerocorneal (Tseng, 1989). Estas células primordiales corneales, localizadas en la capa basal del epitelio limbar, se dividen y diferencian a células amplificadas transitorias, y estas, a su vez a las células basales del epitelio corneal (Figura 7), asegurando su renovación constante. Por ello, estas células primordiales también juegan un papel fundamental en la cicatrización corneal (Tseng & Tsubota, 1997).



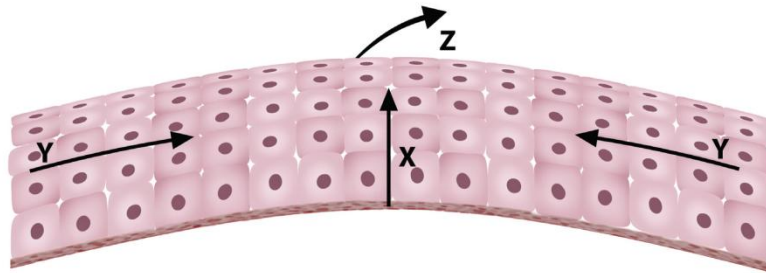
**Figura 7.** Concepto de la localización limbar de las células madre corneales. Las células madre (en negro) se localizan exclusivamente en el epitelio limbar basal.



## Introducción

Existe una hipótesis propuesta por Thoft y Friend (1983) que explica esta renovación del epitelio corneal por medio de tres ejes (Figura 8):

- X: proliferación de células basales.
- Y: proliferación y migración centrípeta de células limbares.
- Z: pérdida de células epiteliales de la superficie corneal.



**Figura 8.** Ilustración esquemática de la hipótesis de Thoft y Friend.

Las células primordiales del epitelio basal del limbo continuarán dividiéndose y sufriendo una migración centrípeta y superficial acompañada de una progresiva diferenciación, marcada por la acumulación en su citoplasma de filamentos intermedios de queratina y la pérdida de su capacidad de multiplicación. La diferenciación de estas células culmina con su recubrimiento por microvellosidades al alcanzar la capa superior. Dichas protuberancias son consideradas relevantes para la adherencia entre el epitelio y la lágrima y en consecuencia, para que ambos puedan formar una unidad ópticamente lisa y uniforme.

Por último, las células superficiales terminan descamándose en la lágrima. Por ello, el mantenimiento del epitelio corneal puede definirse por medio de la ecuación:  $X+Y=Z$ . Lo que representa esta ecuación es que para mantener este epitelio, la pérdida celular debe estar en equilibrio con el reemplazo. En condiciones normales, la exfoliación de las células superficiales ocurre una vez que el estrato subyacente ha establecido uniones intercelulares y las microvellosidades para anclar la película lagrimal.

La córnea tiene características celulares, moleculares y anatómicas únicas, que hacen que la reparación del tejido tenga unas características especiales en relación al mantenimiento de transparencia y forma de la misma. En el apartado de regeneración/reparación corneal se profundizará más en el tema en casos de defecto epitelial.

### 1.3.2. Membrana de Bowman

La membrana de Bowman se define como una capa acelular, fina, muy resistente, formada principalmente por fibras de colágeno tipo IV y laminina. Histológicamente debería representar la capa superficial del estroma corneal, sin embargo se considera una capa independiente del estroma. Esta membrana está presente tan solo en algunas especies animales como el hombre, los primates y algunas aves (Figura 3, Membrana de Bowman). Cabe destacar que no se regenera cuando se daña.

### 1.3.3. Estroma corneal

El estroma corneal constituye el 90% del espesor total de la córnea. Consiste en una matriz extracelular con una estructura peculiar formada por haces densos y regularmente paralelos de colágeno (fundamentalmente de los tipos I y V) que forman laminillas, junto con escasas células estromales (queratocitos) y nervios corneales.

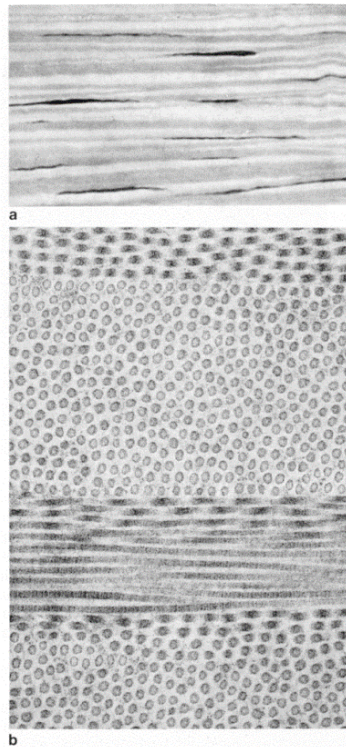
En la matriz extracelular, que representa el 70% del peso de una córnea seca, todas las fibras siguen la misma dirección dentro de cada lámina, pero entre las láminas la orientación es oblicua, presentando tendencia a una orientación vertical y horizontal (Figura 9). El diámetro estrecho de las fibras (entre 30 y 38 nanómetros) es una característica que contribuye a la transparencia y se debe a la proporción de la molécula de colágeno V. Estas fibras están envueltas por unos proteoglicanos que les confieren unas características únicas de retención de agua, hidratando la córnea y favoreciendo su transparencia. Así, la transparencia corneal es atribuible tanto a la relativa homogeneidad de la disposición de las fibras de colágeno (orientación, minúsculo diámetro y escasa distancia interfibrilar) como el escaso tamaño del resto de sus elementos, que es inferior a la mitad de la longitud de onda de la luz visible.

En cuanto se pierde dicha homogeneidad, como sucede en la fibrosis ocular, los rayos de luz incidente sufrirán una dispersión aleatoria y la córnea perderá su transparencia.

El estroma es asimismo el encargado de conferir resistencia a la córnea. Concretamente, en condiciones normales, son las láminas más anteriores las más implicadas en ello, ya que son más cortas y están más entrelazadas entre sí que las laminillas del estroma posterior.

Los queratocitos, componentes celulares principales del estroma, se acomodan entre las láminas y mantienen la estructura al sintetizar proteoglicanos y colágeno. En condiciones normales, tienen una actividad metabólica muy baja, activándose ante un daño corneal, en

cuyo caso, los queratocitos producen unas proteínas con actividad proteasa capaces de digerir el colágeno llamadas metaloproteasas (MMPs).



**Figura 9.** Disposición laminar de las fibras de colágeno corneales. **a)** Microfotografías de la zona central del estroma corneal. Se observan los queratocitos distribuidos entre las laminillas. **b)** Las fibras de colágeno son de tamaño uniforme y regularmente espaciadas. Las fibras están dispuestas paralelamente a la superficie corneal. (58.200X) (Weiss, 1988).

#### 1.3.4. Membrana de Descemet

La membrana de Descemet es la lámina basal del endotelio, y por lo tanto, está situada entre el endotelio y el estroma corneal. Posee un grosor de entre 10 y 15 micras y está compuesta principalmente por fibras de colágeno. Es una capa resistente (la más resistente de la córnea); de hecho, puede permanecer intacta a pesar de ulceraciones corneales graves, por su resistencia a la acción de las enzimas proteolíticas.

#### 1.3.5. Endotelio

El endotelio se define como la monocapa de células hexagonales sin capacidad regenerativa que tapiza la cara interna de la córnea. Al carecer de capacidad de replicación, a medida que su población celular va disminuyendo, las células van elongándose y diseminándose. Su principal misión es actuar de barrera, evitando el paso de agua al estroma corneal y extrayendo agua de forma activa del estroma hacia el humor acuoso

(Figura 3). Mantiene la transparencia corneal regulando una adecuada hidratación (75-80%) mediante el correcto funcionamiento de la bomba ATP-asa de Na/K presente en las células endoteliales.

#### 1.3.6. Capa de Dua

Recientemente se ha descrito una nueva capa en la córnea, la capa de Dua (Dua *et al.*, 2013), que sería la equivalente a la membrana de Bowman pero en la parte más posterior del estroma. Dicha capa de Dua formaría, desde el punto de vista histológico, parte del estroma, como lo debiera formar la capa de Bowman. Sin embargo, la descripción clásica, en la que la capa de Bowman se considera una capa independiente del estroma, genera confusión, puesto que siguiendo el mismo criterio la capa de Dua debería ser una sexta capa de la córnea.

#### 1.3.7. Inervación corneal

La córnea está densamente inervada por fibras nerviosas sensitivas provenientes de la división oftálmica del nervio trigémino o V par craneal, fundamentalmente por vía de los nervios ciliares posteriores largos. Dichas fibras nerviosas, tras formar un plexo anular en el limbo, pierden sus vainas de mielina y penetran radialmente en la córnea a nivel del estroma profundo periférico, cursando anteriormente y anastomosándose a nivel subepitelial. Tras ello atraviesan la membrana de Bowman y siguen una trayectoria anterior que finaliza a nivel de las células aladas, teniendo mayor densidad en los dos tercios centrales de la córnea.

Los neuropéptidos liberados por estas terminaciones nerviosas, como por ejemplo la sustancia P, acetilcolina o el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) (Nishida *et al.*, 1991 y 1996), tienen un papel fundamental en la fisiología del epitelio corneal así como, en la regeneración del tejido después de un trauma, ya que estimulan tanto el trofismo tisular como el reclutamiento de células inflamatorias.

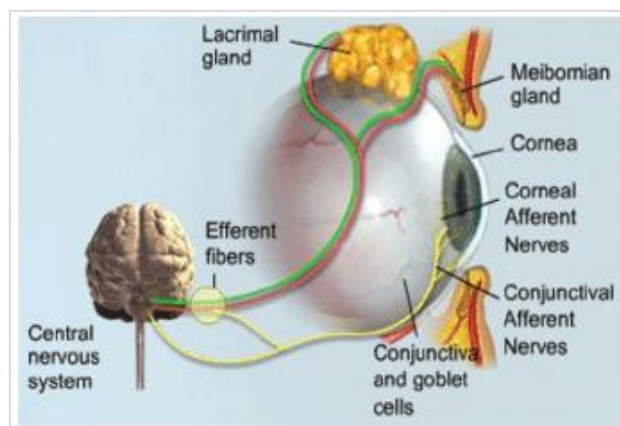
### 1.4. Película lagrimal

La película lagrimal tiene un volumen de 6-9  $\mu$ l, siendo la producción de 1,2  $\mu$ l/minuto, es decir, una renovación del 16% de la lágrima/minuto (Mishima *et al.*, 1966), y está compuesta principalmente por agua (el 98%). Su pH oscila entre 7,2 y 7,6 y su osmolaridad es de 296,5 +/- 9,8 mOsm/L (Versura *et al.*, 2010), aumentando en casos de síndrome de ojo seco u otro

tipo de inflamación de superficie ocular. Es la primera superficie refractiva del ojo, al generar una interfase lisa entre el aire y el epitelio corneal, desempeñando un importante papel en la óptica ocular. Es fundamental para la estabilidad y viabilidad del epitelio corneal y conjuntival, aportándoles oxigenación e hidratación, además de moléculas necesarias para su metabolismo. Por otra parte, actúa como un agente lubricante de la superficie ocular, al disminuir el roce durante el parpadeo y los movimientos oculares, actuando también de barrera física frente a las agresiones (Spínola & Caro, 2015).

La película lagrimal está formada por componentes provenientes de las glándulas lagrimal principal y accesorias, glándulas de Meibomio y células caliciformes de la conjuntiva (Figura 10). Así, una alteración o un déficit secretor a nivel glandular, producirá una modificación cualitativa o cuantitativa en la película lagrimal, pudiendo provocar trastornos severos en el mantenimiento y funcionamiento de la superficie ocular.

La película lagrimal sufre un proceso de renovación que se denomina aclaramiento lagrimal y comprende su producción, evaporación, redistribución por el parpadeo y drenaje. El drenaje se produce a través del aparato excretor o vía lagrimal, que evacua hasta las fosas nasales la lágrima que no se ha evaporado.

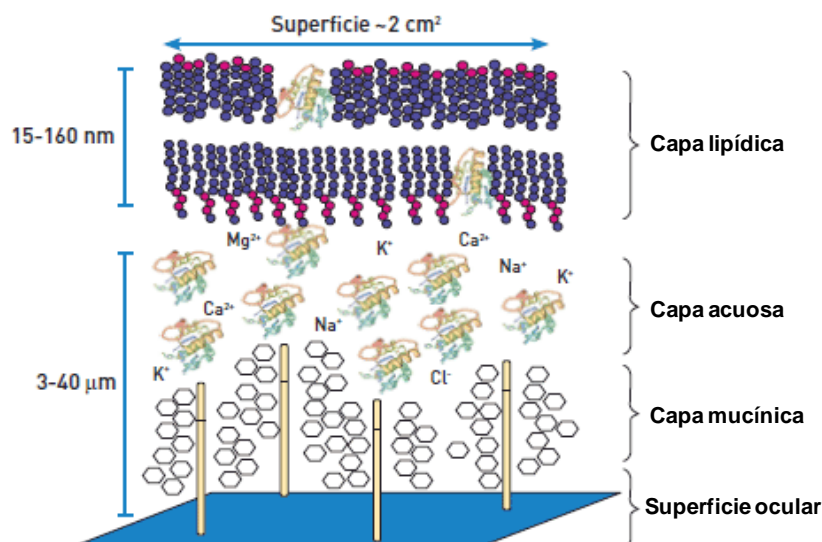


**Figura 10.** Esquema del mecanismo de regulación de la secreción lagrimal, el cual está sometido a un continuo control nervioso.

En la estructura de la película lagrimal se diferencian tres capas distribuidas una sobre otra: capa superficial lipídica, capa intermedia acuosa y capa interna mucínica (Figura 11).

La **capa lipídica** la producen las glándulas de Meibomio (Figura 10), que liberan la secreción por efecto del parpadeo. Está compuesta por una mezcla de lípidos hidrofílicos e hidrofóbicos en estado líquido a la temperatura existente en la superficie ocular, y por proteínas intercaladas. Su función más importante es retardar la evaporación de la película lagrimal, además de proporcionar una superficie de gran calidad óptica.

La **capa acuosa** supone el 95% del grosor total de la película y está segregada por las glándulas lagrimal principal y accesorias. Aparte del efecto fundamental de la humectación, esta capa contiene proteínas, electrolitos, metabolitos y enzimas para las funciones de defensa y mantenimiento de la superficie ocular.



**Figura 11.** Esquema de la estructura de la película lagrimal humana (no está a escala). (Adaptado de <http://www.tearfilm.org>)

Se han identificado más de 1.543 proteínas en la lágrima (Zhou *et al.*, 2012), la mayoría secretadas por el epitelio acinar de la glándula lagrimal. El proteoma de la lágrima varía con la estimulación, la apertura del ojo, la edad y el daño en la superficie ocular (McGill, 1984). Entre las proteínas, además de proteínas estructurales como la albúmina y la fibronectina, se incluyen proteínas asociadas a efectos antimicrobianos como la lactoferrina, lisozima, inmunoglobulina A (IgA) secretada, lipocalina y lipofilina. También contiene proteínas llamadas factores de crecimiento las cuales favorecen la correcta epitelización de la córnea, tanto en situación basal como en situaciones de defecto epitelial (Matsumoto *et al.*, 2004). Actualmente, se considera que las proteínas de la lágrima reflejan el estado de salud de la superficie ocular, debido a que se ha observado que los niveles de algunas de ellas varían en función de las condiciones en que esta se encuentre.

Entre los electrolitos, la película lagrimal contiene  $Cl^-$  y  $K^+$  a concentraciones algo mayores que en el suero. Entre los metabolitos se encuentra la glucosa cuya concentración en lágrima es baja (aproximadamente 25 mg/l). Además, contiene linfocitos y macrófagos con

efecto bacteriostático y bactericida (Geerling *et al.*, 2004), los cuales aumentan en número especialmente cuando el párpado está cerrado.

La **capa interna mucínica** (rica en glicoproteínas) está compuesta por el glicocalix de las microvellosidades de las células superficiales de la córnea y por el mucus (lipoproteínas, glicoproteínas y proteínas) secretado desde las células caliciformes conjuntivales. La mucina es el componente glicoproteico del mucus, y su principal característica es la capacidad de adherirse a moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Esta capa tiene la función de mantener adherida la película lagrimal al epitelio corneal y además es una barrera contra la invasión bacteriana y las células inflamatorias.

Este esquema en tres capas bien diferenciadas está siendo cuestionado en la actualidad (Figura 11). Así, se ha sugerido que las capas de la película lagrimal no están tan claramente delimitadas, pues la mucina parece tener presencia en la porción acuosa, mostrando un gradiente que pudiera influir, de alguna manera, sobre la capa lipídica superficial. Es decir, según esta teoría la película lagrimal se consideraría más un continuo, estando la capa lipídica más anterior que el resto (Guzman-Aranguez & Argüeso, 2010).

## 2. DEFECTO EPITELIAL

### 2.1. Definición y conceptos generales

La salud de la superficie ocular depende de la integridad del epitelio corneal. Con el fin de mantener un epitelio corneal sano, debe existir un equilibrio entre la función de las células madre del limbo, la cantidad y calidad de la lágrima, la anatomía y el funcionamiento de los párpados y la inervación corneal (Tseng & Tsubota., 1997). Cualquier alteración en alguno de estos elementos puede dar lugar a un defecto del epitelio corneal.

Las heridas corneales pueden ser debidas a mecanismos directos o indirectos. Cuando se habla de mecanismos directos se hace referencia a mecanismos físicos (mecánicos, térmicos, eléctricos, radiación o fotónicos), químicos (PH, osmolaridad), infecciosos, (vírico, micótico, bacteriano, parasitario) e inflamatorios (alérgico, inmune). Los mecanismos indirectos suponen alteraciones isquémicas, metabólicas (diabetes, insuficiencia renal, estrés), tróficas (denervación, sequedad, exposición), o distróficas, que son inducidas por enfermedades de la córnea debidas a una disfunción celular o metabólica (estrés subepitelial, anormalidad de la membrana basal) e hidrostáticas (insuficiencia endotelial).

Ante la disrupción del entorno fisiológico de la superficie corneal y una pérdida de su integridad epitelial, ya sea causada por traumatismos o enfermedades mantenidas en el

tiempo, la superficie corneal dañada demanda, entre otros factores, péptidos epiteliotróficos, vitaminas y neuropéptidos, suministrados en condiciones normales por una película lagrimal íntegra (Geerling *et al.*, 2004). En este sentido, la película lagrimal juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos de la superficie ocular. Ésta proporciona humedad, nutrientes, efectos antimicrobianos, así como capacidad epiteliotrófica y neurotrófica (Klenkler *et al.*, 2007). Una disminución o la falta de producción de la película lagrimal puede causar daño a los tejidos de la superficie ocular y puede conducir a trastornos graves oculares, incluyendo el ojo seco, defectos epiteliales persistentes o úlceras corneales (Wilson *et al.*, 1999; Barton *et al.*, 1998; Pflugfelder *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2003).

En la superficie ocular, sobre todo a nivel corneal, encontramos complejos sistemas de reparación que son el resultado del importante nivel de organización y diferenciación de estos tejidos. Los mecanismos de reparación se activan de forma inmediata tras la agresión y tienen como misión la reepitelización de la córnea, así como la correcta restauración de su estructura y organización. Igualmente, su cierre en el menor tiempo posible es de crucial importancia, ya que la falta de una reconstitución epitelial completa y una débil barrera epitelial pueden ser el primer paso hacia el desarrollo de una úlcera corneal estromal.

La úlcera corneal puede consistir en un defecto epitelial, en pérdida del estroma, en inflamación estromal o en cualquier combinación de todas ellas (Bengoia, 2003). Cuando ocurre una respuesta inapropiada de reparación del epitelio corneal con incapacidad por parte del ojo para cerrar una herida epitelial, estamos ante un defecto epitelial persistente (DEP). Algunos autores lo definen como la situación en la que el epitelio no consigue cubrir una lesión epitelial de más de 2 mm de diámetro y más de dos semanas de duración usando los tratamientos convencionales (Tsubota *et al.*, 1999 b; López García *et al.*, 2007).

En la incapacidad de reepitelización pueden estar implicados diversos mecanismos, como pueden ser la escasez o ausencia de los componentes esenciales de la lágrima para la regeneración epitelial, como sucede en los DEPs asociados al ojo seco; la depleción de neuropéptidos como la sustancia P y la acetilcolina, como sucede en los DEPs de origen neurotrófico, o en otros casos, la disminución de la actividad de las células progenitoras limbares, como ocurre en los DEPs asociados a insuficiencia límbica (Tsubota *et al.*, 1999 b; Krachmer *et al.*, 2010). No es infrecuente la coexistencia de varios mecanismos fisiopatológicos en un mismo DEP. Además, otros factores que pueden ser responsables de la persistencia de estos DEPs son las heridas extensas epiteliales, particularmente cuando afectan a las células del limbo, cicatrices estromales, inflamaciones crónicas o infecciones de la superficie ocular, hipoestesia o anestesia, defectos anatómicos o de la motilidad de los



párpados, distrofias corneales, cirugías oculares, malnutrición (déficit de vitamina A entre otros), enfermedades metabólicas (diabetes), etc. También, el uso crónico de medicamentos tópicos (fármacos epiteliotóxicos), particularmente aquellos que contienen conservantes, puede ser responsable de muchos casos de DEPs observados en la práctica clínica. En el caso de pérdida de la sensibilidad, ésta favorece una rotura en la integridad del epitelio corneal. Así, se ha demostrado *in vivo* que los anestésicos tópicos impiden la migración del epitelio corneal (Bisla & Tanelian, 1992). De hecho, una de las causas principales del defecto epitelial persistente es la reducción de la sensibilidad corneal producida por diferentes causas (herpes, diabetes, traumatismos quirúrgicos, tumores, etc.). En caso de denervación trigeminal se produce una importante reducción de sustancia P en la córnea, provocando una alteración de la transmisión del dolor y produciendo un fenómeno de desensibilización al dolor, además de cambios degenerativos en el tejido corneal.

Todas estas patologías nombradas, que predisponen al ojo para que se den los DEPs, tienen en común un deterioro del epitelio e incapacidad para su reparación. Así, en los DEPs además de la alteración de la proliferación y migración de las células epiteliales corneales, se ha observado que se produce una reepitelización aberrante e inestable, lo que se ha asociado a una desregulación del sistema activador del plasminógeno/plasmina (Tervo *et al.*, 1989). Los DEPs, independientemente de su causa, cursan con una permanencia prolongada de la plasmina libre en la superficie ocular, favoreciendo adhesiones frágiles e induciendo la reducción y debilidad de los complejos de unión entre el epitelio corneal y la fibronectina de la matriz extracelular, contribuyendo a la persistencia del defecto epitelial (Berman, 1989). Asimismo, la plasmina libre es un quimiotáctico para leucocitos, los cuales producen ciertas MPPs con actividad colagenasa, favoreciendo el “*melting*” o reblandecimiento del estroma corneal. Por tanto, los DEP, pueden progresar al estroma anterior y producir una subsecuente úlcera estromal por degradación proteolítica de colágeno estromal y de la matriz extracelular. La pérdida prolongada de la barrera epitelial puede provocar una edematización y exposición del estroma subyacente a la acción de agentes externos, como microorganismos y tóxicos, entre los que se incluyen los fármacos tópicos empleados habitualmente en su tratamiento. Como resultado, se produce una perpetuación y complicación del curso del defecto epitelial.

## **2.2. Reparación y regeneración corneal**

El principal objetivo de los procesos de reparación y de regeneración corneal es recuperar las propiedades anatómicas y funcionales del tejido lo más rápido y de la mejor manera posible, restableciendo su función primaria de barrera, además de sus capacidades ópticas.

La *reparación* de un tejido ante una agresión o pérdida tisular consiste en la restauración de dicho tejido con la aparición de una cicatriz, es decir, sin que éste recupere su arquitectura original, sus propiedades mecánicas, ni tampoco su función (Beca *et al.*, 2007). Los procesos que se producen durante la cicatrización corneal, son en realidad una variación patológica del proceso fisiológico de renovación del epitelio. Sin embargo, se habla de *regeneración* cuando tras la restauración, dicho tejido posee propiedades indistinguibles del tejido original. Así, el interés en la práctica clínica radica en regenerar, es decir, reconstruir la forma y restaurar la función del tejido original. En el caso de la córnea, sólo el epitelio es capaz de llevar a cabo una regeneración completa. De este modo, cualquier lesión que afecte a las capas inferiores a él, será reparada dejando una cicatriz, es decir un tejido desestructurado y que además de no tener las propiedades tensiles y refractivas de la córnea sana, producirá una opacidad focal que puede llegar a comprometer la visión. Por lo tanto, la respuesta del tejido al daño cambia dependiendo de la incisión de la herida (Eraslan & Toker, 2009). Si la herida no afecta a la membrana basal, en condiciones normales, se producirá una restauración de las estructuras normales. Sin embargo, cuando las heridas son más profundas o extensas y afectan también al estroma, se ponen en marcha otros mecanismos específicos más complejos.

Cuando se produce una lesión corneal, se inicia una cascada de eventos para reparar la zona afectada y restaurar la visión, caracterizada por diferentes fases. Así, tras una primera fase de estabilización de la herida, se produce una fase reparativa en la que primarán la migración celular, la proliferación celular y la producción de matriz extracelular. De este modo, las células epiteliales adyacentes a la herida migran hacia el defecto epitelial y se produce una mayor activación de las células madre epiteliales limbares, con intención de rellenar el defecto lo antes posible. De hecho, la restauración de la barrera corneal es necesaria para la protección contra elementos extraños, para permitir la hidratación normal y la nutrición de los tejidos, así como también el mantenimiento del balance osmótico, metabólico y del intercambio térmico. También los queratocitos estromales están fuertemente implicados en el proceso la reparación corneal. Además, estos procesos, los cuales ocurren simultáneamente y se describen esquemáticamente en la figura 12 (Klenkler *et al.*, 2004; Eraslan & Toker, 2009), están regulados por combinaciones de factores de crecimiento y citocinas. Por último, se produce una fase de remodelación o regeneración en la que tendrá lugar una diferenciación y organización del nuevo tejido creado hasta alcanzar, en condiciones ideales, las características del tejido original.



**Figura 12.** Esquema que indica la cascada de eventos en orden cronológico que ocurren en el proceso de reparación corneal (Adaptado de Klenkler *et al.*, 2004 y Eraslan & Toker, 2009).

Esta regeneración del epitelio corneal es el resultado de una cascada compleja de eventos que implica interacciones mediadas fundamentalmente por la acción de MMPs, factores de crecimiento y citocinas entre las células epiteliales, los queratocitos del estroma, nervios corneales, glándulas lagrimales, película lagrimal y células del sistema inmune (Eraslan & Toker, 2009). Para entender el proceso de la regeneración corneal se debe tener en cuenta que la córnea es avascular y transparente, los cuales son dos aspectos específicos que no se dan en otros tejidos.

Al producirse la lesión epitelial corneal, las células del epitelio dañado y la membrana basal epitelial de la zona lesionada, desencadenan una intensa actividad bioquímica en el área dañada y sus alrededores liberando factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) o el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y otras citocinas desde el epitelio dañado (Eraslan & Toker, 2009). Esta actividad tiene como finalidad la reorganización celular y la consecución de una serie de cambios morfológicos y funcionales por parte de las células epiteliales corneales sanas. Además, tras el daño epitelial se eliminan los restos celulares del área de la lesión. A las pocas horas de que se produzca la herida corneal, ya sea epitelial pura o epitelial y estromal, los queratocitos adyacentes a la herida sufren apoptosis/necrosis creando una zona acelular, proceso regulado por las citocinas liberadas desde el epitelio dañado.

Como consecuencia del daño epitelial también se produce una liberación de citocinas en lágrima, entre las que destacan la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que median la inducción de la migración celular y acciones proapoptóticas. Las citocinas y sus receptores son expresadas por las células corneales tras una agresión, aunque su liberación deriva mayoritariamente de las células inflamatorias. Igualmente, los factores de crecimiento (EGF, PDGF, etc.) actúan como señales cuya transducción provoca cambios en la forma y la función de las células epiteliales (Hirakata *et al.*, 1993). Así, las células epiteliales próximas a la lesión se redondean y reducen los hemidesmosomas para facilitar la migración celular. Tras ello, se inicia el cierre epitelial, gracias a la migración del epitelio adyacente a la herida, hasta que las células repobladoras entran en contacto físico con las células epiteliales corneales de los restantes márgenes de la herida, provocando una inhibición de la migración por contacto. Durante el cierre de la herida, también se produce, aparte de la migración celular, un aumento de la proliferación celular de las células madre del limbo esclerocorneal. En esta fase de la reparación, la profundidad de la lesión influye en las reacciones inmediatas que se ponen en marcha. Si la herida corneal es superficial, y no afecta a la membrana basal del epitelio, éste va a migrar de forma inmediata sobre el epitelio residual, restableciendo la función de barrera muy rápidamente. Los hemidesmosomas y otras uniones intercelulares se restablecen, y la

monocapa celular evoluciona a un epitelio pluriestratificado por la actividad mitótica de las células basales de la periferia de la lesión. Sin embargo, si la herida corneal afecta más allá de la membrana basal del epitelio, la oclusión de la herida se llevará a cabo por una matriz provisional de fibronectina/fibrina. Esta matriz permitirá que el epitelio migre y se recupere el efecto barrera, al quedar cubierta la lesión (Buck, 1979). Así, la fibronectina tiene un papel fundamental en esta fase de migración (Nishida *et al.*, 1992; Gordon *et al.*, 1995). Se ha descrito que la fibronectina, proviene tanto de las células epiteliales corneales y queratocitos estromales como vehiculizada a través de la lágrima por la vascularización conjuntival, aumenta su concentración en la fase aguda de los defectos epiteliales y estromales (Cai *et al.*, 1993).

La adhesión de las células epiteliales a la fibronectina se da a través de las proteínas transmembrana integrinas. Tras una herida corneal, disminuye la expresión de las proteínas transmembrana integrinas, para favorecer la pérdida de adhesión de las células del epitelio corneal durante la migración, y posteriormente aumentar su expresión favoreciendo la adhesión con la fibronectina. La expresión de integrinas por las células epiteliales está regulada por las propias células del epitelio corneal, mediante la citocina proinflamatoria IL-6 y el EGF (Soong *et al.*, 1989). También, la secreción de activador tisular de plasminógeno y proteasas séricas ayudan a liberar a las células de su adhesión basal, permitiéndoles la migración. Al acabar el proceso de reparación celular, la fibronectina se reabsorbe controlada por el sistema plasmina/plasminógeno, facilitando la progresión del frente de migración de las células. Por otro lado, durante el proceso migratorio de células epiteliales, se sintetiza hialuronato, que es un componente de la matriz extracelular no presente en una córnea sana. Se ha descrito que el hialuronato es el único glicosaminglicano que estimula la migración celular *in vitro* de las células de epitelio corneal. Incluso, la administración de gotas con ácido hialurónico ha demostrado favorecer el cierre del epitelio corneal en conejos (Nakamura *et al.*, 1992).

A las pocas horas de que se produzca la herida los queratocitos contiguos al área acelular, empiezan a activarse (aumentan su tamaño y contenido en los orgánulos). Así, la apoptosis inicial de los queratocitos subepiteliales es seguida de la migración postero-anterior y proliferación de queratocitos más profundos. Esta migración se activa por PDGF (Jester *et al.*, 1997). Los queratocitos adoptan una morfología que sugiere su diferenciación a células con aspecto fusiforme típico de fibroblastos (Fini & Stramer, 2005), son en realidad miofibroblastos. Estos expresan alfa-actina de músculo liso, que tienen capacidad contráctil y de motilidad (Stramer *et al.*, 2003). El proceso de diferenciación a miofibroblastos está mediado por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el cual es un estimulador potente del proceso de cicatrización a nivel ocular (Zhang & Akhtar, 1997). También, dichos

queratocitos/miofibroblastos inician una producción de citocinas (factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento de queratocitos (KGF), TGF- $\beta$ ), que activan genes que codifican componentes de la matriz extracelular (fibronectina, MMPs, moléculas de adhesión) y la desactivación de genes que codifican moléculas que mantienen la transparencia corneal (cristalinas corneales) (Fini & Stramer, 2005). Todo ello provoca una alta producción de matriz extracelular, alta hiper celularidad estromal y contracción tisular, lo que puede provocar opacidad tisular de la córnea o “haze”, siendo éste uno de los mayores problemas de la cicatrización corneal. Esta opacificación corneal solo revertirá en parte, y la cicatriz corneal nunca adquirirá la fuerza tensil original, por lo que las características de la nueva matriz extracelular formada serán diferentes a las fisiológicas.

Simultáneamente o inmediatamente después a la diferenciación de queratocitos a miofibroblastos, es decir unas horas después de la aparición de la herida, se da una infiltración de células inflamatorias en la capa de fibrina/fibronectina. La función de estas células inflamatorias consiste en eliminar los residuos de las células apoptóticas (Wilson *et al.*, 2001) e inducir la producción de PDGF, el cual es uno de los mediadores del proceso de reparación (Li & Tseng, 1997). Si se restablece la integridad del epitelio, los leucocitos desaparecen en 48 horas. Si esto no ocurre, estas células permanecerán en la herida, contribuyendo a la digestión enzimática y remodelación del estroma desnudo. En este punto del proceso hay una alta producción de colagenasas y otras MMPs que inducen una remodelación estromal. Las MMPs son una familia de enzimas proteolíticas degradantes de la matriz extracelular y membranas basales que juegan un papel muy importante en esta fase. La expresión de MMPs es muy baja en la córnea normal, sin embargo su presencia aumenta durante los procesos de lesión, cicatrización e inflamación. De hecho, aumentan mucho entre la semana uno y cuatro tras el traumatismo, disminuyendo rápidamente las siguientes cuatro semanas y finalmente manteniéndose más altas de la normalidad durante meses (Fini & Stramer, 2005). Esta actividad de las MMPs está estrechamente regulada por inhibidores tisulares específicos de las MMPs, para impedir la destrucción tisular excesiva.

En la fase de proliferación celular, las células primordiales del limbo, activadas como consecuencia del daño, proliferan y se diferencian a células epiteliales progresivamente más diferenciadas, estableciéndose la estratificación del epitelio normal. Además se desarrollan los complejos de unión entre las células epiteliales y la membrana basal, y se restablecen las terminaciones nerviosas (Durán, 1998; Arffa & Grayson, 2006). El EGF, el cual está presente en la lágrima en condiciones fisiológicas, actúa sobre la proliferación de las células epiteliales (Hanna *et al.*, 1989). La proliferación epitelial también se encuentra influenciada por el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y  $\beta$  entre otros.

Después, se aprecia una apoptosis de los miofibroblastos, e incluso, se ha descrito una transdiferenciación de los miofibroblastos, aunque este punto está en entredicho. Para finalizar la reparación corneal, se induce una apoptosis de células inflamatorias y el retorno de los queratocitos a su estado normal.

Por lo tanto, durante estas primeras fases de la reparación de la herida, se recupera la función corneal mecánica y de barrera, quedando como propósito para la última fase la recuperación de la capacidad óptica y resistencia mecánica. Así, finalmente, existe una fase de remodelación regenerativa de la cicatriz corneal, la cual puede tener una duración mayor de dos años, y en la que se produce la remodelación de la matriz por las MMPs, la regresión de los queratocitos a su estado basal quiescente e hiposecretor y la restitución de la adherencia normal de las estructuras del epitelio. El objetivo de esta fase consiste en la mejoría de la transparencia corneal, debido al restablecimiento del paralelismo de las fibras estromales de colágeno y a la distribución de las capas de modo ortogonal, las unas respecto a las adyacentes (Cintron *et al.*, 1978). Seguramente, el requerimiento de esta organización estructural tan precisa sea la causa de que el remodelamiento homeostático del estroma corneal, (tanto en cuanto a fibras como en cuanto a queratocitos) tenga ciclos tan lentos comparados con la piel. En la actualidad la regeneración del estroma corneal continúa siendo un importante reto y se da solo la reparación del tejido, no la regeneración.

### **2.3. Tratamientos del defecto epitelial**

Existen diversas alternativas terapéuticas que pueden facilitar la reparación epitelial. Según la fase del proceso, el planteamiento terapéutico es variable. Ante un defecto epitelial persistente debemos eliminar la toxicidad medicamentosa, estabilizar la lágrima, proteger la córnea de microtraumas, reducir la inflamación y estimular el cierre epitelial. El control de la inflamación, la protección externa y la mejoría de la humectación son medidas que favorecen la reparación y regeneración en el cierre del defecto epitelial. Por ello, las estrategias terapéuticas frente a 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 son los conservantes u otros productos, que a corto o largo plazo puedan inducir toxicidad en una superficie ocular muy vulnerable. Estas terapias han de ser eficaces en la reducción de la sintomatología y la prevención de las complicaciones tardías, con poca o nula respuesta alérgica, sin efectos secundarios y sin alterar la homeostasis del ojo.

Son muchos los tratamientos que se han descrito para la resolución de los defectos epiteliales persistentes. Entre ellos existen tratamientos habituales, como los lubricantes

oculares y antibióticos tópicos. También, existen otros métodos encaminados a mejorar el tropismo de la superficie ocular, como el uso de lentes de contacto terapéuticas (Rosenthal *et al.*, 2000), o bien métodos quirúrgicos, como son la tarsorrafia lateral (Panda *et al.*, 1999), los tapones lagrimales (Seitz *et al.*, 2005) y el trasplante de membrana amniótica (Kruse *et al.*, 1999). Incluso, algunos autores han recurrido a distintos procedimientos quirúrgicos para conseguir estimular la producción de lágrimas (Geerling *et al.*, 1998), sin embargo son técnicas quirúrgicas complejas con frecuentes complicaciones asociadas.

Por otra parte, muchos factores de crecimiento y citocinas recombinantes han sido utilizados para tratar lesiones de la córnea, debido a su importante papel en el proceso de la reparación tisular corneal (Klenkler & Sheardown, 2004; Steed, 2006). Así, se han utilizado tratamientos basados en la aplicación de moléculas específicas como pueden ser el colirio de factor de crecimiento nervioso (NGF) (Lambiase *et al.*, 1998), el colirio de EGF (Kandarakis *et al.*, 1984; Pastor & Calonge, 1992), el colirio de FGF (Tripathi *et al.*, 1990), el colirio de PDGF (Murali *et al.*, 1994) y el colirio de sustancia P junto con el IGF-1 (Yamada *et al.*, 2008). Sin embargo, la combinación de estos y otros factores podría ofrecer una mejor respuesta terapéutica (Slater *et al.*, 1995), aunque se carece de experiencia suficiente con ellos en humanos. Un enfoque alternativo para conseguir un *cocktail* de estos factores de crecimiento, es el uso de productos derivados de la sangre del propio paciente para inducir la regeneración del tejido (Anitua, 1999; Tsubota *et al.*, 1999 b; Sánchez *et al.*, 2003; López-Plandolit *et al.*, 2010). En este contexto se han empezado a utilizar algunos hemoderivados autólogos en forma de colirio (los veremos más detalladamente en el capítulo 4, ya que constituyen una parte fundamental de esta tesis), por sus características semejantes a la lágrima, y porque contienen factores tróficos esenciales para la córnea. La táctica terapéutica de los derivados hemáticos se basa en la modulación y aceleración de los procesos cicatriciales a través de los factores de crecimiento y otras proteínas bioactivas procedentes de las plaquetas (Beca *et al.*, 2007). Basándose en esto, y en la posibilidad de obtener un número elevado de plaquetas de sangre periférica, se han ido desarrollando terapias regeneradoras que emplean concentrados de plaquetas (Anitua *et al.*, 2006).

### **3. LAS PLAQUETAS EN LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN TISULAR**

#### **3.1. Fisiología de la plaqueta**

Las plaquetas son pequeños fragmentos citoplasmáticos anucleados limitados por membrana, que se obtienen por fragmentación de megacariocitos en la médula ósea. Se forman y liberan hacia la sangre de forma continua, y su ciclo vital en el torrente sanguíneo es de 7 a 10 días. Se considera normal un número de plaquetas de 150.000-350.000/ $\mu$ l. La



plaqueta inactiva tiene forma discoide, con un tamaño que oscila entre 1,5 y 3,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen la mayoría de los orgánulos citoplasmáticos que se observan en otras células.

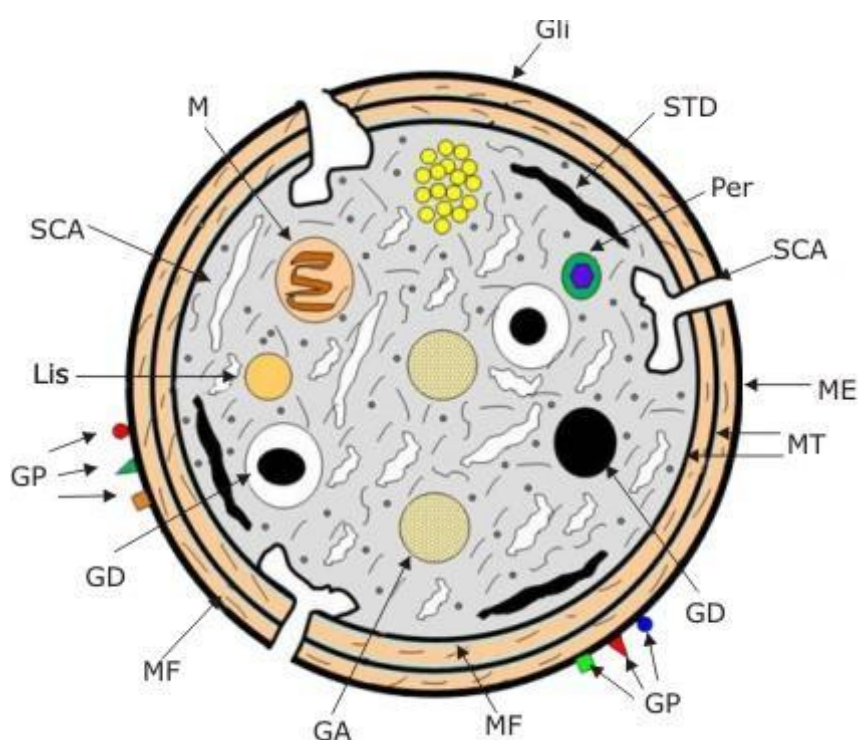
La polivalencia funcional de las plaquetas deriva de su complejidad estructural y riqueza bioquímica, las cuales lejos de mantenerse estáticas desde su origen en la medula ósea, van aumentando gradualmente a lo largo de sus 7-10 días de vida media, mediante la incorporación por endocitosis de diversas sustancias del torrente circulatorio (Monteiro *et al.*, 2001).

Así, aunque seguimos considerando que su función fundamental es la hemostática, conocemos la importancia de su papel en la reparación y regeneración tisular y en fenómenos detoxificantes, quimiotácticos e inmunológicos.

Desde el punto de vista estructural, la plaqueta puede dividirse en cuatro zonas según su organización y función. La zona periférica, que consiste en la membrana celular cubierta por el glucocáliz, en la cual las glucoproteínas integrales de la membrana actúan como receptores para la función plaquetaria. La zona estructural, que está compuesta por microtúbulos, filamentos de actina, miosina y proteínas fijadoras de actina que forman una red de sostén para la membrana plasmática. La zona membranosa, compuesta por dos tipos de canales membranosos que se fusionan en diversas regiones de la plaqueta para formar complejos que tienen importancia en la regulación de la concentración intraplaquetaria de calcio (Ross & Pawlina, 2013). Por último, la zona de orgánulos, la cual ocupa el centro de la plaqueta y contiene mitocondrias, peroxisomas, gránulos de glucógeno y distintas vesículas o gránulos de secreción, dispersos en el citoplasma. Dentro de estos gránulos se diferencian tres tipos. Los más abundantes son los *gránulos alfa*, que contienen principalmente fibrinógeno, factores de coagulación, plasminógeno, inhibidor del activador del plasminógeno y factores de crecimiento, algunos de los cuales son específicos de las plaquetas y otros endocitados desde el torrente sanguíneo. Su contenido desempeña un papel importante en la fase inicial de la reparación celular, la coagulación sanguínea y la agregación plaquetaria. Los *gránulos densos*, menos significativos y más pequeños, contienen principalmente adenosín difosfato (ADP), adenosín trifosfato (ATP), serotonina e histamina, que facilitan la adhesión plaquetaria y la vasoconstricción (Klinger *et al.*, 1996). Y los *gránulos delta*, que contienen enzimas hidrolíticas que actúan en la reabsorción del coágulo durante las etapas avanzadas de la reparación tisular. Además, a medida que una plaqueta va envejeciendo, aumenta proporcionalmente su contenido en proteínas.

Mediante estudios de proteómica se ha demostrado que las plaquetas liberan cientos de proteínas bioactivas con gran versatilidad funcional. De este modo, aunque las plaquetas

originalmente se asociaron con los procesos de trombosis y hemostasia, dirigidos a controlar las hemorragias, cada vez se da más importancia a las proteínas de origen plaquetario en inflamación, capacidad antimicrobiana, reparación tisular, angiogénesis y malignización celular (Blair & Flaumenhaft, 2009).



**Figura 13.** Esquema de la ultraestructura de una plaqueta. GA: gránulo *alfa*; GD: gránulo denso; Gli: glucocáliz; GP: glicoproteínas; Lis: lisosoma; M: mitocondria; MF: microfilamento; MT: microtúbulos; ME: membrana externa; Per: peroxisoma; SCA: sistema canicular abierto; STD: sistema tubular denso. (Adaptado de Fernández-Delgado *et al.*, 2012)

La plaqueta permanece inactiva hasta que un ligando fisiológico (ADP, trombina, factor activador de plaquetas, colágeno o adrenalina) interactúa con los receptores agonistas de la membrana celular (Furie & Furie, 2006). La activación de las plaquetas conlleva una serie de modificaciones que afectan tanto a la morfología como a la funcionalidad de las mismas. Desde un punto de vista morfológico, las plaquetas pierden su configuración discoide habitual y emiten pseudópodos por la activación del sistema contráctil del citoesqueleto. A nivel funcional, los gránulos alfa se fusionan con la membrana plasmática (Reed *et al.*, 2000), aumentando la superficie de la membrana de la plaqueta de 2 a 4 veces, y descargando su contenido al espacio extracelular. La exocitosis de la plaqueta contribuye a una activación plaquetaria en cadena, a su adhesión y agregación, así como al reclutamiento de otras plaquetas, células inflamatorias y fibroblastos. La activación y

agregación plaquetaria son procesos dependientes de calcio que requieren gran cantidad de energía.

La agregación plaquetaria provoca la formación de un tapón hemostático primario. El glucocáliz plaquetario provee una superficie de reacción para la conversión del fibrinógeno soluble en fibrina, que estabiliza el tapón inicial. Al mismo tiempo, las plaquetas activadas liberan gradualmente el contenido de sus gránulos alfa y densos, contribuyendo a la formación de un tapón hemostático o coágulo definitivo. Una vez formado el coágulo definitivo, las plaquetas causan la retracción y fibrinólisis del mismo, siendo este lisado por la plasmina, una enzima fibrolítica que circula en el plasma en forma inactiva (plasminógeno) y cuyo activador es el activador de plasminógeno tisular (Nurden *et al.*, 2008).

Además, las plaquetas también están implicadas en la angiogénesis (Kisucka *et al.*, 2006), ya que contienen factores pro- y anti-angiogénicos; en la inflamación (May *et al.*, 2008), liberando sustancias quimiotácticas que facilitan el reclutamiento de células inflamatorias o liberando factores proinflamatorios; en la metástasis tumoral (Gay & Felding-Habermann, 2011), pudiendo las células tumorales causar agregación de plaquetas, mediante la expresión de actividad coagulante y generación de trombina o liberación de ADP (Heinmöller *et al.*, 1996); y además, poseen efecto antimicrobiano, (Klinger & Jelkmann, 2002) interactuando directamente con virus, bacterias, hongos y protozoos.

### **3.2. Factores de crecimiento**

El buen funcionamiento y la interrelación de las células diferenciadas dentro de los tejidos precisa de la existencia de unas señales de comunicación intercelular, que incluyen una gran variedad de proteínas como las citocinas, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores. Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias, mayoritariamente de naturaleza proteica, que estimulan un receptor celular específico, y afectan a funciones celulares como la migración, proliferación y diferenciación celular durante el crecimiento y desarrollo del tejido (Yao & Eriksson, 2000). Además, estos factores juegan un papel importante en la reparación y regeneración tisular, de ahí su importancia en la medicina regenerativa (Piccin *et al.*, 2016).

En este sentido, se sabe que las plaquetas son las iniciadoras universales de casi todos los procesos de reparación tisular, pues al activarse liberan desde sus gránulos gran cantidad de factores de crecimiento que inducen la proliferación celular, favorecen la angiogénesis y la quimiotaxis de otras células al lugar de la lesión.

El efecto de estos factores de crecimiento es multifuncional, dependiendo de la célula diana sobre la que actúen, de su estado fisiológico, de su relación con otras células y con la matriz extracelular y de la presencia de otros factores de crecimiento (Klenkler & Sheardown, 2004). La mayoría de los factores actúan a nivel local, pero también pueden actuar a distancia. Según su especificidad celular, podemos diferenciar entre factores selectivos, actuando sobre células muy específicas, y factores poco selectivos, como el EGF y el PDGF que actúan sobre una gran variedad de células.

Los receptores a través de los que actúan los factores de crecimiento, son proteínas o glicoproteínas, localizadas en la membrana plasmática. Cuando un factor de crecimiento se une al dominio externo del receptor, desencadena en el dominio intracelular una reacción secuenciada de respuestas intracelulares, la transducción de la señal, que va a culminar con la producción de nuevos factores de crecimiento, de receptores para dichos factores y de proteínas que controlan la entrada en el ciclo celular. La intensidad del efecto de los factores de crecimiento sobre una célula va a depender de su concentración, de la cantidad de receptores presentes en la membrana celular, de la existencia de otras moléculas que interfieran con la unión ligando-receptor, de la vida media del complejo ligando-receptor y de la disponibilidad intracelular de segundos mensajeros activados. Las propias células pueden modificar la sensibilidad del receptor y su número.

### **3.2.1. Factores de crecimiento y su relevancia en el cierre de heridas corneales**

Los factores de crecimientos presentes en la lágrima son esenciales en el mantenimiento y renovación del epitelio corneal, así como para prevenir reacciones inmunes o angiogénicas indeseables (Rolando & Zhierut, 2001). Dichos factores de crecimiento, algunos de los cuales se comentan más adelante (Tabla 1), a través de un complejo mecanismo de interrelación, facilitan la cicatrización y regeneración corneal mediante la proliferación del epitelio corneal y de las células del estroma, así como mediante la formación de la matriz extracelular. Una alteración en este equilibrio de factores de crecimiento puede producir distintas patologías corneales, incluyendo edema, glaucoma o neovascularización. Debido a las características anatómicas, histológicas, celulares y moleculares únicas de la córnea, la reparación y regeneración del tejido requiere que se preserve en lo posible la transparencia y forma de la misma.

**Tabla 1:** Características más importantes de los principales factores de crecimiento que actúan a nivel de la superficie ocular.

	<b>Acciones a nivel de la superficie ocular</b>	<b>Concentración en lágrima normal</b>
<b>EGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorece la proliferación y migración de células epiteliales y fibroblastos.</li> <li>- Aumenta la síntesis de fibronectina.</li> </ul>	0,2-9,7 ng/ml (Ohashi <i>et al.</i> , 1989; Geerling <i>et al.</i> , 2004)
<b>FGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorece la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la reparación tisular.</li> <li>- Favorece la síntesis y contracción de la matriz extracelular.</li> <li>- Favorece la migración de los queratocitos.</li> </ul>	No se detecta habitualmente (Schechter <i>et al.</i> , 2000)
<b>VEGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Induce la proliferación y migración de células endoteliales (efecto angiogénico).</li> </ul>	19 ng/ml (Vesaluoma <i>et al.</i> , 1997)
<b>HGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorece la proliferación y migración de células epiteliales.</li> <li>- Inhibe la diferenciación terminal de células epiteliales.</li> </ul>	0,2-0,5 ng/ml (Li <i>et al.</i> , 1996; Tervo <i>et al.</i> , 1997)
<b>PDGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorece la migración y proliferación de fibroblastos y células inflamatorias, así como la producción de fibronectina.</li> <li>- Favorece la migración de células epiteliales en presencia de fibronectina.</li> <li>- Induce la migración de células endoteliales corneales.</li> </ul>	0,09-1,7 ng/ml (Vesaluoma <i>et al.</i> , 1997)
<b>Fibronectina</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Favorece la migración de células epiteliales en los procesos de reparación corneal.</li> </ul>	21-25 µg/ml (Fukuda <i>et al.</i> , 1996; Geerling <i>et al.</i> , 2004)

### 3.2.1.1. EGF

El factor de crecimiento epidérmico fue el primer factor de crecimiento identificado, siendo descubierto en 1960. Es una sustancia de naturaleza proteica, que presenta gran homología con el TGF- $\alpha$ , compartiendo ambos factores el mismo receptor (Bell *et al.*, 1986) y siendo dos de los miembros de la familia de factores de crecimiento epidérmico más implicados en la cicatrización y regeneración epitelial. Ambos son segregados como proteínas de anclaje a la membrana, siendo posteriormente procesados a este nivel para dar lugar a los factores solubles bioactivos. Y en este caso, los dos factores se unen exclusivamente a los receptores de la membrana erb-1 de las células epiteliales corneales.

El EGF acelera los procesos de reparación y cicatrización de las heridas, favoreciendo por un lado, la proliferación y migración de células epiteliales y fibroblastos y, por otro, aumentando la síntesis de proteínas como la fibronectina y activando la expresión de los

receptores de fibronectina en el epitelio corneal (Ho *et al.*, 1974; Nishida *et al.*, 1992; Pastor & Calonge, 1992). Se ha demostrado que la capacidad de reepitelización que tiene el EGF está mediada, al menos en parte, por la fibronectina, de modo que con anticuerpos antifibronectina se inhibe la migración epitelial inducida por EGF (Nishida *et al.*, 1990). Por otro lado, en cultivos celulares se ha descrito que el EGF, así como la IL-6, activan la expresión de las integrinas las cuales se unen a la fibronectina, favoreciendo la unión de las células a la matriz extracelular y, por lo tanto, la migración. También, el EGF, en presencia de sustancia P aumenta la migración epitelial (Nakamura *et al.*, 1997). Además, tiene un efecto quimiotáctico sobre los fibroblastos atrayéndolos hacia la zona dañada y estimulando la formación de matriz extracelular (colágeno, ácido hialurónico y fibronectina). El EGF es secretado en las zonas lesionadas por las propias células epiteliales, los macrófagos, y otras células inflamatorias que migran a la zona dañada (Tsubota *et al.*, 1999 a; Geerling *et al.*, 2004).

Su efecto sobre la angiogénesis es controvertido. Se postula que quizá estimule la angiogénesis cuando está en combinación con otros factores como el FGF, durante la curación de una herida (Klenkler *et al.*, 2007).

El EGF está presente en la lágrima (van Setten *et al.*, 1989) así como en el plasma sanguíneo (Hirata *et al.*, 1982). La concentración de EGF en la lágrima es de 0,2-9,7 ng/ml (Ohashi *et al.*, 1989; Geerling *et al.*, 2004), frente al promedio de 0,5 ng/ml encontrados en suero (Tsubota *et al.*, 1999 a; Geerling *et al.*, 2004). En lágrima, aunque el EGF es secretado mayoritariamente por la glándula lagrimal (Wilson *et al.*, 1991 a y 1991 b), también es sintetizado en las células epiteliales corneales (Wilson *et al.*, 1992 a y 1992 b).

### 3.2.1.2. FGF

La existencia de un factor de crecimiento para fibroblastos se conoce desde 1939 gracias a los trabajos de Trowell y Willmer (Trowell & Willmer, 1939), aunque hasta 1984 no se identificó la molécula (Thomas *et al.*, 1984). Dentro de esta familia, los péptidos más importantes y mejor caracterizados son el FGF ácido o FGF-1 y el FGF básico o FGF-2. Estos péptidos tienen una gran afinidad por la heparina, que les protege de la proteólisis y degradación, y sirve como almacén de factores inactivos.

Las distintas formas de FGF están implicadas en múltiples funciones fisiológicas como la proliferación, crecimiento y diferenciación celular, hematopoyesis, angiogénesis, formación de matriz extracelular y en el desarrollo embrionario. Además cabe destacar el importante

papel que tienen los FGFs en los procesos de reparación tisular, estimulando la proliferación de la mayoría de las células implicadas.

A nivel ocular, el FGF-1 se localiza sobre todo en la membrana de Bowman, membrana de Descemet y endotelio, y el FGF-2 en epitelio, estroma y endotelio. Ambos factores, son mitogénicos para el epitelio, células estromales y endotelio corneal (Saghizadeh *et al.*, 2001). Además, sobre todo el FGF-2 favorece la migración de los queratocitos, mientras que el FGF-1 tiene menos efectos sobre estas células del estroma corneal (Wilson *et al.*, 1991 a; Andresen *et al.*, 1997).

El FGF no está presente habitualmente en la lágrima, pero se estimula su producción tras una agresión corneal, actuando como un factor trófico para la superficie ocular (Schechter *et al.*, 2000).

### 3.2.1.3. VEGF

Este factor, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), es una proteína homodimérica cuya secuencia de aminoácidos tiene una similitud del 24% con el PDGF-BB, pero se une a distintos receptores e induce diferentes efectos biológicos. Es un mitógeno potente y selectivo para las células endoteliales, su importancia queda manifestada por su acción angiogénica.

El VEGF además de promover la proliferación de las células endoteliales, las induce a liberar MMPs de matriz y activadores del plasminógeno, así como a expresar integrinas, lo que permite a estas células degradar su membrana basal y migrar desde los vasos preexistentes para formar nuevas estructuras (Witmer *et al.*, 2003).

El VEGF es un componente normal de la lágrima y se encuentra en ella a una concentración de 19 ng/ml (Vesaluoma *et al.*, 1997). El papel que juega este factor de crecimiento en la lágrima y en la córnea, típicamente avascular, no está claro, puede estar involucrado en el aumento de la permeabilidad de los vasos conjuntivales durante una herida o en condiciones de hipoxia, o probablemente tenga una mayor significación en patologías relacionadas con la neovascularización corneal (Vesaluoma *et al.*, 1997). Diferentes proteínas que regulan la angiogénesis han sido también detectadas en lágrima, pudiendo ayudar al mantenimiento del estado antiangiogénico en la córnea quiescente (Klenkler *et al.*, 2007).

#### 3.2.1.4. HGF

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es una glicoproteína de unión a heparina con una secuencia similar al plasminógeno. Lo sintetizan típicamente células de origen mesenquimal, concretamente las células fibroblásticas en la córnea, como precursor inactivo, el cual es activado en casos de herida, estímulo inflamatorio o por parte de las proteasas de la cascada de la coagulación.

El HGF se encuentra básicamente en el estroma corneal (Wilson *et al.*, 1993), donde de manera paracrina, ejerce efectos en las células epiteliales corneales (Klenkler *et al.*, 2007). Sus funciones son estimular la proliferación y migración de células epiteliales, principalmente, y endoteliales, inhibiendo además, la diferenciación terminal de las células epiteliales (Wilson *et al.*, 1999).

Sus receptores están sobre todo en la córnea central, y su concentración en lágrima es de unos 0,2-0,5 ng/ml (Li *et al.*, 1996; Tervo *et al.*, 1997).

#### 3.2.1.5. PDGF

El PDGF, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, es una glicoproteína dimérica, de la cual se conocen cinco isoformas con acciones diferentes según el tipo de célula estimulada (Heidaran *et al.*, 1991; Bergsten *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002). A nivel de superficie ocular las isomorfias más importantes son la BB y la AB.

El principal reservorio de este factor de crecimiento son los gránulos alfa de las plaquetas, y se liberan cuando las plaquetas se agregan y se inicia la cascada de la coagulación.

El PDGF juega un papel importante en las primeras etapas de la reparación. Así, potencia y acelera de una forma dosis dependiente la reparación tisular *in vivo* e *in vitro* (Denk & Knorr, 1997). La función principal del PDGF es promover la quimiotaxis y proliferación de fibroblastos y células inflamatorias (Jones & Kazlauskas, 2000). También, el PDGF estimula la producción de fibronectina utilizada durante la proliferación y migración celular en la cicatrización.

Centrándonos en el ojo, la concentración de PDGF en lágrima se encuentra entre 0,09 y 1,7 ng/ml (Vesaluoma *et al.*, 1997). El PDGF-BB es producido por las células del epitelio corneal basal, mientras que sus receptores se expresan en los fibroblastos estromales, estimulando así su migración y proliferación (Vesaluoma *et al.*, 1997; Imanishi *et al.*, 2000). Adicionalmente, el PDGF favorece la migración de células epiteliales en presencia de



fibronectina *in vitro* (Imanishi *et al.*, 2000) y estimula la curación de heridas epiteliales *in vivo* (Vesaluoma *et al.*, 1997). También, el PDGF induce la migración de células endoteliales corneales a bajas concentraciones (Imanishi *et al.*, 2000).

### 3.2.1.6. Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína adhesiva dimérica presente en los fluidos corporales y líquido amniótico, así como en la matriz extracelular de la mayoría de los tejidos de vertebrados. Se conocen varias isoformas. Entre ellas, la denominada fibronectina plasmática es una proteína soluble que favorece la cicatrización. El resto de isoformas son insolubles y se organizan en forma de fibrillas en la superficie de ciertas células que presentan integrinas necesarias para la formación de las fibrillas. La fibronectina ha sido identificada como un elemento clave en numerosas funciones biológicas, ya que se encuentra implicada en la adhesión, migración y diferenciación celular, y mejora la fagocitosis por leucocitos y macrófagos (Fukuda *et al.*, 1996; Salman & Gündoğdu, 2010).

En la superficie ocular, la fibronectina fue detectada por primera vez a principios de 1980 en superficies corneales desepitelizadas de conejo (Fujikawa *et al.*, 1981) y juega un papel importante en la regeneración/reparación corneal. Así, esta glicoproteína es uno de los factores más importantes en la fase de migración celular durante la reparación del epitelio corneal tras una lesión, favoreciendo la migración de células epiteliales corneales (Phan *et al.*, 1991). La fibronectina, puede ser vertida a la lágrima desde los vasos sanguíneos de la conjuntiva o desde la propia córnea, apareciendo en el lugar de la lesión y desapareciendo tras su curación (Fukuda *et al.*, 1996). De hecho, se ha visto que la aplicación externa de colirio de fibronectina es eficaz en el tratamiento de defectos epiteliales persistentes de la córnea (Nishida *et al.*, 1983).

Su concentración en suero es casi 10 veces superior a la encontrada en la lágrima (Geerling *et al.*, 2004), e incluso algunos autores han observado un ratio de aproximadamente 1:10,000 entre la lágrima y el plasma (Fukuda *et al.*, 1996); aunque en pacientes con enfermedades inmunes o tratamientos inmunosupresores esta concentración esta disminuida en el plasma (Harloff *et al.*, 2008).

### 3.2.1.7. Otros factores de crecimiento

Otro factor de crecimiento a destacar implicado en la regeneración celular, es el **TGF- $\beta$** . El TGF- $\beta$  favorece la cicatrización corneal, estando implicado en los procesos de fibrosis. Sin

embargo, sus efectos se consideran negativos para la regeneración corneal. El TGF- $\beta$  tiene un efecto pleiotrópico, actuando de forma diferente, y a veces opuesta, dependiendo del tipo de células sobre las que actúe y del entorno que las rodea. Así, el TGF- $\beta$ , por un lado, inhibe la proliferación de células epiteliales y disminuye la migración de los queratocitos (Andresen *et al.*, 1997) y, por otro lado, dado su marcado papel profibrótico, favorece la quimiotaxis y mitogénesis de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos (Jester *et al.*, 1999), así como la producción de matriz, pudiendo contribuir a una regeneración anómala del estroma corneal con alteración de la distribución de las fibras de colágeno y la consiguiente pérdida de transparencia.

Otros factores importantes en la regeneración ocular son aquellos con efectos neurotróficos, necesarios para el metabolismo nervioso, como el **NGF**, que estimula la proliferación y diferenciación de células epiteliales e induce el crecimiento de fibroblastos y la regeneración y crecimiento neuronal; el **IGF-1** que es una hormona que favorece la proliferación y diferenciación de epitelio y las células estromales en el ojo; o la **sustancia-P**, que juega un importante papel en la migración de células epiteliales corneales en un mecanismo sinérgico con IGF-1 (Nishida *et al.*, 1996; Nishida *et al.*, 2008). Se ha descrito que el aporte exógeno de sustancia P junto con el factor IGF-1 estimula la migración epitelial corneal y la expresión de integrinas esenciales para el anclaje de las células en la matriz extracelular, favoreciendo así el cierre de úlceras corneales neurotróficas (Nishida *et al.*, 1996).

Asimismo, cabe destacar que no solo los factores de crecimiento contribuyen al proceso de reparación corneal, sino, también muchas **citocinas inflamatorias** (Andia & Maffulli, 2013). Casi todas las citocinas inflamatorias son producidas por células inflamatorias, y regulan la proliferación e inducen migración de las células corneales. Sin embargo, también las propias células corneales expresan citocinas inflamatorias y sus receptores. Además, estas citocinas no solo se expresan en los procesos de inflamación, sino también en condiciones normales, como por ejemplo la IL-1, IL-6 o IL-8 en la lágrima humana (Nakamura *et al.*, 1998).

## **4. HEMODERIVADOS EN LA REPARACIÓN Y REGENERACIÓN TISULAR**

### **4.1. Definición y conceptos generales**

Los hemoderivados son productos hemáticos no tóxicos ni alergénicos, que se obtienen mediante la separación de los diferentes componentes de la sangre por centrifugación, concentrando elementos considerados terapéuticos por su capacidad para mejorar la curación y estimular la regeneración de diferentes tejidos, como las plaquetas, factores de crecimiento y proteínas bioactivas, y descartando elementos no útiles como los hematíes

(Anitua *et al.*, 2004; Dohan *et al.*, 2012). En clínica se han utilizado como coagulantes, sellantes, compactantes y cicatrizantes, aprovechando el potencial regenerativo de las plaquetas y de los factores de crecimiento.

Desde finales de los años 90, muchos de los productos hemoderivados han basado su preparación en la concentración de plaquetas, utilizándolas como vehículos liberadores de concentraciones suprafisiológicas de factores cicatrizantes, para favorecer y acelerar el cierre de heridas de diferentes tejidos, como músculo, tendón, piel, etc (Anitua *et al.*, 2007; Anitua *et al.*, 2008 b; Nurden *et al.*, 2008; Borrione *et al.*, 2010). El precursor de estos preparados plaquetarios fue el adhesivo de fibrina animal, descrito por Matras en 1970 (Matras H, 1970) y utilizado como hemostático y adhesivo quirúrgico en los años 80. Posteriormente en los años 90, y con los mismos fines, se utilizó el gel de fibrina autóloga, siendo algo posterior la comercialización del Tissucol, un adhesivo biológico heterólogo de fibrina. Por otro lado, durante estos años, se introdujo un nuevo concepto basado en el papel que jugaría (dentro del gel de fibrina) una significativa concentración de plaquetas en la preparación final. Así, en 1986, Knighton y sus colaboradores (Knighton *et al.*, 1986) describieron el *platelet-derived wound healing factor* (PDWHF) que puede considerarse el precursor directo del plasma rico en plaquetas, descrito por Marx en 1998 (Marx *et al.*, 1998). Estas técnicas continuaron desarrollándose lentamente hasta 1997 cuando Whitman y sus colaboradores presentaron el uso de concentrados plaquetarios como alternativa autóloga al adhesivo de fibrina en cirugía oral y maxilofacial (Whitman *et al.*, 1997), utilizándolo no sólo como adhesivo tisular sino también como procedimiento para la consolidación inicial de injertos en los maxilares. A diferencia de los adhesivos de fibrina, estos preparados plaquetarios aportan plaquetas y/o factores de crecimiento. La historia de estos preparados plaquetarios está fuertemente asociada con el artículo de Marx de 1998 sobre los efectos de los factores de crecimiento en el plasma rico en plaquetas. Aunque un trabajo publicado por Slater ya en 1995 (Slater *et al.*, 1995) sugiere la posibilidad de estimular la proliferación celular con factores de crecimiento plaquetarios, produciendo una respuesta integrada de los distintos factores presentes en el plasma.

Estos hemoderivados se llaman genéricamente concentrados plaquetarios, denominados comúnmente plasmas ricos en plaquetas o plasmas ricos en fibrina (PRF), y ya han sido utilizados para acelerar el cierre de heridas cutáneas *in vivo* (Molina-Miñano *et al.*, 2009), de quemaduras (Pallua *et al.*, 2010) y en cirugía plástica para el tratamiento de úlceras de piel resistentes al tratamiento habitual y regeneración de nervio facial. También, se han utilizado en otros tipos de cirugía como cirugía maxilo-facial, para consolidación de implantes de titanio y remodelación ósea (Marx *et al.*, 1998), cirugía cardiotorácica (Everts *et al.*, 2006), y cirugía ortopédica, para degeneración de discos intervertebrales, reconstrucción de

ligamento cruzado anterior o reparación de roturas de tendón y músculo (Anitua *et al.*, 2007). Así, los concentrados de plaquetas, están siendo objeto de un gran desarrollo en cuanto a sus aplicaciones clínicas, con objeto de desarrollar una medicina más personalizada especialmente valiéndose de los recursos del propio organismo para promover la regeneración tisular.

En la actualidad los procesos de obtención de hemoderivados han sufrido una modernización espectacular y se han convertido en una práctica habitual, más fácil, rápida y sin necesidad de grandes volúmenes de sangre. La bibliografía muestra una gran variabilidad en la metodología de obtención y aplicación de estos productos (Riestra *et al.*, 2016). Por este motivo, sobre todo los concentrados plaquetarios para uso tópico o infiltración, han tenido una historia de confusión en cuanto a la terminología, caracterización y clasificación de las distintas variantes. La composición de estos productos varía ampliamente, tanto cualitativa como cuantitativamente (Dohan *et al.*, 2009).

Dohan y sus colaboradores en 2009 propusieron una primera clasificación de los mismos que dividía todos los preparados en cuatro familias, en función de su contenido celular (presencia o ausencia de leucocitos) y de fibrina (Dohan *et al.*, 2009; 2012):

- *Pure-Platelet-Rich Plasma* (P-PRP): productos sin leucocitos y con una baja densidad de malla de fibrina después de su activación.
- *Leukocyte and Platelet-Rich Plasma* (L-PRP): productos con leucocitos y una baja densidad de malla de fibrina después de su activación.
- *Pure Platelet-Rich Fibrin* (P-PRF) o *Leukocyte-Poor Platelet-Rich Fibrin*: productos sin leucocitos pero con una malla de fibrina muy densa, lo cual provoca que sólo pueda ser aplicado en forma sólida.
- *Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin* (L-PRF): productos con leucocitos pero una malla de fibrina muy densa, lo cual provoca que sólo pueda ser aplicado en forma sólida.

Sin embargo, hoy en día esta clasificación puede considerarse incompleta, puesto que son más de dos los parámetros que se deben considerar a la hora de clasificar estos productos tan complejos, como pueden ser la concentración de plaquetas, el momento de la activación de estas, la presentación en el producto final,... (Dohan *et al.*, 2014). Otras clasificaciones como la de Mishra y sus colaboradores o la de DeLong y sus colaboradores, han sido propuestas en los últimos años, pero no abarcan todos los concentrados plaquetarios, están limitadas a los productos de plasmas ricos en plaquetas y a aplicaciones del campo de la medicina deportiva (DeLong *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2012).

## 4.2. Hemoderivados y su aplicación en oftalmología

La utilización de derivados hemáticos en oftalmología viene marcada principalmente por la necesidad de encontrar un sustituto ideal de la lágrima que, además de humectar, aporte otros componentes habitualmente presentes en ella, que favorezcan los procesos de cicatrización y regeneración necesarios en determinadas patologías que cursan con disminución o inexistencia de estos componentes. Estos derivados hemáticos contienen una gran variedad de factores de crecimiento, vitaminas e inmunoglobulinas, algunos de ellos en concentraciones más altas que la lágrima natural (Geerling *et al.*, 2004). Por ello, estos factores epiteliotróficos son, en gran medida, los responsables del efecto terapéutico de los hemoderivados en las patologías de la superficie ocular.

A lo largo de la historia, en el campo de la oftalmología, la sangre ha tenido un uso terapéutico. De hecho, Hipócrates (Hipócrates de Cos., siglo V-IV a.C.) en el siglo V-IV a.C. ya describió que el sangrado espontáneo o provocado de los ojos los mejora. También, el uso de la sangre fue citado hace 1550 años en el papiro de Ebers (Albert & Edwards, 1996), como colirio para ojos rojos o baja visión.

En el siglo pasado comenzó a ser relevante en oftalmología el uso del componente sérico de la sangre, publicándose numerosos trabajos al respecto. Y ya en 1923 Fromaget (Fromaget, 1923) lo citó como tratamiento aditivo para las úlceras corneales. Sin embargo durante estos años, el autosuero, como se denominaba entonces, no tuvo mucho éxito. En 1960 Busse Grawitz (Grawitz, 1960) señaló que el suero hemático aplicado al ojo regula su inflamación.

Tras la descripción del suero autólogo en el año 1984 por Fox y sus colaboradores (Fox *et al.*, 1984) como posible sustituto de la lágrima natural en el tratamiento del ojo seco, se abrió una nueva línea de posibilidades terapéuticas en la oftalmología, la de los productos hemoderivados autólogos. Sin embargo, no fue hasta finales de los 90 cuando gracias a los trabajos de Tsubota y sus colaboradores, (Tsubota *et al.*, 1999 a y 1999 b) resurgió el interés por este tipo de terapia. De hecho, cuando se habla de hemoderivados en Oftalmología instintivamente se piensa en el suero autólogo, encontrándose una extensa bibliografía acerca de su uso, tanto para el tratamiento del síndrome de ojo seco (Tsubota *et al.*, 1999 a), como para el tratamiento del defecto epitelial persistente (Tsubota *et al.*, 1999 b). Sin embargo, no es el único del que disponemos en la actualidad, ya que cada vez es mayor el abanico disponible, como también es cada vez más habitual el uso tópico de concentrados plaquetarios.

Dentro del campo de la oftalmología, la aplicación de los hemoderivados ha permitido el tratamiento de ciertas enfermedades oculares complejas. En concreto, para el cierre de defectos epiteliales se han descrito tratamientos con gotas de hemoderivados como el suero autólogo (Tsubota *et al.*, 1999 b; Poon *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 2004; López-García *et al.*, 2007), los concentrados plaquetarios (Hartwing *et al.*, 2004), el plasma rico en plaquetas de Alio (*platelet-rich plasma*; PRP) (Alio *et al.*, 2007 b) o el suero derivado de plasma rico en factores de crecimiento (*serum derived from Plasma Rich in Growth Factors*; s-PRGF) (López-Plandolit *et al.*, 2010). Además, los hemoderivados también se han utilizado como una alternativa de tratamiento en el síndrome de ojo seco severo (Tsubota *et al.*, 1999; Poon *et al.*, 2001; Alio *et al.*, 2007 a; López-Plandolit *et al.*, 2011;) y se han usado como coadyuvante para el cierre de agujeros maculares (Gehring *et al.*, 1999; Paques *et al.*, 1999). La eficacia del tratamiento con concentrado plaquetario plasmático subconjuntival o tópico, también quedó demostrado en el trasplante de limbo o en quemaduras oculares por Márquez de Aracena y sus colaboradores (Márquez de Aracena *et al.*, 2006; Márquez de Aracena *et al.*, 2007). Hoy en día, hay una mayor tendencia a usar los hemoderivados de forma autóloga. Aunque con el mismo fin terapéutico, también han sido utilizados los hemoderivados heterólogos, como el suero de cordón umbilical (Vajpayee *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2007) o el extracto de membrana amniótica (Bonci *et al.*, 2005). Sin embargo, al tratarse de productos heterólogos existe riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas y reacciones alérgicas, las cuales no se producen con los hemoderivados autólogos.

Las propiedades biomecánicas y bioquímicas de estos tratamientos, basados en su mayoría en gotas de hemoderivados, son similares a las de la lágrima normal, la cual resulta de vital importancia para la estabilidad y viabilidad del epitelio corneal (Tabla 2) (Tseng & Tsubota., 1997). Una modificación cualitativa o cuantitativa en la película lagrimal puede provocar trastornos severos de la superficie ocular. En estos casos, como ya hemos comentado en el apartado de "*Tratamientos del defecto epitelial*", los tratamientos convencionales, como las lágrimas artificiales comerciales, no contienen factores de crecimiento o determinadas proteínas bioactivas que por sí solos puedan ayudar a promover una adecuada reepitelización. En este contexto, la aplicación de hemoderivados autólogos está adquiriendo un papel destacado contribuyendo a evitar la mala evolución o persistencia de un defecto epitelial u otro trastorno de la superficie ocular (Herrero-Vanrell & Molina-Martínez, 2008). Además estos tratamientos evitan problemas alérgicos y el uso de conservantes, el cual puede inducir toxicidad ocular y causar irritación y daño epitelial (Geerling *et al.*, 2001; Noecker, 2001).

**Tabla 2.** Comparación de las propiedades bioquímicas en lágrima y suero autólogo (Geerling *et al.*, 2004).

	Tears	Serum
pH	7.4	7.4
Osmolarity	298	296
EGF (ng/ml)	0.2-3.0	0.5
TGF- $\beta$ (ng/ml)	2-10	6-33
Vitamin A (mg/ml)	0.02	46
Lysozyme (mg/ml)	1.4	6
IgA ( $\mu$ g/ml)	1190	2
Fibronectin ( $\mu$ g/ml)	21	205

Como ya hemos comentado existen diferentes derivados sanguíneos autólogos con cantidades variables de plaquetas y factores de crecimiento que se utilizan para promover la cicatrización y regeneración de tejidos. En esta tesis nos vamos a centrar en tres hemoderivados que han destacado dentro del campo de la oftalmología:

### 1. Suero autólogo (AS) (López-García *et al.*, 2007)

Existen multitud de estudios y ensayos clínicos que avalan la eficacia clínica del AS, especialmente en el tratamiento de los defectos epiteliales y el tratamiento de ojo seco.

La descripción del AS (Fox *et al.*, 1984; Tsubota *et al.*, 1999 a) supuso una primera revolución, ya que se describió que su pH, osmolaridad y propiedades bioquímicas son similares a las de la lágrima natural. Al igual que esta, contiene abundantes factores de crecimiento y bactericidas que hacen que el tratamiento con suero autólogo tópico no sólo humecte la superficie ocular sino que, además, aporta factores nutricionales y de crecimiento, necesarios para mantener la viabilidad celular en los procesos de reparación epitelial, y componentes bactericidas que reducen el riesgo de contaminación e infección (López-García *et al.*, 2007). El hecho de que el epitelio de la superficie ocular puede mantener su fenotipo mediante la aplicación de suero autólogo cuando hay baja producción de lágrima, sugiere que este contiene los componentes necesarios presentes en la lágrima (Tsubota *et al.*, 1996). La utilización del AS en colirio ha sido referida por muchos autores como una nueva terapia tópica en pacientes con diferentes trastornos en la superficie ocular (Goto *et al.*, 2001; López-García *et al.*, 2007).

El colirio de AS se obtiene a partir de muestras sanguíneas recogidas en un tubo sin anticoagulante, por lo que la coagulación ocurre de forma espontánea. Esta es una primera diferencia con los otros dos hemoderivados que vamos a estudiar, PRP y s-PRGF. Por otra

parte, al igual que el PRP y s-PRGF requiere de un único proceso de centrifugación. Sin embargo, tras la centrifugación del AS, todos los elementos formes de la sangre, incluidas las plaquetas, quedan depositados en la parte inferior del tubo y, por tanto, excluidos del producto. De este modo, no se excluye la presencia en el AS de agentes pro-inflamatorios tales como las MMPs e hidrolasas ácidas derivadas de la desgranulación de los leucocitos, las cuales pueden inducir efectos negativos en la regeneración (Schnabel *et al.*, 2007).

## 2. Plasma rico en plaquetas (PRP) (Alio *et al.*, 2007 a y 2007 b)

Los plasmas ricos en plaquetas (Eppley *et al.*, 2004; Marx, 2004; Everts *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Alio *et al.*, 2007 a y 2007 b) surgieron tras la identificación de las plaquetas como una fuente importante de factores de crecimiento presentes en el plasma que están involucrados en los procesos de reparación tisular. Se definen como una porción de la fracción plasmática de sangre autóloga que contiene una concentración plaquetaria por encima de la basal (Marx, 2001), y en el cual no se recoge la serie leucocitaria, se desecha.

Entre los distintos plasmas ricos en plaquetas utilizados en oftalmología destacamos el PRP descrito por Alio y sus colaboradores, en cuya metodología no hay activación de plaquetas, esperando que las mismas degranulen al contactar con la superficie ocular del paciente (Alio *et al.*, 2007 a y 2007 b). Alio y sus colaboradores sugieren que este PRP descrito por ellos presenta ventajas sobre el AS por mostrar una mayor presencia de factores de crecimiento y vitaminas. En el AS hay una gran cantidad de factores de crecimiento que son liberados por las plaquetas una vez activadas, sin embargo, en el PRP descrito por ellos las plaquetas permanecen intactas y pueden adherirse a la superficie ocular y mejorar los mecanismos bioquímicos y biológicos. Observaron que el PRP mejoraba la fotofobia, el dolor y la inflamación, facilitando la reepitelización, promoviendo la curación corneal y mejorando las condiciones clínicas en úlceras corneales (Alio *et al.*, 2007 b).

## 3. Suero derivado de plasma rico en factores de crecimiento (s-PRGF) (López-Plandolit *et al.*, 2010)

El plasma rico en factores de crecimiento o *Plasma Rich in Growth Factors* (PRGF) es un tipo de concentrado plaquetario que fue originalmente descrito para acelerar la regeneración de defectos maxilares y traumatológicos (Anitua, 1999) y que también ha demostrado su eficacia para el cierre de defectos en piel (Anitua *et al.*, 2007; Molina-Miñano *et al.*, 2009). Múltiples estudios y ensayos clínicos se han realizado para demostrar la eficacia del PRGF en lesiones de músculo y tendón (Seijas *et al.*, 2013; Yoshioka *et al.*, 2013; Sánchez *et al.*,



2014), en heridas de tejidos blandos (Kazakos *et al.*, 2009), y como una terapia biológica al tratamiento de la artrosis (Kon *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2012; Anitua *et al.*, 2013; Vaquerizo *et al.*, 2013).

El PRGF es un producto autólogo, que posee un carácter versátil puesto que puede ser aplicado mediante pequeñas variaciones en su protocolo de elaboración, en forma líquida o de coágulo, y con diferentes grados de enriquecimiento y activación plaquetaria según el uso que se le vaya a dar. Se puede definir como una mezcla de proteínas, preparada a partir de un determinado volumen de plasma rico en plaquetas, que no incluye leucocitos (Anitua *et al.*, 2009). Por tanto, y de acuerdo con la clasificación de plasmas ricos en plaquetas de Dohan Ehrenfest, el PRGF es un P-PRP (Pure Platelet-Rich Plasma) (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2009). El volumen de plasma puede llegar a tener una concentración de plaquetas 3,1 veces mayor que en sangre periférica (Sánchez *et al.*, 2007).

Cabe destacar que la propiedad principal del PRGF y responsable de la mayoría de sus efectos biológicos es la liberación controlada de los factores de crecimiento derivados de las plaquetas que se consigue mediante la activación de las plaquetas con cloruro cálcico, igual que en condiciones fisiológicas. También es importante la ausencia de leucocitos en su composición, y su actividad antibacteriana y antiinflamatoria. La activación del PRGF mediante cloruro cálcico activa la trombina autóloga y esta a su vez al fibrinógeno, que convertido en fibrina comienza a formar una matriz tridimensional de alta estabilidad. Al mismo tiempo se da la activación de las plaquetas y la liberación del contenido de sus gránulos alfa y densos, el cual es segregado en su mayor parte en el plazo de una hora en el lugar de aplicación (Eppley *et al.*, 2006). Así, todas estas moléculas bioactivas quedan atrapadas en el coágulo de fibrina, y van saliendo liberadas de forma gradual, a medida que se produce la retracción del coágulo.

Para el uso del PRGF en forma de colirio oftalmológico, nuestro grupo de investigación realizó una pequeña modificación sobre el protocolo original de fabricación de PRGF, obteniendo un suero derivado de PRGF, el s-PRGF, en el cual los factores de crecimiento y proteínas bioactivas han sido liberados al sobrenadante, retirándose posteriormente los restos de membrana plaquetarios envueltas en la malla de fibrina (coágulo retraído) (López-Plandolit *et al.*, 2010) y obteniendo así, un suero derivado de plasma rico en factores de crecimiento a modo de colirio para su aplicación en oftalmología. Recientes evidencias sugieren que el s-PRGF tiene potencial para el tratamiento de varias enfermedades de la superficie ocular, incluyendo el ojo seco, defectos persistentes y úlceras corneales, obteniendo resultados satisfactorios incluso en aquellos pacientes en los que el suero autólogo fue ineficaz (López-Plandolit *et al.*, 2010 y 2011).

Finalmente, una vez vistas las diferencias en cuanto a composición y preparación de los tres hemoderivados, cabe preguntarse si ello se traduce a su vez en diferencias en cuanto a su eficacia biológica.



# Objetivos



## JUSTIFICACIÓN

Ante un defecto epitelial corneal el tratamiento terapéutico debe ser lo más eficaz posible, reduciendo al mínimo el tiempo de reparación y regeneración de dicha superficie, con el fin de prevenir complicaciones tardías. Así, se deben evitar o minimizar las correspondientes secuelas permanentes sobre el mantenimiento de la estructura corneal y en consecuencia, sobre la función visual.

Los preparados derivados de sangre contienen factores de crecimiento, citocinas y otras proteínas bioactivas presentes en la sangre, a los que se les atribuye la capacidad de estimular la reparación y regeneración de diferentes tejidos. Por ello, los derivados hemáticos han despertado un gran interés en diversas áreas de la medicina, incluyendo la oftalmología. Estos hemoderivados, utilizados mayoritariamente de forma autóloga, forman parte de un nuevo enfoque en la medicina, la medicina personalizada, de la cual podrían beneficiarse un gran número de pacientes. Tal es así que actualmente hay un avance imparable de la terapéutica personalizada, tratando de dar el tratamiento más adecuado a un paciente concreto.

A finales del siglo XX, la descripción del AS (Fox *et al.*, 1984; Tsubota *et al.*, 1999 a) supuso una primera revolución, ya que se describió que su pH, osmolaridad y propiedades bioquímicas son similares a la lágrima natural. A nivel de superficie ocular, el AS no solo actúa como lubricante, sino que también aporta numerosas sustancias esenciales para la recuperación del epitelio dañado, incluyendo entre otras la vitamina A, el EGF, la fibronectina y una gran variedad de citocinas (Lee *et al.*, 2016). A día de hoy, el AS es un hemoderivado consolidado como tratamiento en multitud de patologías de la superficie ocular.

Recientemente numerosas investigaciones han puesto de manifiesto la relevancia de las plaquetas en los procesos de mantenimiento fisiológico y regeneración de los tejidos (Marx *et al.*, 1998; Eppley *et al.*, 2004; Tischler *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2003; Anitua *et al.*, 2004), considerando a sus gránulos  $\alpha$  reservorios fisiológicos de gran número de mediadores biológicos como son los factores de crecimiento, proteínas adhesivas, factores fibrinolíticos, inhibidores de proteasas, etc. Por ello, ha aumentado en la comunidad científica el interés por explotar su potencial terapéutico, surgiendo en la última década distintos preparados hemáticos ricos en plaquetas, como son dos de los hemoderivados que vamos estudiar en esta tesis, el PRP y el s-PRGF.

Tanto el AS, considerado el *gold estándar* de los hemoderivados, como el PRP y el s-PRGF están siendo empleados en pacientes con patologías de la superficie ocular. Sin embargo,

## Objetivos

no hay ningún estudio comparativo que concluya cuál de ellos puede ser más eficaz en la reparación y regeneración de los defectos epiteliales. Por ello, mediante esta tesis pretendemos realizar un estudio comparativo *in vitro* e *in vivo* de la capacidad de los tres hemoderivados mencionados (AS, PRP y s-PRGF) para reparar y regenerar el epitelio corneal.

## HIPOTESIS

La gran trascendencia que han adquirido los hemoderivados en el campo de la oftalmología nos ha llevado a plantearnos la hipótesis de este estudio:

- Los tres hemoderivados estudiados (AS, PRP, y s-PRGF) podrían ayudar a aumentar la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales corneales, de este modo el tiempo necesario para el cierre de los defectos epiteliales corneales podría verse reducido, minimizando además el riesgo de infección y el malestar del paciente. Siendo así, el AS, PRP, y s-PRGF podrían considerarse claramente promotores de la reepitelización corneal tras un defecto epitelial. Además, el s-PRGF siendo el tratamiento más novedoso de los tres, podría aportar alguna mejora en la reparación y regeneración del epitelio corneal tras un defecto epitelial, comparado con el AS o PRP, los cuales ya son tratamientos consolidados en patologías de la superficie ocular.

## OBJETIVOS

### Objetivos principales:

1. Realizar un estudio comparativo, tanto *in vitro* como *in vivo* de la capacidad de los tres hemoderivados (AS, PRP y s-PRGF) para regenerar el epitelio corneal.
2. Demostrar si el s-PRGF puede ser un tratamiento tanto o más eficaz que los dos tratamientos consolidados (AS y PRP) empleados en este estudio, y por tanto avalar su aplicación en la práctica clínica.

**Objetivos secundarios:**

1. Caracterizar los tres hemoderivados cuantificando la presencia en los mismos de la fibronectina y de algunos de los principales factores de crecimiento implicados en la reparación y regeneración de la superficie ocular.
2. Evaluar *in vitro* la capacidad para promover la proliferación celular de cada uno de los tres hemoderivados, así como la tolerabilidad de los mismos en términos de viabilidad celular.
3. Estudiar el efecto *in vitro* inducido por los tres hemoderivados sobre la diferenciación celular, analizando las modificaciones morfológicas de las células, la ultraestructura y la expresión génica.
4. Valorar *in vitro* la capacidad de estimular la migración celular de cada uno de los tres hemoderivados.
5. Evaluar la evolución del cierre de los defectos epiteliales corneales inducidos quirúrgicamente en ojos de conejo tratados con cada uno de tres hemoderivados a estudiar.





# Material y métodos

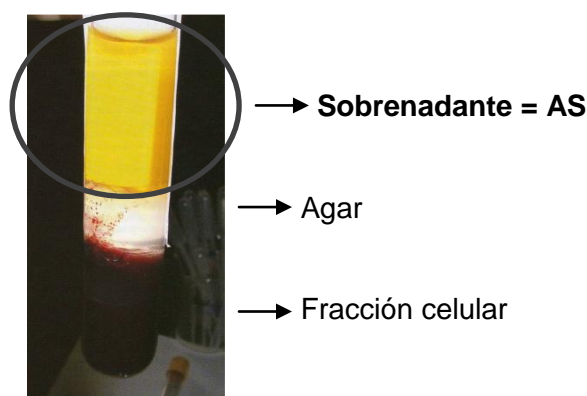


## 1. ELABORACIÓN DE LOS HEMODERIVADOS

### 1.1. Hemoderivados humanos

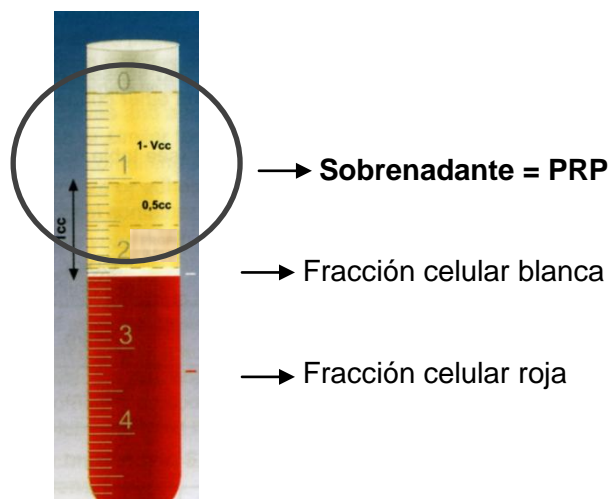
Para el desarrollo del presente proyecto de tesis doctoral empleamos sangre de voluntarios sanos y no medicados (rango de edad 30-60 años). Se les extrajo sangre por venopunción, previa firma del consentimiento informado acorde a la Declaración de Helsinki y con informe favorable del Comité de Ética para las Investigaciones relacionadas con Seres Humanos (CEISH) de la UPV/EHU. El volumen total de sangre de cada voluntario se repartió en tres partes iguales para procesarla por métodos distintos y obtener así los tres hemoderivados empleados en el estudio:

1) **Suero autólogo (AS)**: la sangre se obtuvo en tubos de 5 ml con agar (BDVacutainer® SST™II Advance, NJ USA 07417, Ref: 367957). Se dejó coagulando durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, los tubos se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos. Finalmente, se recogió la fracción completa del sobrenadante, que constituye el AS (López-García *et al.*, 2007) (Figura 1).



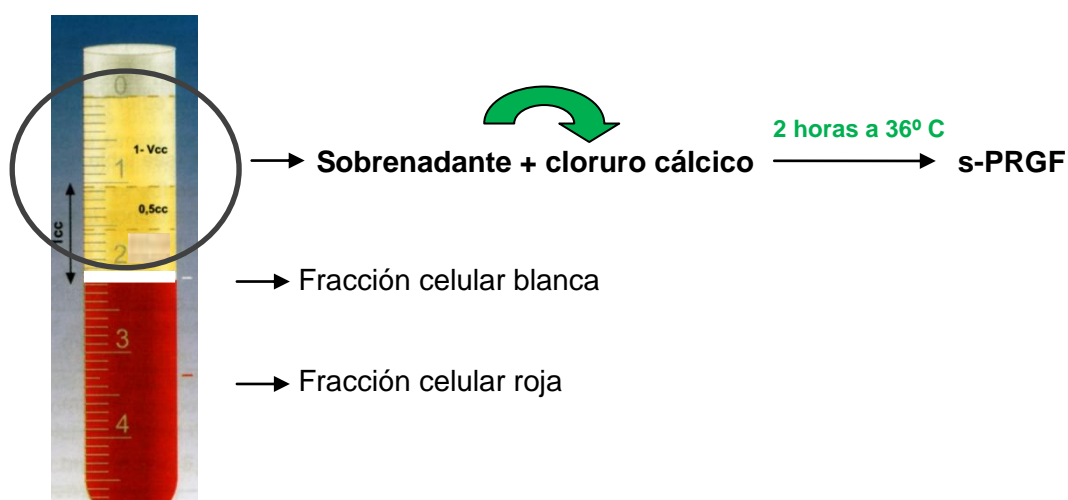
**Figura 1.** Obtención del AS tras la centrifugación de la sangre a 1000 g 15 minutos.

2) **Plasma rico en plaquetas (PRP)**: se obtuvo la sangre en tubos de 5 ml con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante (BDVacutainer®, Ref: 367704) y se llenaron hasta la marca de 4,5 ml para que contuvieran el volumen sanguíneo proporcional a la cantidad de citrato. La obtención del PRP se realizó siguiendo el método descrito por Alió y sus colaboradores (Alió *et al.*, 2007 a y 2007 b). Para ello, se centrifugaron los tubos a 460 g durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se recogió la fracción completa de sobrenadante por encima de la serie de glóbulos blancos, que constituye el PRP (Figura 2).

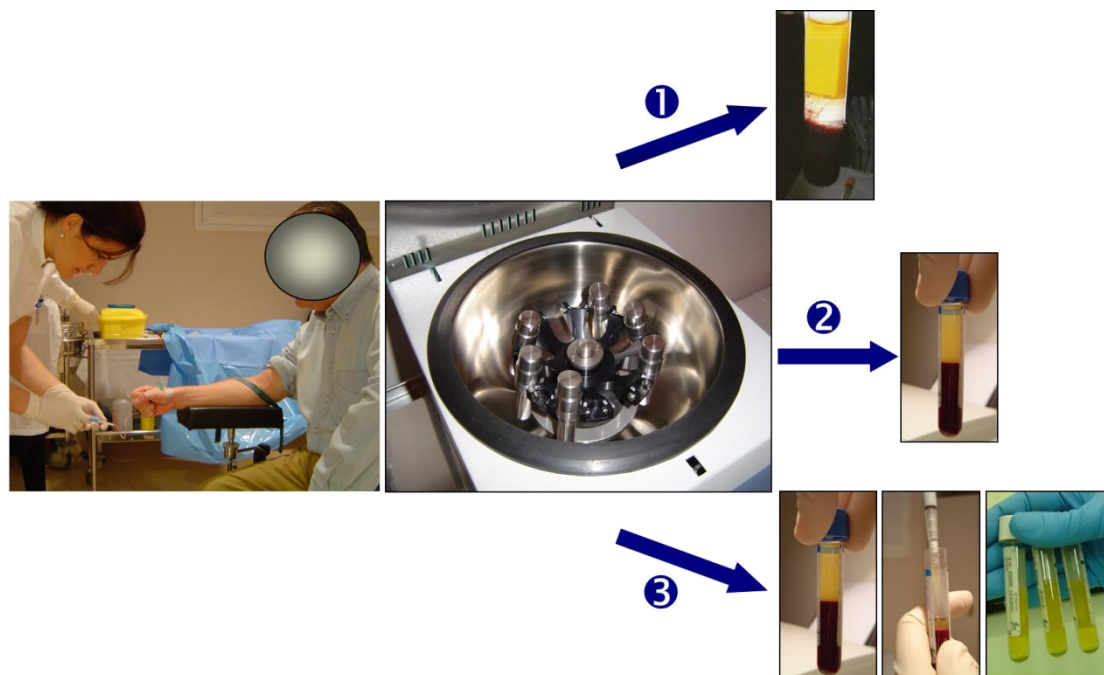


**Figura 2.** Obtención del PRP tras la centrifugación de la sangre a 460 g 8 minutos.

3) **Suero derivado del plasma rico en factores de crecimiento (s-PRGF):** se obtuvo la sangre en tubos de 5 ml con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante (BDVacutainer®, Ref: 367704). Los tubos se centrifugaron a 460 g durante 8 minutos a temperatura ambiente y se recogió la fracción completa de sobrenadante por encima de la serie de glóbulos blancos. Se indujo en este plasma la formación del coágulo añadiendo cloruro cálcico (50 µl/ml) (Biotechnology Institute, 01005 Vitoria-Gasteiz, España), a una concentración final de 22,8 mM. La función del cloruro cálcico es neutralizar el citrato y activar la secreción de gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y la cascada de coagulación. Así, se incubaron durante 2 horas a 36° C favoreciendo la activación de las plaquetas, y por consecuencia, liberando los factores de crecimiento al sobrenadante. Finalmente, se recogió el sobrenadante total tras la retracción del coágulo, que constituye el s-PRGF (López-Plandolit *et al.*, 2010 y 2011) (Figura 3).



**Figura 3.** Obtención del s-PRGF tras la centrifugación de la sangre a 460 g 8 minutos y activación de las plaquetas mediante cloruro cálcico.



**Figura 4.** Ilustración del proceso de elaboración de los tres hemoderivados.

Tanto el AS como el s-PRGF se filtraron usando un filtro con membrana hidrófila de polietersulfona (PES) de 0,22  $\mu\text{m}$  de grado esterilizante (MILLEX<sup>®</sup> GP Filter Unit, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co.Cork, IRL, Ref: SLGP033RS). El PRP no se filtró ya que en él se encuentran las plaquetas intactas, y el diámetro de estas es de 2-3  $\mu\text{m}$ .

Se hicieron alícuotas de los tres preparados (Figura 4) y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el día de su utilización. Para los ensayos con cultivos celulares, se hicieron *pools* del mismo preparado obtenido de los distintos voluntarios, con objeto de disminuir la variabilidad interindividual que se encontró tras la cuantificación de los factores de crecimiento. Para ello, previo a hacer el *pool*, se inactivaron los factores del complemento de los hemoderivados mediante su calentamiento a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. De este modo se evita la lisis celular mediada por complemento. También se hicieron alícuotas de los *pools* y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 1.2. Hemoderivados de conejo

De acuerdo con los procedimientos y diseños experimentales aprobados por el comité ético de experimentación animal de la UPV/EHU, empleamos conejas *New Zealand White* de alrededor de 2-2,5 kg de peso. Los animales se mantuvieron en el Servicio General de Animalario de la UPV/EHU (SGIker). Los métodos para el procesado de la sangre de conejo

se pusieron a punto en base a nuestra experiencia con la sangre humana, a los ensayos publicados en la bibliografía y al tamaño y número de plaquetas de los conejos respecto al de los humanos.

Se obtuvo sangre de conejo mediante venopunción de la arteria central de la oreja en tubos con agar para el AS y en tubos con citrato de sodio al 3,8% para el PRP y s-PRGF. La sangre de cada conejo fue dividida en tres partes para procesarla por métodos distintos:

1) **Suero autólogo (AS):** tras la extracción de la sangre, ésta se dejó coagulando 2 horas a temperatura ambiente, y se centrifugó a 1000 g durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante, dando lugar al AS.

2) **Plasma rico en plaquetas (PRP):** la sangre se centrifugó a 650 g durante 8 minutos. Seguidamente se recogió el sobrenadante hasta la fracción localizada justo encima de la serie de glóbulos blancos, obteniendo así un plasma rico en plaquetas, el PRP.

3) **Suero derivado de plasma rico en factores de crecimiento (s-PRGF):** la sangre se centrifugó a 650 g durante 8 minutos. A continuación, se recogió el sobrenadante hasta la fracción localizada justo encima de la serie de glóbulos blancos, y seguido se indujo la coagulación con cloruro cálcico a concentración final de 32 mM. Después de 1 hora a 36° C, durante la cual se produjo la activación de las plaquetas, se retiró el coágulo y se recogió el sobrenadante, que constituye el s-PRGF (Etxebarria *et al.*, 2016).

El s-PRGF y el AS se filtraron usando un filtro con membrana hidrófila de PES de 0,22 µm de grado esterilizante (Millex® GP Filter Unit, Merck Millipore Ltd.), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20° C hasta el día de su utilización. El PRP no se filtró ya que en él se encuentran las plaquetas intactas. Para los experimentos con cultivos primarios procedentes de conejo, en los derivados de sangre de conejo también se inactivó el complemento de la misma manera que se ha descrito en el apartado anterior. Para ello, tras la inactivación del complemento en los hemoderivados de conejo, se realizaron pools de cada derivado de sangre, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20° C.

## 2. CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS EN SANGRE Y DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS HEMODERIVADOS HUMANOS

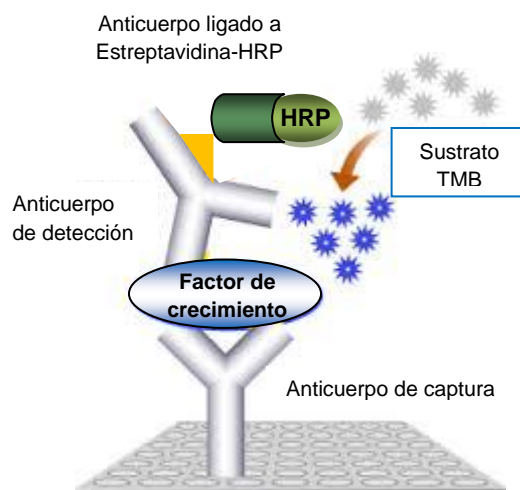
La cuantificación de plaquetas fue llevada a cabo en la Clínica Virgen Blanca (Bilbao) mediante la técnica de citometría de flujo para hematimetrías en sangre periférica.

Para caracterizar los tres hemoderivados utilizados en este trabajo se cuantificó la concentración de varios de los factores de crecimiento que han demostrado estar implicados en los procesos de cicatrización y regeneración tisular (Geremicca *et al.*, 2010): EGF, FGF, HGF, VEGF y PDGF, así como la fibronectina. La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica colorimétrica ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), que consiste en la detección de un antígeno, inmovilizado sobre una fase sólida, mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción colorimétrica cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente. La absorbancia de las muestras, también denominada densidad óptica (OD), se compara con una recta patrón obtenida de la cuantificación de diluciones seriadas a partir de una solución con una concentración conocida de la molécula en estudio.

La cuantificación se realizó en placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano y alta absorbancia (COSTAR® 3595, Corning Incorporated, Corning NY14831, USA, Ref: 3595), tratado para aumentar su capacidad de adsorción de moléculas y con fondos de pocillo óptimamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica. Estas, se obtuvieron mediante un espectrofotómetro específico denominado lector de ELISA (ELx800 Microplate Reader, BioTek® Instruments, Winooski, USA).

En este caso, para la cuantificación de los factores de crecimiento en los hemoderivados se emplearon ensayos ELISA tipo sándwich (Figura 5), los cuales tienen una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de la señal que permite el segundo anticuerpo. En estos ensayos, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo monoclonal específico (anticuerpo de captura) contra el antígeno que queremos determinar (factor de crecimiento a cuantificar). Se añaden las soluciones estándar de concentraciones conocidas, así como las muestras de hemoderivados de concentraciones desconocidas, donde se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al unirse al primer anticuerpo. Después, se aplica un segundo anticuerpo, frente al antígeno, policlonal biotinilado (anticuerpo de detección) que se unirá a un complejo enzimático, Estreptavidina-HRP (Horseradish-peroxidase), y producirá un precipitado coloreado tras la adición del sustrato tetrametilbencidina (TMB) con el que reacciona. Así cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base, que lo retiene, y un segundo anticuerpo, que facilita su detección colorimétrica.





**Figura 5.** Esquema de un ensayo ELISA tipo sándwich, utilizado en la cuantificación de factores de crecimiento.

Para cuantificar la concentración de los factores de crecimiento EGF, FGF, HGF, VEGF y PDGF presentes en las distintas muestras de hemoderivados se utilizaron los kits de ELISA de R&D (R&D Systems, Minneapolis, USA) (Tabla 1). Se siguieron las instrucciones del fabricante:

1. Fijación de anticuerpos específicos al soporte insoluble de las placas. Se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo del **anticuerpo de captura** a la concentración que especifica el fabricante para cada factor de crecimiento (Tabla 1), diluido en PBS (Phosphate buffered saline) (Sigma-Aldrich) (Ref: P4417-50TAB), y se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente.
2. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados. Se decantó la solución de cada pocillo y se realizaron tres lavados, 200  $\mu$ l por pocillo, con una solución de 0,05% Tween® 20 en PBS (**solución de lavado**).
3. Para evitar las uniones inespecíficas de otras moléculas, se añadieron 300  $\mu$ l de una solución de 1% Seroalbumina bovina (BSA al 1%) en PBS (**tampón de dilución**) en cada pocillo y se dejó durante una hora.
4. Se hicieron tres lavados según las condiciones del paso 2.
5. Se realizaron diluciones seriadas a partir de una concentración stock conocida (**alto estándar**) (Tabla 1) de cada factor de crecimiento, las cuales se denominan **estándares**. Los valores de absorbancia de estos estándares conocidos permiten realizar una recta patrón a partir de la cual se conocerán las concentraciones de cada factor de crecimiento en las muestras a testar.

6. A continuación se prepararon las muestras de hemoderivados, para lo cual se descongelaron y en el caso de algunos factores de crecimiento se diluyeron en tampón de dilución, y en otros casos se usaron las muestras sin diluir (Tabla 1).
7. Siguiendo un riguroso orden se pusieron 100  $\mu\text{l}$  en cada pocillo de los estándares, y en otros pocillos 100  $\mu\text{l}$  de las muestras de los tres hemoderivados a cuantificar, y se incubaron durante la noche para que se produjera la reacción entre el anticuerpo y el factor de crecimiento.
8. Se hicieron tres lavados según las condiciones del paso 2.
9. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  del segundo anticuerpo (**anticuerpo de detección**) en cada pocillo, a la concentración que especifica el fabricante para cada factor de crecimiento (Tabla 1), y se dejó reaccionar durante 2 horas.
10. Se hicieron tres lavados según las condiciones del paso 2.
11. A continuación se añadió a cada pocillo 100  $\mu\text{l}$  de la solución **Streptavidin-HRP** diluido 200 veces en tampón de dilución y se incubó a temperatura ambiente 20 minutos al abrigo de la luz, para que se uniera la enzima peroxidasa al anticuerpo de detección.
12. Se hicieron tres lavados según las condiciones del paso 2.
13. Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de una solución 1:1 de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y TMB en cada pocillo, la cual actúa como **sustrato** de la enzima peroxidasa, dando una reacción de oxidación que produce color de forma estequiométrica a la concentración del factor de crecimiento que ha quedado atrapado por el anticuerpo. El tiempo de reacción varía en función del factor de crecimiento que se esté cuantificando (entre 5 y 20 minutos) (Tabla 1).
14. Para realizar la cuantificación de forma homogénea en todos los pocillos se añadieron 50  $\mu\text{l}$  por pocillo de una solución 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  que paró la reacción (**solución stop**). Se mezcló la solución mediante agitación de la placa y se observó que el líquido cambiaba de color.
15. Inmediatamente, se determinó la densidad óptica de cada pocillo, es decir, se leyó la absorbancia para cada pocillo en el lector de placas ELISA a 450 nm mediante el programa informático GEN 5 ELISA (BioTek® Instruments, Inc.).

A partir de los resultados obtenidos con los estándares de concentración conocida se obtuvo la recta patrón para cada factor de crecimiento, gracias a la cual se conocieron las concentraciones de éstos en las distintas muestras de hemoderivados. La intensidad del color fue directamente proporcional a la concentración de cada factor de crecimiento

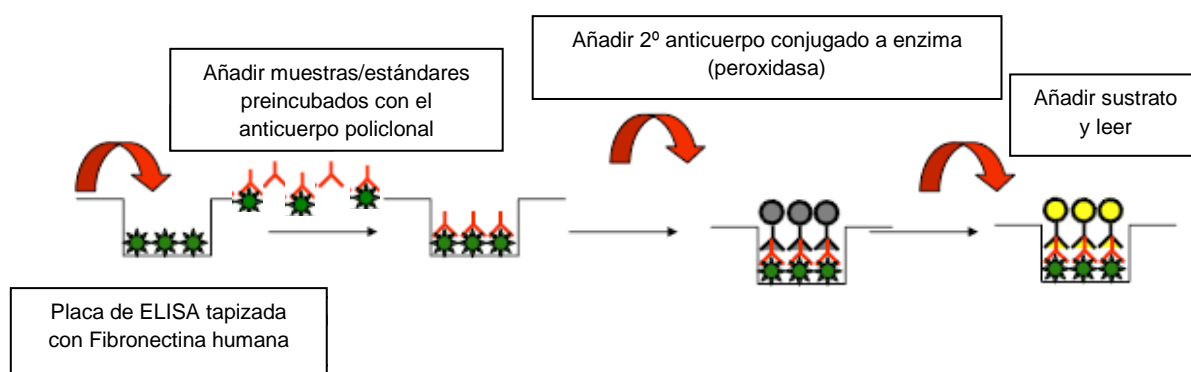
presente en los hemoderivados. Los resultados se expresaron en pg/ml, a excepción del PDGF, que se expresó en ng/ml.

Todos los ensayos se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras de hemoderivados se ensayaron por triplicado y los estándares para realizar la recta patrón por duplicado. El tipo de análisis utilizado con el programa informático GEN 5 ELISA fue tetraparamétrico y con lectura en el punto central del pocillo.

**Tabla 1.** Características de los Kits de ELISA de R&D Systems utilizados.

FACTOR DE CRECIMIENTO	Ref. comercial	ANTICUERPO DE CAPTURA	ANTICUERPO DE DETECCIÓN	ALTO ESTÁNDAR	DILUCIÓN MUESTRA	TIEMPO DE OXIDACIÓN
<b>EGF</b>	DY236	4 µg/ml	50 ng/ml	500 pg/ml	1:4	8 minutos
<b>FGF-2</b>	DY233	2 µg/ml	0,25 µg/ml	1000 pg/ml	NO	16 minutos
<b>VEGF-A</b>	DY293B	1 µg/ml	100 ng/ml	2000 pg/ml	NO	10 minutos
<b>HGF</b>	DY294	1 µg/ml	200 ng/ml	8000 pg/ml	NO	6 minutos
<b>PDGF-AB</b>	DY222	4 µg/ml	50 ng/ml	1000 pg/ml	1:30	9 minutos

Por otro lado, para cuantificar la concentración de fibronectina presente en las distintas muestras de hemoderivados se usó el kit de ELISA Human Fibronectin (Chemicon International Inc., Temecula, CA). El fundamento del Kit es diferente al descrito para los factores de crecimiento, consistiendo en un ensayo ELISA de inhibición competitiva. En este ensayo, los anticuerpos son previamente incubados con la muestra. Y así, los anticuerpos que no se han unido a los antígenos de la muestra lo harán a los antígenos de los pocillos, ya que los pocillos de la placa de ELISA están recubiertos de fibronectina. Por ello, la intensidad del color que se obtiene es inversamente proporcional a la cantidad de fibronectina de la muestra original (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de un ensayo ELISA de inhibición competitiva, utilizado en la cuantificación de fibronectina.

La cuantificación de este factor de crecimiento siguió los siguientes pasos:

1. En la placa de ELISA tapizada de fibronectina se rehidrataron los pocillos con 200  $\mu$ l por pocillo de la **solución de lavado** durante mínimo 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Se prepararon los **estándares** mediante diluciones seriadas a partir de una concentración de 1000 ng/ml de fibronectina (Tabla 2). La recta de regresión para la fibronectina va de más a menos, por lo que el color será inversamente proporcional a la concentración de fibronectina en la muestra.
3. Las muestras de hemoderivados se diluyeron en tampón de dilución (Tabla 2).
4. En otros tubos se mezcló 125  $\mu$ l del estándar y de las muestras con el mismo volumen del Rabbit anti-Human Fibronectin (Tabla 2). Se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la reacción entre el anticuerpo policlonal de conejo y la fibronectina humana.
5. La mezcla se transfirió a continuación a la placa tapizada de fibronectina humana y siguiendo un riguroso orden se pusieron 100  $\mu$ l en cada pocillo de los estándares, y en otros pocillos 100  $\mu$ l de las muestras de los tres hemoderivados a cuantificar, y se incubaron a temperatura ambiente durante una hora.
6. Se decantó la solución de cada pocillo y se realizaron cuatro lavados, 200  $\mu$ l por pocillo, con la solución de lavado.
7. A continuación se añadieron 100  $\mu$ l a cada pocillo de la solución anti-inmunoglobulina conjugada a enzima (peroxidasa) (**Goat anti-Rabbit IgG-HRP conjugado**) (Tabla 2) y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos al abrigo de la luz.
8. Seguidamente se eliminó el contenido de los pocillos y como en los pasos anteriores se realizaron cuatro lavados con solución de lavado.
9. Se añadieron 100  $\mu$ l de la solución sustrato de TMB en cada pocillo. Se incubó a temperatura ambiente entre cinco y diez minutos hasta su saturación (Tabla 2).
10. Para realizar la cuantificación de forma homogénea en todos los pocillos se añadieron 100  $\mu$ l por pocillo de la solución stop, cambiando el color a amarillo.
11. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm. La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de fibronectina hallada en las muestras de los hemoderivados.

A partir de los resultados obtenidos con los estándares, se realizó una recta patrón. Así, se interpolan los valores de las muestras, conociendo la concentración de fibronectina presente en las distintas muestras de los tres hemoderivados. Los resultados se expresaron en µg/ml.

**Tabla 2.** Características del Kit de ELISA utilizado en la cuantificación de fibronectina.

MOLÉCULA EN ESTUDIO	Ref. comercial	ANTICUERPO DE CAPTURA	ANTICUERPO DE DETECCIÓN	ALTO ESTÁNDAR	DILUCIÓN MUESTRA	TIEMPO DE OXIDACIÓN
<b>Fibronectina</b>	ECM300	4 µg/ml	50 ng/ml	1000 ng/ml	1:20	5-10 min.

### 3. CULTIVO CELULAR

Los cultivos de células *in vitro* consisten en un sistema formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad controladas. De esta forma se aseguran su supervivencia y multiplicación, lo que permite el estudio del comportamiento de las células. Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original recién extraído, recibe el nombre de **cultivo primario**, mientras que si este cultivo primario a través de procesos de transformación adquiere capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de **línea celular**.

#### 3.1. Mantenimiento de los cultivos celulares y recuento celular

Cuando se adquiere una línea celular nueva o se pone en marcha un cultivo a partir de un *stock*, el primer paso es la descongelación. Para proceder a la **descongelación celular**, el vial que contiene las células se atempera a 37° C. Tras su descongelación, cada vial celular que contiene 1 ml de la suspensión celular, se diluye con 9 ml de medio de cultivo y la suspensión se centrifuga a 170 g durante 5 minutos a 4° C. A continuación, se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en 1 ml de medio de cultivo. Se añade el ml de suspensión celular en un tubo de propileno que contiene 9 ml de medio de cultivo, alcanzando un volumen final de 10 ml, que se pasa a un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Finalmente, se incuba a 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C durante 16 horas, cambiando posteriormente el medio de cultivo para eliminar las células muertas.

Los cultivos celulares **se mantienen** en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 37° C. El número de células se multiplica en los cultivos celulares en unos pocos días, ocupando toda la superficie del frasco de cultivo, en el caso de células adherentes, y empobreciendo el medio, al consumirse los nutrientes y acumularse en él

productos de desecho producidos por el metabolismo de las células. Cuando las monocapas celulares alcanzan la subconfluencia, previo lavado con PBS, se disocian con una solución enzimática de Tripsina-EDTA (0,5% tripsina-0,2% ácido etilendiaminotetraacético) (Sigma-Aldrich) durante un máximo de 10 minutos a 37° C. Una vez las células están despegadas, se inactiva la acción de la Tripsina-EDTA mediante adición de suero bovino fetal (SBF). La suspensión celular se centrifuga a 170 g durante 5 minutos. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspende con 5 ml de medio de cultivo fresco, para seguidamente diluirlo en el volumen final necesario dependiendo del tamaño del frasco de cultivo o del número de frascos que se van a sembrar. El número de células a sembrar se ajusta para cada tipo celular y tamaño de frasco de cultivo, con el fin de conseguir un tapiz subconfluyente cada 2-3 días.

Para realizar el **recuento celular**, una vez despegadas las células, se mezcla bien la suspensión celular. Se toma una alícuota y se coloca en la cámara cuenta glóbulos para hacer el recuento al microscopio óptico invertido (N Nikon Eclipse TS 100; Nikon, Tokyo, Japan). La concentración celular se calcula mediante la fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = M \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Donde M es el n° de células totales/n° de recuadros de la cámara cuenta glóbulos. Finalmente, se ajusta la concentración celular al área de cada placa y/o frasco de cultivo a utilizar, en función de la metodología del ensayo a realizar.

Para proceder a la **congelación celular**, las células se despegan del frasco de cultivo, según se ha descrito, cuando están en crecimiento exponencial. La suspensión celular se centrifuga a 170 g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspende a una concentración de  $3 \times 10^6$  células en 1 ml de medio de congelación (SBF suplementado con un 10% de DMSO). Para provocar el menor daño celular, los viales se congelan de forma gradual. Primero se dejan a -20° C durante 2-3 horas, posteriormente a -80° C durante 16 horas y por último se almacenan en nitrógeno líquido.

## 3.2 Tipos celulares utilizados

### 3.2.1. Línea celular de epitelio corneal humano (HCE)

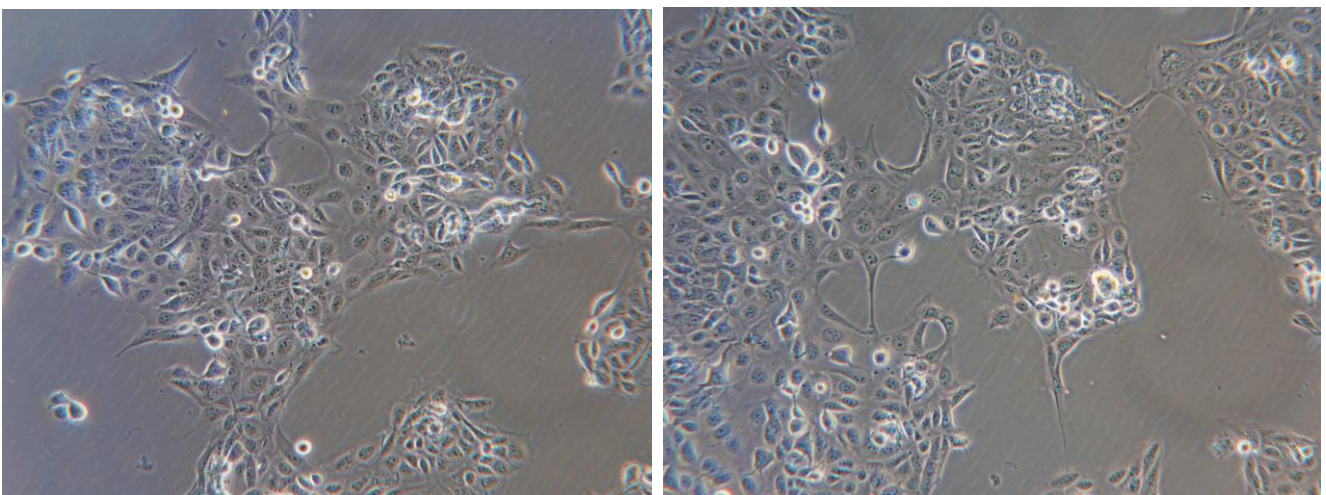
La línea celular HCE (*Human Corneal Epithelial*) corresponde a células inmortalizadas de epitelio corneal humano mediante el virus humano SV-40. Fueron cedidas muy amablemente por el Dr. K. Araki-Sasaki (Araki-Sasaki *et al.*, 1995). Las células se cultivaron adheridas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en:

## Material y métodos

- Medio DMEM:Ham's F12 (1:1 Mix) (Lonza, Verviers, Belgium) (Ref: BE12-719F)
- 2mM L-glutamina (Lonza) (Ref: BE17-605E)
- 1% penicilina-estreptomicina (Lonza) (Ref:DE17-602E)
- 10% suero bovino fetal (SBF) (Lonza) (Ref:DE14-801F)
- 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA) (Ref: 85570C)
- 5 µg/ml insulina (Sigma-Aldrich) (Ref:I9278-5ML)
- 0,1 µg/ml toxina colérica (Sigma-Aldrich) (Ref: C8180-1MG)
- 0,5% DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich) (Ref: D2650)

De aquí en adelante, nos referiremos al EGF, insulina, toxina colérica y DMSO como **suplementos** que se deben añadir al medio de cultivo para el mantenimiento de esta línea celular. La línea celular HCE se subcultivó a dilución 1:4 - 1:5 cada 2-3 días a una concentración aproximada de 20.000 células/cm<sup>2</sup>.

Al microscopio óptico de contrastes de fases (Nikon Eclipse TS 100), podemos observar que un cultivo de células HCE está formado por células de tamaño intermedio con pocas proyecciones citoplasmáticas y con grandes núcleos (Figura 7). También se observan algunas células de mayor tamaño y más aplanadas. En general, las células crecen, en colonias heterogéneas, con distinto grado de compactación.



**Figura 7.** Fotografía de microscopía de contraste de fases de un cultivo de células HCE (40x).

### 3.2.2. Cultivos primarios de células de epitelio corneal de conejo (RPCE)

De acuerdo con los procedimientos y diseños experimentales aprobados por el comité ético de experimentación animal de la UPV/EHU, empleamos conejos *New Zealand White* de alrededor de 2-2,5 kg de peso. Los animales se mantuvieron en el Servicio General de Animalario de la UPV/EHU (SGIker).

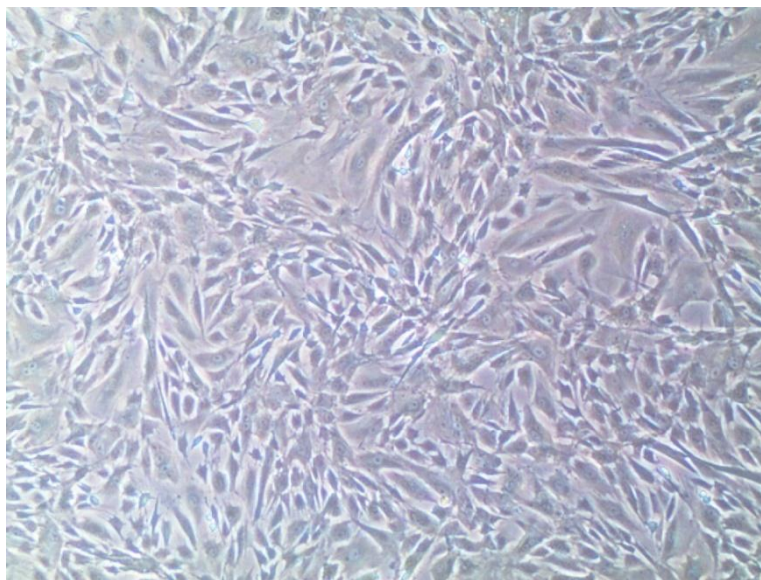
Para el aislamiento y la expansión de los cultivos primarios de células de epitelio corneal de conejo (*Rabbit Primary Corneal Epithelial*) (RPCE), los conejos fueron humanamente sacrificados bajo anestesia general profunda (Ketolar<sup>®</sup> 50 mg/ml, Pfizer 2 ml/kg + Xylacina 20 mg/ml 0,6 ml/kg) utilizando una solución endovenosa de 10 ml de KCl saturada. Seguidamente, se resecaron las córneas con un cuchillo curvado tipo *westcott* bajo condiciones asépticas y tras eliminar el botón central, se obtuvo el anillo corneal en el que se localizan las células epiteliales limbares, que tienen gran capacidad proliferativa. Los anillos se lavaron en DMEM:Ham's F12 (Lonza) con penicilina-estreptomicina (Lonza) al 1% y a continuación se sumergieron en una solución enzimática de dispasa II 25UI/ml (B&D Dispase (Biosciences Discovery Labware, Two Oak Park, Bedford, MA 01730, 4235)) en un tampón fisiológico HBSS (Hanks Balanced Salt solution) (Sigma-Aldrich) durante 16 horas a 4° C, para separar el tejido epitelial del estroma corneal. Se recogió la fracción epitelial y tras una centrifugación (170 g durante 5 minutos), se incubó durante 30 minutos a 37° C con 0,5% tripsina-0,2% EDTA (Sigma-Aldrich) para obtener una suspensión de células individuales. Antes de hacer el recuento celular se filtró la suspensión celular mediante un filtro de tipo *cell strainer* (BD<sup>®</sup>; Ref: 352350) de 70 µm de diámetro de poro. Finalmente, las células obtenidas se sembraron y mantuvieron adheridas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> en:

- Medio DMEM:Ham's F12 (1:1 Mix) (Lonza)
- 2mM L-glutamina (Lonza)
- 1% penicilina-estreptomicina (Lonza)
- 10% SBF (Lonza)
- 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich)
- 5 µg/ml insulina (Sigma-Aldrich)
- 0,1 µg/ml toxina colérica (Sigma-Aldrich)

Los cultivos primarios de células epiteliales de conejo RPCE se subcultivaron 1:2 cada 2-3 días.



Al microscopio óptico de contrastes de fases podemos observar como en un cultivo de células de cultivo primario RPCE se da una mayor heterogeneidad morfológica, ya que al ser un cultivo primario puede haber pequeñas contaminaciones de otros tipos celulares (Figura 8). En general, las células crecen expandiéndose en monocapa, sin formación de colonias.



**Figura 8.** Fotografía de microscopía de contraste de fases de un cultivo primario de células de epitelio corneal de conejo RPCE (40x).

## 4. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

### 4.1. Método MTT

El método MTT es un **ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica de sales de tetrazolio** (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) (MTT) (Sigma-Aldrich) (Ref: M5655), que se emplea habitualmente para cuantificar viabilidad celular. La conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazan (púrpura e insoluble) se produce por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Las mitocondrias de las células muertas no realizan la respiración celular, por lo que no se da esta conversión. Estos cristales de formazan, una vez disueltos son espectrofotométricamente detectables y se sabe que su absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas.

Para realizar los ensayos mediante el método MTT, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo plano. Una vez adheridas las células (aproximadamente 12 horas), con el fin de sincronizar los cultivos, se cambió el medio de cultivo inicial con SBF y los suplementos, por un medio DMEN:F12 con Seroalbúmina bovina (BSA) al 1% (Sigma-

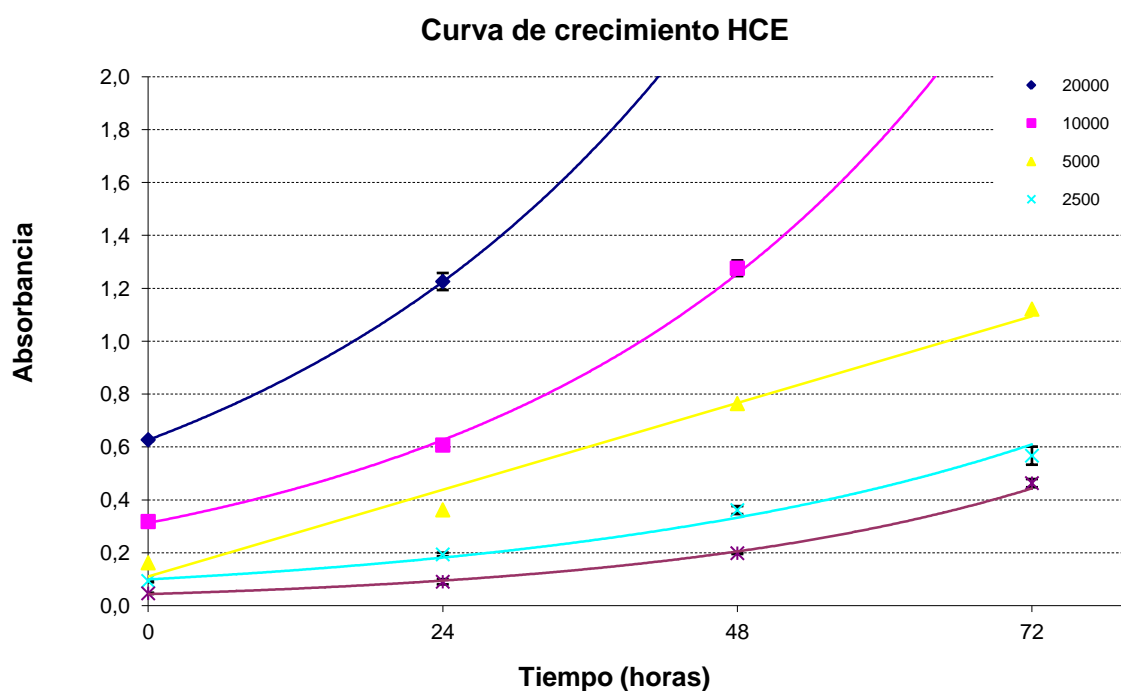
Aldrich) (Ref: A9647-50G), sin suplementos durante 16 horas. Posteriormente, el medio se reemplazó por el medio de cultivo o tratamiento adecuado para cada ensayo. Este momento se consideró tiempo 0.

Para cuantificar la viabilidad celular del cultivo, una vez transcurrido el tiempo de incubación con los distintos tratamientos, se realizó un lavado con PBS y se incubaron los cultivos con 100  $\mu$ l/pocillo de 0,5 mg/ml de MTT en medio DMEN:F12, durante tres horas a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Esta solución se eliminó y se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de DMSO para solubilizar las sales de formazan. La intensidad del color producido se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm con un lector de placas ELISA (ELx800 Microplate Reader); siendo ésta directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

#### 4.2. Curva de crecimiento

Para caracterizar el crecimiento de las células, se realizaron dos ensayos utilizando el método MTT.

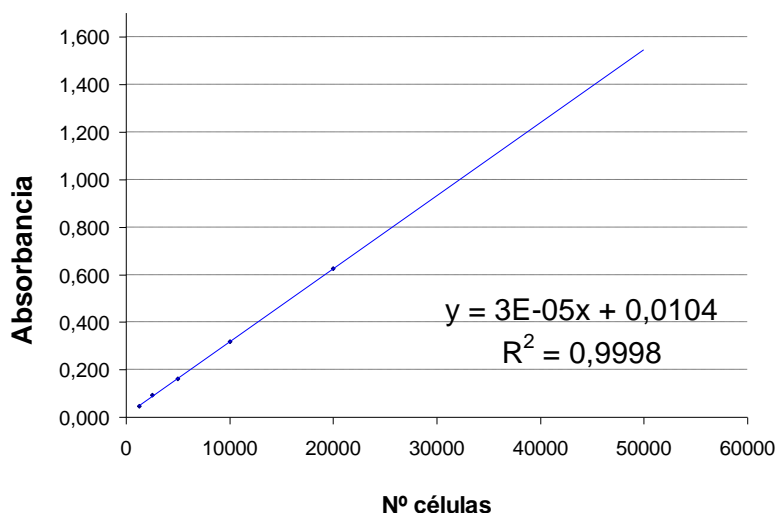
En primer lugar, se realizó una curva de crecimiento celular, midiendo la viabilidad celular a distintos tiempos (0, 24, 48 y 72 horas) a partir de cultivos en los que se han sembrado densidades celulares conocidas de forma creciente (Figura 9 A).



**Figura 9 A.** Curva de crecimiento de las células HCE, sembrando concentraciones crecientes de células por pocillo en las mismas condiciones de cultivo.

Las curvas de proliferación celular obtenidas para las células HCE, partiendo de distintas densidades celulares crecientes y conocidas, mostraron que para poder mantener un cultivo entre 72-96 horas, sin llegar a su saturación, el número idóneo de células a sembrar sería entre 3.000-5.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos ( $0,32\text{cm}^2$ ), es decir  $10.000\text{-}15.000$  células/ $\text{cm}^2$  (Figura 9 A). Además se observó que para esta concentración, la tasa de división celular es aproximadamente 24 horas.

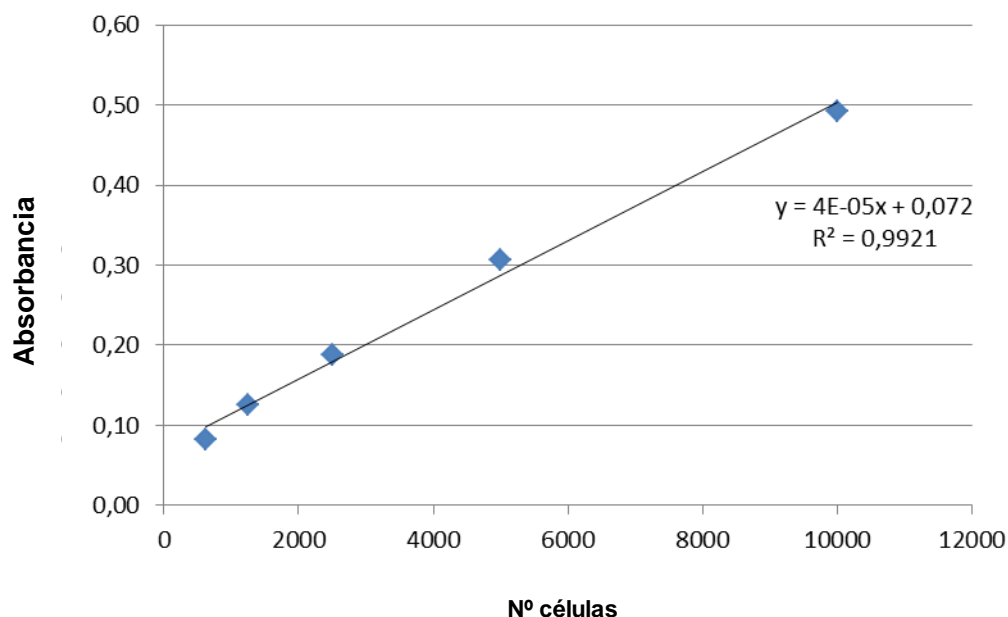
Por otro lado, se sembraron distintas concentraciones celulares para obtener una recta de calibrado que relacione el número de células con su absorbancia correspondiente, a las 24 horas tras la siembra (Figura 9 B).



**Figura 9 B.** Recta de calibrado que muestra la absorbancia vs el nº células en un cultivo HCE a las 24 horas de cultivo.

Al igual que para el caso de la línea celular establecida HCE, en los cultivos RPCE se estableció una relación entre la absorbancia y el número de células mediante ensayos colorimétricos con MTT (Figura 10).

Se observó que para el mismo número de células la densidad óptica (absorbancia) es mayor en el caso de los cultivos RPCE que en el caso de las HCE, por ello se decidió sembrar 2.500 células/pocillo en placas de 96 pocillos ( $0,32\text{ cm}^2$ ) para los ensayos con RPCE.



**Figura 10.** Recta de calibrado que muestra la absorbancia vs el número inicial de células por pocillo en cultivos primarios de conejo, RPCE, a las 24 horas de cultivo.

### 4.3. Ensayos de proliferación celular

Para evaluar la proliferación celular de los cultivos crecidos en presencia de los tres hemoderivados, se determinó la viabilidad a celular a distintos tiempos, empleando el método MTT.

Basándonos en los resultados de la curva de crecimiento celular se sembraron 3.000 células HCE o 2.500 células RPCE por pocillo en las placas de 96 pocillos de fondo plano. Una vez se adhirieron al fondo del pocillo y tras 16 horas en medio DMEN:F12 con BSA al 1%, éste se reemplazó por medio DMEN:F12 con suplementos y SBF al 10% o bien cada uno de los tres hemoderivados (AS, PRP o s-PRGF) al 10, 20 y 50% (Tabla 3). Después de 0, 24, 48 y 72 horas, la viabilidad celular se cuantificó mediante el método del MTT, descrito anteriormente. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y se repitieron tres veces.

La tasa de proliferación celular fue expresada como el ratio entre la absorbancia obtenida a los distintos tiempos respecto a la absorbancia al tiempo 0  $\pm$  la desviación estándar (SD).

**Tabla 3.** Medios de cultivo celular utilizados en los diferentes ensayos *in vitro*.

	<b>COMPONENTES DEL MEDIO PARA HCE</b>	<b>COMPONENTES DEL MEDIO PARA RPCE</b>
<b>Medio de cultivo habitual</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio DMEM:Ham´ s F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina</li> <li>✓ <u>Suplementos:</u> 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulina, 0,1 µg/ml toxina colérica, 0,5% DMSO.</li> <li>✓ SBF al 10%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio DMEM:Ham´ s F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina</li> <li>✓ <u>Suplementos:</u> 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulina, 0,1 µg/ml toxina colérica.</li> <li>✓ SBF al 10%</li> </ul>
<b>Medio de cultivo del periodo de latencia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio DMEM:Ham´ s F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina</li> <li>✓ BSA al 1%</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio DMEM:Ham´ s F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina</li> <li>✓ BSA al 1%</li> </ul>
<b>Medio de cultivo tratamientos hasta 72 horas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio DMEM:Ham´ s F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina,</li> <li>✓ <u>Suplementos:</u> 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulina, 0,1 µg/ml toxina colérica, 0,5% DMSO.</li> <li>✓ AS, PRP o s-PRGF al 10, 20 y 50% o SBF al 10%.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio DMEM:Ham´ s F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina,</li> <li>✓ <u>Suplementos:</u> 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulina, 0,1 µg/ml toxina colérica.</li> <li>✓ AS, PRP o s-PRGF al 10, 20 y 50%</li> </ul>

## 5. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

### 5.1. Microscopía óptica de contraste de fases

El análisis morfológico de los cultivos se realizó usando un microscopio invertido de contrastes de fases (Nikon Eclipse TS 100). Las imágenes se capturaron con el software ProgRes CapturePro 2.6. Con el fin de sacar fotos de calidad óptima las células se cultivaron en pocillos de un tamaño, como mínimo, de 3,8 cm<sup>2</sup> (placas de 12 pocillos) para que la refracción de la luz fuera la adecuada.

## 5.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se analizaron la ultraestructura y modificaciones morfológicas de las células de la línea celular establecida de epitelio corneal humano HCE, tras haber sido tratada con los distintos hemoderivados durante 14 días al 50%.

Para ello, las muestras biológicas se fijaron utilizando Glutaraldehido al 2,5% en tampón Sorenson 0,1 M pH 7,4. El tampón empleado como vehículo del fijador proporciona la osmolaridad, composición iónica y pH adecuados para la correcta actuación del Glutaraldehido. Este fijador preserva la ultraestructura extremadamente bien, mediante la formación de entrecruzamientos entre proteínas (Sabatini *et al.*, 1963), pero no estabiliza adecuadamente los componentes lipídicos de las membranas celulares. Por ello, es precisa una postfijación con Tetróxido de Osmio, que, además, confiere contraste a las muestras. El protocolo utilizado para la preparación de células adheridas a sustrato se detalla a continuación.

Se comprobó al microscopio que los cultivos se encontraban en condiciones óptimas para ser procesados, confluentes entre 80-90%. A continuación, se decantó el medio de cultivo y las células se sometieron a varios lavados con PBS al 1%. Seguidamente, se añadieron 5 ml del fijador Glutaraldehido al 2,5% en tampón Sorenson 0,1M a pH=7,4, y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Tras los 10 minutos, se despegaron las células del sustrato mediante un *cell scraper* de goma (Sigma-Aldrich, Ref: CLS3010), para mantener la estructura de las colonias celulares. Una vez se hubo raspado bien y comprobado que no quedaban células en el frasco, se decantó la suspensión celular en un tubo, sin utilizar la pipeta. A continuación se centrifugó 5 minutos a 200 g. El precipitado celular se pasó a un tubo tipo Eppendorf utilizando para ello 1 ml de la solución fijadora y una pipeta Pasteur. A partir de aquí, el servicio de microscopía analítica y de alta resolución en biomedicina de la Universidad del País Vasco UPV/EHU (SGIker) continuó con el procesamiento de las muestras.

Así, se fijaron con Glutaraldehido al 2% en tampón Sorenson durante 1-4 horas a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de 10 minutos con tampón Sorenson 0,1 M-sacarosa al 4% a 4° C y se dejó durante 16 horas en el tampón a 4° C. La sacarosa se utiliza para evitar un cambio demasiado brusco de osmolaridad, ya que la osmolaridad del fijador empleado es mucho mayor que la del tampón.

La postfijación se realizó con Tetróxido de Osmio (Sigma-Aldrich, Ref: O-5500) al 1% en tampón Sorenson durante 1 hora en oscuridad a 4° C. A continuación, tras tres lavados con tampón Sorenson de 10 minutos cada uno a 4° C, se procedió a la deshidratación. Para ello

se emplearon acetonas de gradación creciente (30, 50, 70, 90 y 100%) y pasos de deshidratación de 15 minutos cada uno. Previo a la inclusión, las muestras se sometieron a dos pases de 10 minutos en Óxido de Propileno (Fluka, Ref: 82325).

La mezcla de resina epoxi empleada para inclusión fue de Epon 812 (Bio-Rad, Epon Polarbed 812) con NMA (Nadic Methyl Anhydride) y DDSA (DoDecenyl Succinic Anhydride) como endurecedores, y DMP30 (2, 4, 6-tri Dimethylamino Methyl Phenol) como catalizador. Para la infiltración con el medio de inclusión se realizaron pases sucesivos en soluciones del agente deshidratante y del propio medio de inclusión, hasta que aquel fue reemplazado por completo por la mezcla embebadora final. De este modo, se realizó un primer pase por Óxido de Propileno/mezcla de resina 2:1 durante 1 hora a 4° C, un segundo pase por Óxido de Propileno/mezcla de resina 1:1 durante 1 hora a temperatura ambiente, un tercer paso por Óxido de Propileno/mezcla de resina 1:2 durante 1 hora a temperatura ambiente y, finalmente, la impregnación en la mezcla de resina pura durante toda la noche a temperatura ambiente. Tras este periodo de tiempo, se procedió a la inclusión de la muestra en cápsula de gelatina con resina pura nueva, dejando que polimerice durante 48 horas a 55° C.

Con el fin de evaluar histológicamente las muestras, se realizaron cortes semifinos de 1 µm de espesor, que se tiñeron con azul de Toluidina al 1% para ser observados mediante un microscopio Leitz DMRB. Igualmente, se realizaron secciones ultrafinas de 100 nm de espesor en un ultramicrotomo (Leic, modelo Ultracut UCT), que fueron depositadas en rejillas de níquel (Sigma-Aldrich, Ref: G5526) para su tinción. La tinción en microscopía electrónica consiste en aumentar el contraste del material biológico. A pesar de que el Tetróxido de Osmio empleado como fijador confiere a su vez contraste a estructuras celulares como membranas fosfolipídicas, lípidos insaturados y algunos grupos reactivos de proteínas, la tinción suele hacerse sobre los propios cortes ultrafinos en las rejillas de cobre, mediante Acetato de Uranilo (Merck, Ref: 8473) y Citrato de Plomo (se prepara según el método Reynolds). El primero tiñe ácidos nucleicos y proteínas, especialmente las fibras de colágeno. El segundo contrasta fuertemente el glucógeno y membranas. Finalmente, los cortes ultrafinos fueron observados mediante un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 208.

### **5.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Las muestras fueron procesadas en el Servicio General de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de la Universidad del País Vasco UPV/EHU (SGIker), para posteriormente observarlas bajo un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo

(Microscopio Hitachi S3400N, Hitachi, Tokio, Japón), con objeto de realizar un análisis de superficie de las células tras su cultivo durante 14 días con los distintos hemoderivados.

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón Sorenson 0,1M a pH=7,4, durante 1-4 h a 4° C. Posteriormente se lavaron tres veces durante 10-30 minutos con tampón Sorenson con sacarosa isosmolar (normalmente entre 4-8% de sacarosa) y se deshidrataron durante periodos de 15-30 minutos en soluciones de etanol progresivamente más concentradas (30°, 50°, 70°, 90° y 100°). Para la desecación de las muestras se realizaron dos lavados en hexametildisilazano durante 15-30 minutos y se dejaron secar al aire.

Finalmente, las muestras completamente deshidratadas y desecadas se colocaron sobre soportes especiales de microscopía electrónica de barrido de superficie circular utilizando para su adhesión a dicho soporte cinta adhesiva de carbono con doble cara. Se recubrieron con una capa de 20 nm de oro en un recubridor de plasma con atmósfera de Argón, asegurando así la conductividad eléctrica de toda la superficie de la muestra.

## 6. EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-qPCR

La técnica por excelencia asociada al análisis de los ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento concreto de DNA, fue desarrollada en 1983 por el grupo del Doctor Kary Mullis, el cual recibió en 1993 el Premio Nobel de Química por este descubrimiento (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Posteriormente se han desarrollado distintas variantes de la técnica de PCR. De esta manera, tenemos la PCR cuantitativa (qPCR) que combina la química de la PCR con el uso de las moléculas fluorescentes (sondas), con el fin de monitorizar la cantidad de productos de amplificación que se generan en cada ciclo de la PCR y conseguir cuantificar la cantidad de DNA presente en una muestra. En el caso de que el ácido nucleico a analizar sea RNA, como es nuestro caso, es necesario añadir un paso previo conocido como retrotranscripción ó RT, en el cual la enzima transcriptasa inversa sintetiza DNA complementario (cDNA) de doble cadena a partir de RNA monocatenario.

Para nuestros análisis de expresión génica mediante RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) seguimos las indicaciones de la guía MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin *et al.*, 2009).



### 6.1. Extracción y purificación de RNA total en la línea celular HCE

Se realizó la extracción de RNA a partir de células de epitelio corneal humano HCE cultivadas durante 14 días bajo distintas condiciones (AS al 50%, PRP al 50%, s-PRGF al 50% o SBF al 10% como control). Para ello, se utilizó el kit *RNeasy Mini kit* de Qiagen (Inc., Valencia, CA) y se siguieron las instrucciones indicadas por el fabricante. Todo el proceso se realizó a temperatura ambiente y con material estéril y libre de RNAsas. Las células en cultivo se disociaron con una solución enzimática de Tripsina-EDTA durante un máximo de 10 minutos a 37° C. A continuación, se añadió SBF para bloquear el efecto de la Tripsina-EDTA y se centrifugó a 170 g durante 5 minutos a 4° C. Tras desechar el sobrenadante, las células se resuspendieron en PBS al 1% y se hizo otra centrifugación para no dejar restos de medio. La extracción de RNA se realizó a partir de  $1,5 \times 10^6$  células. Se retiró el PBS para resuspender el precipitado celular en 350  $\mu$ l de una disolución que contenía 1 ml de tampón *RLT* con 10  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Ref: 63689 25ML-F) la cual al mismo tiempo que produce el lisado de las células y la disolución de los componentes celulares asegura el mantenimiento del RNA integro. Para conseguir una lisis celular completa, pipeteamos meticulosamente y homogeneizamos la muestra por vortex durante 1 minuto, lo que garantizó una buena homogeneización de la misma. Se añadió 350  $\mu$ l de etanol al 70% y se pipeteó vigorosamente. A continuación, se transfirió la mezcla a una columna de separación RNeasy y se centrifugó a 10.000 g durante 15 segundos para que el RNA se uniera a la membrana de gel de sílice. Se desechó el eluido y se colocó la columna en el mismo tubo colector. Para limpiar la columna se añadió 700  $\mu$ l de tampón de lavado *RW1* en la columna y se centrifugó a 10.000 g durante 15 segundos, tras lo que se desechó de nuevo el eluido. Llegado este punto se llevó a cabo el tratamiento con DNAsa, para lo cual se añadió en la columna 80  $\mu$ l de una solución que contenía 10  $\mu$ l de DNAsa y 70  $\mu$ l de tampón *RDD*, el cual asegura una digestión eficiente del DNA y una permanencia del RNA en la membrana de la columna. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (entre 20° y 30° C) y transcurrido este tiempo se añadió 700  $\mu$ l de tampón *RW1* y se centrifugó a 10.000 g durante 15 segundos. Tras desechar el eluido o pasar la columna a un nuevo tubo colector, se realizaron dos lavados con 500  $\mu$ l de tampón de lavado *RPE* cada uno, centrifugando a 10.000 g la primera vez durante 15 segundos y la segunda vez durante 2 minutos. Finalmente, se pasó la columna a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se eluyó el RNA en 30  $\mu$ l de agua DEPC, añadiéndolos directamente sobre la membrana de la columna y centrifugando a 10.000 g durante un minuto. El agua DEPC es agua ultrapura estéril que se mantiene libre de RNAsas gracias a un tratamiento previo con Dietilpirocarbonato (DEPC). Tras el correcto etiquetado de los tubos Eppendorf, las muestras de RNA total se

cuantificaron, y se analizó el estado del RNA en un minigel de agarosa. Seguidamente, el RNA fue almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para asegurar su integridad hasta su análisis.

## 6.2. Cuantificación de RNA

Para la cuantificación de la concentración de RNA total se utilizó un espectrofotómetro SmartSpec<sup>TM</sup>Plus de Bio-Rad con el cual se midió la absorbancia ( $A$ ) de cada muestra a las longitudes de onda de 260 nm ( $A_{260}$ ) y 280 nm ( $A_{280}$ ). Con arreglo a la ley de Lambert-Beer, existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la macromolécula, hasta un máximo de absorbancia de 1,2. La absorbancia máxima de soluciones de RNA se produce a una longitud de onda de 260 nm, mientras que soluciones de proteínas lo hacen a una longitud de onda de 280 nm. El cociente de los valores obtenidos a 260 nm y a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) proporciona una estimación del grado de pureza del RNA. El cociente  $A_{260}/A_{280}$  del RNA puro es aproximadamente de 2,0. Valores superiores o inferiores a este rango indican contaminación de la muestras.

Para la medida de la absorbancia de los ácidos nucleicos se emplearon cubetas de cuarzo, a las que se transfirió una dilución de la muestra a analizar. La muestra se diluyó 35 veces, llevando 2  $\mu\text{l}$  de la misma a un volumen final de 70  $\mu\text{l}$ . Tanto para hacer las diluciones como para el blanco se emplea agua ultrapura tratada con DEPC para el RNA.

A partir de la medida de la absorbancia a 260 nm también se puede calcular la concentración de ácido nucleico aislado, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \times \text{Factor de Dilución}$$

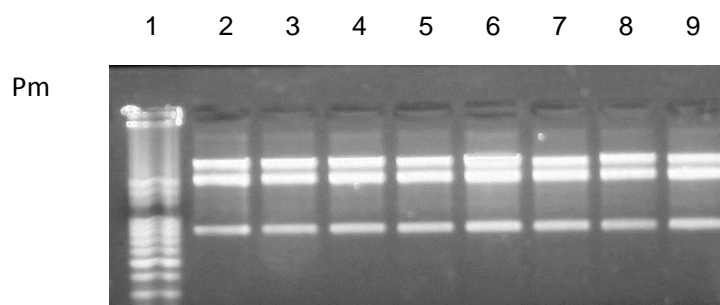
Ya que cada unidad de densidad óptica medido con una longitud de onda de 260 nm corresponde a 40  $\mu\text{g/ml}$  de RNA monocatenario.

La cantidad de RNA obtenida a partir de más o menos  $1,5 \times 10^6$  células de la línea HCE en cultivo con los distintos tratamientos tras 3, 7 y 14 días osciló entre 1-3,6  $\mu\text{g}$ . El cociente  $A_{260}/A_{280}$  en nuestras muestras fue de 1,8.

## 6.3. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se utilizó para la visualización y determinación de la calidad del RNA purificado, así como para visualizar y comprobar que el producto de PCR tiene el tamaño esperado. En esta técnica, se aplica un campo eléctrico que hace migrar a los ácidos nucleicos cargados negativamente a través del gel de agarosa hacia el ánodo o

polo positivo. El análisis electroforético de los ácidos nucleicos se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% en tampón TAE, aplicando un voltaje constante de 100 mA en una cubeta *Run One™ Electrophoresis Cell* de EmbiTec (San Diego, California). La primera calle del gel se reserva para el marcador de pesos moleculares y el resto de calles se cargan con 5 µl de muestra. El marcador de peso moleculares utilizado fue *100 pb DNA Ladder Plus* de BioChain Institute (Bruselas, Bélgica). Para la visualización de las bandas, se añadió una solución de bromuro de etidio a los geles, a una concentración de 5 µl de bromuro de etidio por cada 100 ml de agua. Tras lavar el gel con agua durante 10 minutos, los geles son irradiados con luz ultravioleta de longitud de onda de 254 nm y fotografiados (Figura 11) en el sistema de documentación de geles G:BOX de SYNGENE con el programa GeneSnap de Izasa (L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona).



**Figura 11.** Visualización mediante minigel de agarosa de la calidad del RNA total purificado de muestras al azar de células HCE en cultivo. 1) Marcador de pesos moleculares: *100 pb DNA Ladder Plus* de BioChain Institute (Bruselas, Bélgica), 2-9) distintas muestras de la línea celular HCE.

#### 6.4. Retrotranscripción

La estrategia más usada en la reacción de retrotranscripción es la adición de un oligo (dT) como cebador, que consiste en una secuencia de 18-20 nucleótidos que contiene solamente timinas, lo que le permite hibridar con la cola de poli-A del RNAm de la mayoría de organismos eucariotas. La enzima transcriptasa inversa es la encargada de sintetizar DNA de la secuencia complementaria a la del RNAm que actúa como molde.

En la reacción de retrotranscripción se utilizó el *iScript™ cDNA Synthesis kit* de BioRad (Hercules, CA), y se siguieron las instrucciones del fabricante como se detalla a continuación: el cDNA se sintetizó a partir de 0,5 µg de RNA para cada muestra. Primero se mezcló 0,5 µg de RNA total con 4 µl de *5x iScript Reaction Mix* y 1 µl de *iScript Reverse Transcriptase*, y se añadió agua DEPC hasta un volumen final de 20 µl. La reacción tuvo lugar mediante incubación en el termociclador “*iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System*” de Bio-Rad. El programa utilizado fue el siguiente: 25° C durante 5 minutos para el anillamiento del cebador oligo-d(T), seguido de 42° C durante 30 minutos

para la síntesis de cDNA por la enzima transcriptasa inversa, y 5 minutos a 85° C para la elongación. Se finalizó con un último paso opcional a 4° C hasta que se retira la muestra. El cDNA se almacenó a -20° C para su correcta conservación hasta el momento del análisis por PCR.

## 6.5. Elección de cebadores

Un cebador o *primer* es una secuencia corta de ácido nucleico complementaria a una hebra molde, y que sirve como punto de partida para la replicación del DNA. El uso de cebadores es necesario porque la enzima que cataliza la replicación del DNA, que se denomina DNA polimerasa, no puede empezar a sintetizar una nueva cadena de DNA de la nada, sino que solo puede añadir nucleótidos al grupo 3'hidroxilo libre de una hebra preexistente. Para la elección de los cebadores se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva, de donde obtuvimos varios de los cebadores utilizados (Tabla 4).

Por otro lado, se empleó el programa *Primer3 v. 4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), software que permite especificar un gran número de variables y obtener *primers* según las indicaciones solicitadas. Éste permite agregar el número de acceso de la secuencia que se halla en las bases de datos internacionales, discriminar las regiones de la secuencia que se deben incluir, las que se deben excluir y el rango de tamaños del amplicón a obtener. Por otra parte, el software incluye la posibilidad de especificar las características mínimas de los primers deseados, como temperatura de fusión ( $T_m$ , del inglés *Melting Temperature*) del amplicón, porcentaje de GC, máxima autocomplementariedad, y otros parámetros.

Por último, para el diseño de algunos cebadores se utilizó la base de datos PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), que proporciona información sobre cebadores descritos para la detección y cuantificación de expresión génica, cuyos datos son recopilados de artículos publicados y citados en PubMed. Aun así, los cebadores sugeridos en esta base de datos se analizaron también con el programa *Primer3 v. 4.0* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) para comprobar que cumplen los requisitos adecuados para la PCR. Una vez seleccionados los cebadores, se realizó una búsqueda de tipo BLAST en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) para verificar que los cebadores diseñados tenían una única secuencia complementaria en todo el genoma, y por tanto se unirían sólo en la posición deseada que se quería estudiar.

Todos los cebadores fueron sintetizados comercialmente por Isogen Life Sciences (Polígono Les Guixérés, Edifici BCIN, 08915 Badalona, España). Las secuencias de los pares de cebadores, el tamaño de los correspondientes fragmentos amplificados, la temperatura de anillamiento, el rango dinámico y la fuente o referencia se detallan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Parejas de cebadores y condiciones usadas en los ensayos de RT-qPCR.

Gen	Fuente/Referencia	Cebador directo (5'-3') Cebador inverso (5'-3')	Optimización curva estándar	Tamaño amplicón (pb)	T <sup>a</sup> anillamiento (° C)
<b>CX-26</b>	Ezumi <i>et al.</i> , 2008	GCTGCAAGAACGTGTGCTAC TGGGTTTTGATCTCCTCGAT	r =0,992; Eficacia =98,7% Rango dinámico 28,6 - 37,1 Ct	196 bp	65° C
<b>CX-30</b>	Primer 3/ Shurman <i>et al.</i> , 2005	TGCTTAACGTGGCAGAGTTG GGTTGGTATTGCCTTCTGGA	r =0,99; Eficacia =80% Rango dinámico 24,5 - 32 Ct	244 bp	60° C
<b>CX-31.1</b>	Primer 3/ Shurman <i>et al.</i> , 2005	CCTGAGTGGGGTCAACAAGT GGGACACAGGGAAGAACTCA	r =0,99; Eficacia =90,4% Rango dinámico 25,2 - 34 Ct	191 bp	65° C
<b>CX-43</b>	Chen <i>et al.</i> , 2004	CCTTCTTGCTGATCCAGTGGTAC ACCAAGGACACCACCAGCAT	r =0,999; Eficacia =98,7%	154 bp	60° C
<b>INTEGRINA α6</b>	PrimerBank ID 4557675a1	ATGCACGCGGATCGAGTTT TTCCTGCTTCGTATTAACATGCT	r =0,998; Eficacia =93,2% Rango dinámico 21 - 31 Ct	160 bp	60° C
<b>INVOLUCRINA</b>	PrimerBank ID 5031813a1	TCCTCCAGTCAATACCCATCAG GCAGTCATGTGCTTTTCCTCTTG	r =0,999; Eficacia =99,7% Rango dinámico 24 - 31 Ct	126 bp	60° C
<b>GAPDH</b>	Jangi <i>et al.</i> , 2008	CCTGTTTCGACAGTCAGCCG CGACCAAATCCGTTGACTCC	r =0,999; Eficacia =88,8% Rango dinámico 13,5 - 28 Ct	102 bp	56° C
<b>β-ACTINA</b>	Arroyo-Berdugo <i>et al.</i> , 2014	AGATGACCCAGATCATGTTTGAG GTCACCGGAGTCCATCACG	r =0,999; Eficacia =98,7% Rango dinámico 13 - 26,6 Ct	119 bp	60° C
<b>RIG/S15</b>	Andollo <i>et al.</i> , 2006	TTCCGCAAGTTCACCTACC CGGGCCGGCCATGCTTTACG	r =0,999; Eficacia =84% Rango dinámico 17,8 - 28,6 Ct	361 bp	60° C

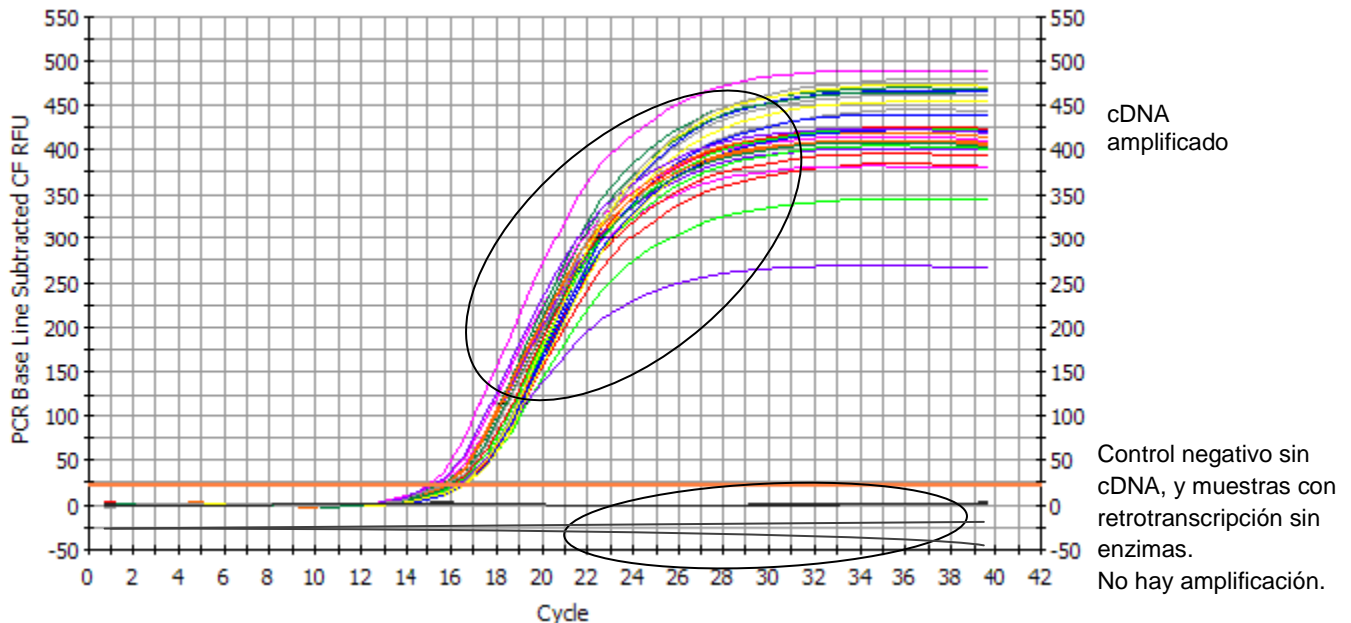
## 6.6. RT-qPCR con SYBR Green

Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo en un termociclador *iCycler MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad, utilizando el fluorocromo SYBR Green. Este fluorocromo se une específicamente a ácidos nucleicos de doble hebra emitiendo fluorescencia a 528 nm, de modo que al aumentar la cantidad de productos de PCR sintetizados, aumenta la intensidad de fluorescencia, lo que permite registrar el avance de la reacción de PCR a tiempo real a través del software MyiQ (Bio-Rad). Se debe tener en cuenta que los fluoróforos de este tipo no son de unión específica a un fragmento en particular, teniendo el inconveniente de la posible aparición de falsos positivos. Para evitar esto, es indispensable la optimización del proceso asegurándose la ausencia de DNA contaminante en la muestra y el análisis de disociación, donde la presencia de varios fragmentos de PCR se refleja en el número de picos de disociación. Como la PCR es una herramienta de detección muy sensible, se puede amplificar fragmentos de DNA contaminante, dando lugar a los conocidos “falsos positivos” que pueden sobreestimar la cantidad de expresión génica con fragmentos de amplificación de un origen distinto a los de cDNA. Para la eliminación de DNA contaminante, las muestras de RNA se tratan con la enzima DNAsa, y la comprobación de la eliminación de cualquier resto de DNA contaminante se lleva a cabo incluyendo en las RT-qPCR muestras donde la retrotranscripción se ha realizado sin enzima iScript Reverse Transcriptase (control RT minus). Si la DNAsa ha funcionado correctamente y el DNA ha sido eliminado, el resultado de la qPCR de estas muestras debe ser negativo, es decir, no se debe ver producto de amplificación. En la figura 12 se muestra como ejemplo las curvas de amplificación para el gen *β-actina*. En la placa de PCR se colocaron los controles negativos sin cDNA, los triplicados de cDNA para la línea celular HCE sometida a distintos tratamientos, y muestras donde la retrotranscripción se había realizado sin enzima. Se puede observar la ausencia de curvas de amplificación para el control negativo sin cDNA y para las muestras de RNA con retrotranscripción sin enzima, confirmando la ausencia de DNA contaminante.

Para la reacción de PCR, la mezcla de reacción se constituye con 10 µl de la mezcla maestra *iQTM SYBR® Green Supermix*, 8 µl de agua DEPC, 0,5 µl de cada cebador (dilución 1:5 de un stock de concentración 50 µM) y 1 µl de cDNA. Las condiciones térmicas de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: un ciclo inicial de 95° C durante 3 minutos (activación de la polimerasa), seguido de 40 ciclos con un primer paso de desnaturalización a 95° C durante 20-30 segundos, un segundo paso de anillamiento de los cebadores que es específica de cada pareja de cebadores y varía entre 56-65° C (Tabla 4) durante 20-30 segundos, y un tercer paso de elongación que tiene lugar a 72° C durante 20-30 segundos. A continuación, hay un ciclo a 95° C durante 1 minuto seguido de otro ciclo de

1 minuto a 65° C, para finalizar con una rampa de temperatura de 65° C a 95° C, que se consigue en 60 ciclos aumentando la temperatura 0,5° C por ciclo. La PCR termina con un paso denominado de conservación, donde los productos de PCR se dejan a 4° C hasta que el usuario apaga el equipo. Los productos de PCR se almacenaron a 4° C hasta su análisis en minigeles de agarosa.

### PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490



**Figura 12.** Curvas de amplificación para el gen  $\beta$ -actina en cultivos de la línea celular HCE.

El protocolo de disociación, constituido por la rampa de temperatura donde aumenta gradualmente la temperatura de 65° C a 95° C, induce la separación de las hebras de DNA sintetizadas durante la PCR cuando se alcanza la temperatura de fusión ( $T_m$ , del inglés *Melting temperature*) correspondiente a cada amplicón. Cuando las hebras de DNA se separan, el agente intercalante SYBR Green se separa de ellas y deja de emitir fluorescencia, lo que el equipo representa en forma de pico de fluorescencia. Esta función permite descartar la presencia de productos de amplificación múltiples, que presentarían diferentes valores de  $T_m$ , y detectar la presencia de dímeros formados por los cebadores a temperaturas de aproximadamente 75° C, mientras que los productos de PCR de longitudes mayores de 100 pb suelen estar representados por valores de  $T_m$  mayores.

A lo largo de la RT-qPCR, la emisión de fluorescencia se divide en 4 fases principales:

- 1) La fase inicial, en la cual la fluorescencia de los primeros ciclos es mínima y no rebasa el ruido de fondo (en inglés conocido como *background*) del medio circundante.
- 2) La fase exponencial temprana, en la cual la fluorescencia producida por el producto de PCR rebasa

un umbral definido por el investigador, y conocido como *threshold*. El ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el *threshold* se conoce como ciclo umbral (Ct, del inglés *Cycle Threshold*). Desde 2009, año en el que se publicó la guía MIQE, este ciclo ha pasado a denominarse por consenso Cq (*Quantification Cycle*). Este valor es el que se utiliza en los cálculos posteriores ya que es representativo de la cantidad inicial de muestra que hay en la reacción. Cuanto más bajo es el valor de Cq, mayor es el número de copias del cDNA en la reacción. 3) La fase lineal, en la cual se alcanza un estado de amplificación óptima, en donde la cantidad de producto de PCR se dobla en cada ciclo. 4) Y finalmente, la fase meseta o estacionaria, en la cual los reactivos y el equipo han alcanzado el límite de detección y la reacción ha terminado (Wong & Medrano, 2005).

Las muestras se amplificaron por triplicado, incluyendo también controles negativos (sin cDNA) para comprobar la ausencia en las curvas de amplificación de dímeros de los cebadores, así como muestras RT minus para confirmar la ausencia de DNA contaminante. Una vez concluida la reacción, y comprobada la presencia de productos de amplificación únicos, se cuantificaron los niveles transcripcionales de cada gen a partir de los valores de Cq, usando el Software Sistema de Detección de un solo color en tiempo real de PCR MyiQ versión 1.0 (Bio-Rad).

Se hicieron dos experimentos de cultivo para cada gen en estudio, obteniéndose un cDNA de cada uno de los experimentos, y por cada cDNA dos RT-qPCRs, calculándose así la media y la desviación estándar a partir de las doce réplicas de cada muestra de RNA.

### 6.7. Optimización de las parejas de cebadores

La temperatura de anillamiento (proceso físico en el que se da la asociación específica y complementaria de dos cadenas sencillas de ácidos nucleicos) que se escoge para cada pareja de cebadores depende directamente de la longitud y composición de estos. Por ello, para determinar la temperatura de anillamiento óptima de cada pareja se realizaron experimentos de gradiente de temperatura, el cual permite programar diferentes temperaturas de anillamiento simultáneamente.

Por otra parte, se realizó un ensayo de diluciones seriadas de cDNA con cada pareja de *primers*, para generar una curva estándar lineal con un mínimo de 4 puntos. A partir de esta curva, se calcula la eficiencia, el coeficiente de correlación y el rango dinámico (Tabla 4).

Así, la **eficiencia** se calcula a partir de la pendiente de la curva mediante la fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente de la curva})}$$

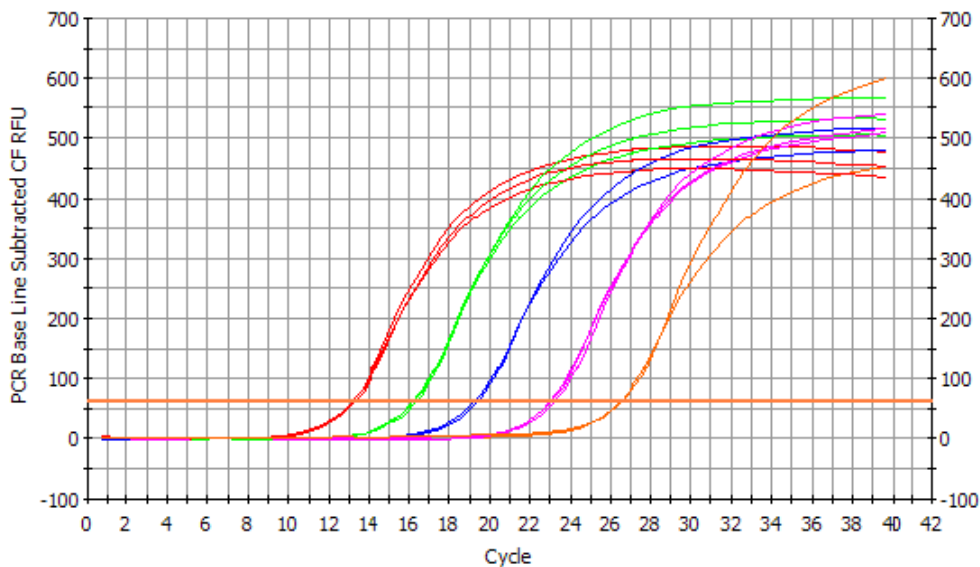


Esta fórmula proporciona resultados de eficiencia entre 1 y 2. Para expresar la eficiencia en porcentaje, se puede convertir este valor empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia (\%)} = (E-1) \times 100$$

En la figura 13 se muestra como ejemplo las curvas de amplificación de la  $\beta$ -actina con diluciones seriadas 1:10 de cDNA. El número de copias del amplicón se incrementa por un factor de 1,98 en cada ciclo, lo que significa una eficiencia del 98%.

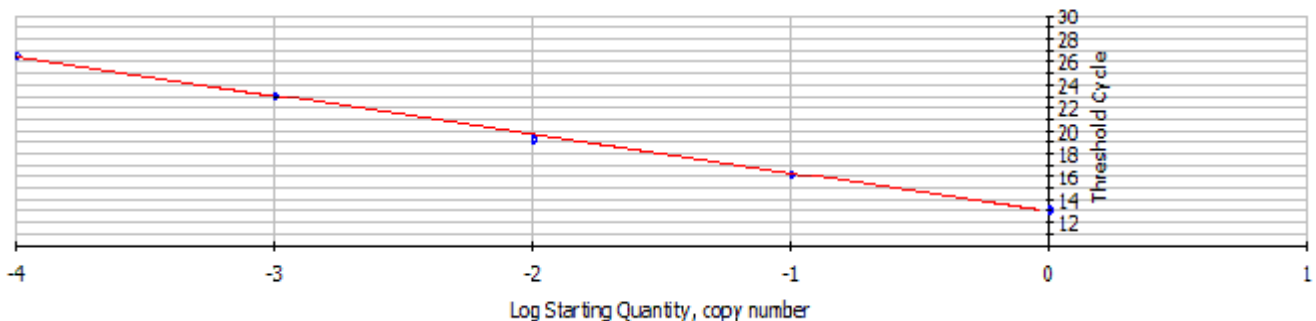
**A) PCR Amp/Cycle Graph for SYBR-490**



**B) Standard Curve Graph for SYBR-490**

Correlation Coefficient: 0,999 Slope: -3,353 Intercept: 13,026  $Y = -3,353X + 13,026$   
 PCR Efficiency: 98,7 %

□ Unknowns  
 ● Standards

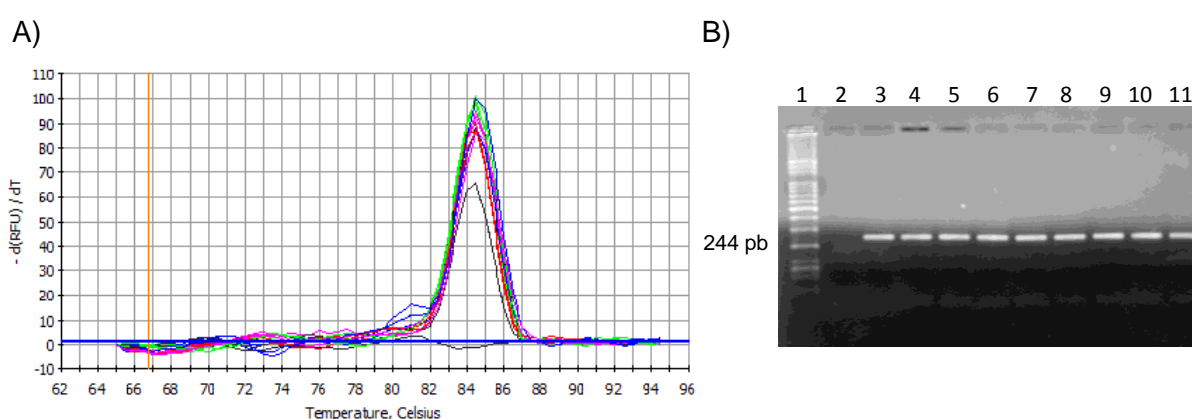


**Figura 13.** Optimización de la pareja de cebadores para la amplificación de la  $\beta$ -actina. (A) Curvas de amplificación del gen  $\beta$ -actina para cinco diluciones seriadas 1:10. (B) Curva estándar lineal para el cálculo de la eficiencia, el coeficiente de correlación y el rango dinámico de la pareja de cebadores utilizados para la amplificación de la  $\beta$ -actina.

Todas las parejas de cebadores utilizadas en el estudio mostraron eficiencia superior al 80%.

En cuanto a **los coeficientes de correlación** siempre han dado valores por encima de 0,99, lo que indica que el número de Cq varía linealmente con la concentración de cDNA. El ensayo de diluciones seriadas, también informa del **rango dinámico** o **rango de Cqs**, para los cuales la pareja de *primers* está optimizada; es decir, el rango de Cqs en los que la eficacia es cercana al 100% y el coeficiente de correlación superior a 0,99. Los Cqs obtenidos en las RT-qPCR de expresión deben estar dentro de dicho rango dinámico (Tabla 4).

El análisis de la curva de disociación de cada ensayo de RT-qPCR (Figura 14 A) y el análisis de electroforesis en minigel de 1,5% de agarosa (Figura 14 B) de muestras seleccionadas al azar se realizó para confirmar que la señal de fluorescencia se debe únicamente a la amplificación del gen en estudio. Para que la amplificación sea específica debe aparecer un único pico en la curva de disociación y una única banda en el gel de agarosa.



**Figura 14.** Comprobación de la existencia de un único producto de amplificación tras RT-qPCR. (A) Curvas de disociación para el gen Cx-30 en triplicados de la línea celular HCE. La presencia de un único pico indica la existencia de un solo producto de amplificación. (B) Amplificación específica en minigel de agarosa de la Cx-30 tras 14 días de cultivo con los distintos tratamientos: 1) Marcador de pesos moleculares: *100 pb DNA Ladder Plus* de BioChain Institute (Bruselas, Bélgica), 2) Control negativo sin cDNA, 3-11) línea celular HCE.

## 6.8. Controles endógenos

La medida de la expresión génica en el presente trabajo es una cuantificación relativa, en la que se compara la expresión del gen objeto de estudio respecto a la expresión de un gen constitutivo o control endógeno (en inglés *housekeeping*) para cada muestra. La normalización respecto al gen endógeno asume que si la cantidad de control endógeno varía es debido a cambios en la cantidad de RNA total empleada en la síntesis de cDNA y no a cambios en su expresión. Sin embargo, no existe ningún gen cuya expresión no varíe

en ninguna de las condiciones, por lo que el usuario debe valorar cual es el mejor control endógeno para su experimento. Por ello, es recomendable testar varios genes para seleccionar el más adecuado. En el presente trabajo, para determinar cuáles son los genes de referencia más estables se empleó el programa geNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Los principios básicos y las fórmulas de este programa se describen en un artículo publicado por Vandesompele, donde propone un método de normalización basado en la media geométrica de varios controles endógenos (Vandesompele *et al.*, 2002). Los resultados del programa geNorm (versión 3.5) indicaron que la mejor opción en muestras condiciones experimentales era la normalización de los datos utilizando los tres controles endógenos probados: *GAPDH*,  $\beta$ -actina y *RIGS15*.

### 6.9. Análisis de los resultados de la RT-qPCR

Se ha utilizado el programa informático *Gene Expression Macro*<sup>™</sup> versión 1.1 (Bio-Rad) para el análisis de los resultados obtenidos en la RT-qPCR, el cual normaliza los datos de expresión obtenidos a partir de los genes estudiados respecto a la de los controles endógenos. Este programa es una aplicación creada con Microsoft Excel donde se calcula el  $\Delta\Delta Cq$  mediante los algoritmos descritos por Livak y Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001) y la utilización de varios controles endógenos propuesto por Vandesompele (Vandesompele *et al.*, 2002). Este método se basa en una cuantificación relativa, que además permite tener en cuenta la eficiencia obtenida para cada gen individual a través de las modificaciones realizadas por Pfaffl sobre la ecuación de Livak y Schmittgen (Pfaffl, 2001).

En una reacción de PCR con una eficiencia perfecta, la cantidad o número de copias de moléculas de cDNA se duplican en cada ciclo. Sin embargo, debido a una serie de factores esto rara vez ocurre en condiciones experimentales. Por este motivo, la posibilidad de introducir la eficiencia de cada pareja de cebadores puede llegar a ser de suma importancia según la eficiencia se aleje del 100%.

En el método utilizado se comparan directamente los Cqs del gen en estudio y genes endógenos ( $\Delta Cq$ ) en cada muestra, y posteriormente se comparan los  $\Delta Cq$  de la muestra experimental con respecto a la muestra control ( $\Delta\Delta Cq$ ).

Para cada gen, se ha elegido como muestra control la muestra 14 días en cultivo con medio de cultivo habitual, y se le ha asignado un valor 1. A continuación, el programa informático muestra los valores relativos para el resto de muestras en relación a la muestra control. Las diferencias de expresión se consideraron estadísticamente significativas en un intervalo de confianza al 95% para la media de expresión de los cultivos.

## 7. ENSAYOS DE REEPITELIZACIÓN

### 7.1. Reepitelización *in vitro*

La reepitelización *in vitro* se evaluó tras sembrar 25.000 células HCE o 20.000 células RPCE por pocillo en placas de 96 pocillos. Una vez se adhirieron al plástico y formaron una monocapa celular se mantuvieron en ausencia de suero, en medio DMEN:F12 con BSA al 1% durante 16 horas. Tras ese tiempo, se provocó mecánicamente, con un objeto de punta roma estéril, una erosión circular en la monocapa celular (desepitelización), observándose limpiamente el plástico del pocillo. Tras la erosión, se fotografiaron todos los pocillos con un microscopio de contraste de fases, y se capturaron las imágenes con el software ProgRes CapturePro 2.6. El tamaño del área desepitelizada de cada pocillo fue determinado usando el programa Image J (desarrollado por Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Los pocillos se distribuyeron homogéneamente (en base al área de cada erosión) entre las distintas condiciones a evaluar. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó por medio con uno de los distintos hemoderivados (AS, PRP o s-PRGF) al 50% o medio DMEN:F12 con BSA al 1% como control. Para los cultivos HCE, los hemoderivados evaluados fueron de sangre humana, mientras que en los cultivos primarios de conejo de RPCE los hemoderivados fueron obtenidos a partir de sangre de conejo. Se fueron haciendo registros fotográficos con el microscopio de contraste de fases cada 12 horas, y calculando el área de la lesión aun sin cubrir. Así, se analizó a lo largo del tiempo la velocidad de reepitelización de las células *in vitro*, es decir la capacidad para migrar y cubrir la erosión de la monocapa de las células HCE y RPCE.

El tamaño de las áreas erosionadas (área de la monocapa sin cubrir) se expresó como la media del área sin cubrir  $\pm$  SD en mm<sup>2</sup> para cada tiempo estudiado. Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado (6 pocillos) y se repitieron con tres cultivos diferentes (réplicas biológicas) de HCE, así como con cultivos RPCE de tres conejos diferentes.

Paralelamente, se repitió el ensayo en placas de 12 pocillos para obtener imágenes del proceso de reepitelización con calidad fotográfica óptima.

### 7.2. Reepitelización *in vivo*

De acuerdo con los procedimientos y diseños experimentales aprobados por el comité ético de experimentación animal de la UPV/EHU, empleamos 16 conejos *New Zealand White* de alrededor de 2-2,5 kg de peso. Los animales se estabularon en el Servicio General de Animalario de la UPV/EHU (SGIker). Primero se realizó una cirugía de desepitelización

mecánica en el ojo derecho de todos los conejos y tras un periodo de aclaramiento (tres semanas) para eliminar a nivel sistémico las trazas de los fármacos administrados, se repitió la cirugía en el ojo izquierdo.

Previo a los procesos quirúrgicos, los conejos se anestesiaron intramuscularmente con 1 ml/kg de Ketamina (Ketolar® 50 mg/ml. Pfizer, Madrid, España) y 0,3 ml/kg Xilacina (Xylagesic 20 mg/ml, Laboratorios Calier SA, Barcelona, España). Se colocó un trépano corneal de 9 mm sobre la córnea central. A continuación, se pusieron unas gotas de etanol al 20% dentro del trepano, y 10 segundos después se eliminaron con esponjas oftálmicas, retirando a continuación el trepano.

Inmediatamente después, la superficie ocular se enjuagó con solución salina balanceada oftálmica (BSS, Alcon Laboratories, Inc. Fort Worth, Texas 76134 USA) (Ref: NDC0065-0795-15) y con un cuchillito oftálmico se retiró el epitelio que se encontraba dentro de la marca circular delimitada por el trépano.



**Figura 15.** Ojo de conejo tras la cirugía. La superficie ocular desepitelizada se observa teñida por la tinción de fluoresceína.

Tras la operación y hasta que el defecto epitelial fue solventado completamente, todos los conejos fueron tratados tópicamente dos veces al día con pomada oftálmica antiinflamatoria y antibiótica (Oftalmolosa Cusí De Icol®, Alcon Cusí SA, Barcelona, España) y gotas analgésicas tópicas (Voltaren®, Allergan, Inc, Irvine, CA, USA). Además, se les aplicó cuatro veces al día el tratamiento a evaluar en cada caso. Para esto, los conejos fueron distribuidos aleatoriamente en cada operación, en los siguientes grupos: Grupo 1) AS 100% (n=8); Grupo 2) PRP 100% (n=8); Grupo 3) s-PRGF 100% (n=8), y Grupo 4) lágrimas artificiales (Oculotec, Laboratorios Alcon, España) (n=8) como grupo control. Para evaluar la progresión del defecto epitelial hasta su cierre, se fotografiaron los ojos de los conejos con y sin fluoresceína (Colircusí Fluotest®; Alcon Cusí SA, Barcelona, España) (Figura 15 y 16) dos

veces al día, siempre a las mismas horas del día y utilizando una regla como referencia colocada en el mismo plano que la superficie ocular. La fluoresceína tiñe las zonas desepitelizadas, permitiendo así cuantificar esta área en cada fotografía, mientras que en las fotografías sin fluoresceína se pueden observar el resto de síntomas como neovascularización o hiperemia. La cuantificación del área desepitelizada se realizó mediante el programa ImageJ, midiendo por triplicado el defecto del epitelio de cada fotografía con una desviación estándar menor que el 10%. Los resultados se expresaron como la media del área del defecto dentro de cada grupo  $\pm$  SD en mm<sup>2</sup>.



**Figura 16.** Manipulación del animal para la instilación del tratamiento.

## 8. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS CÓRNEAS

Después de que ambos ojos de los 16 conejos *New Zealand White* del experimento de reepitelización *in vivo* fueron intervenidos y el defecto epitelial recuperado, (habiendo pasado 1 mes desde la cirugía en el ojo derecho y 7 días desde la cirugía en el ojo izquierdo), los conejos fueron humanamente sacrificados bajo anestesia general profunda (Ketolar ® 50 mg/ml, Pfizer 2 ml/kg + Xylacina 20 mg/ml 0,6 ml/kg), utilizando una solución endovenosa de 10 ml de KCl saturada. Una vez se extrajeron las córneas, se realizaron tres lavados de cinco minutos en medio Hank's + penicilina-Streptomicina 1X + Anfotericina 1X. Las córneas se sometieron a tres lavados de cinco minutos con PBS al 1% y se fijaron en formaldehído al 4% durante 24 horas a 4° C. Después de la fijación, se eliminó el área periférica de la córnea extirpada y el tejido restante (córnea central) se cortó por la mitad. Los fragmentos de córnea se lavaron en una solución salina fosfato tamponada, se deshidrataron en soluciones graduales crecientes de etanol hasta etanol de 100° y se incluyeron en parafina líquida a 60° C. Tras su solidificación a temperatura ambiente se obtuvieron secciones histológicas de 5 micras con un microqueratomo (Shanon Científico Finesse 325). Los cortes se calentaron para eliminar la parafina por completo, y se sometieron al siguiente protocolo para su tinción con hematoxilina-eosina: hidratación con

soluciones de etanol progresivamente menos concentradas (100°, 100°, 96°, 96°, 70° y 50°) (10 segundos en cada uno), tinción con hematoxilina (2,5 minutos), lavado con H<sub>2</sub>O clorhídrica 0,5% (3 segundos), tinción con eosina (25 segundos), deshidratación con soluciones de etanol progresivamente más concentradas (70°, 96°, 100° y 100°) (10 segundos en cada uno) y por último aclarado con dos baños de xilol (5 minutos cada uno). Se realizó un lavado con agua destilada entre cada uno de los pasos anteriores.

Con esta técnica, la hematoxilina, tiñe las estructuras ácidas de azul púrpuro (los núcleos, ribosomas y retículo endoplasmático rugoso), y la eosina, tiñe estructuras básicas de rojo o rosa. En general, con la tinción de hematoxilina-eosina se observan los núcleos celulares del tejido de azul, y el citoplasma de rosa a rojo, ya que la mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas.

La observación de las secciones teñidas se realizó mediante microscopía de luz transmitida (Nikon Eclipse TS 100). Se capturaron imágenes de los tejidos con el software ProgRes Capture PRO 2.6. Se evaluó la regeneración epitelial, infiltración celular y la integridad estructural; teniendo en cuenta el nº de capas celulares reepitelizadas tras la cicatrización así como la estructura del epitelio regenerado.

## 9. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se hizo un análisis de los resultados mediante estadística descriptiva y comparación de medias:

- Valores estadísticos de posición: Media aritmética ( $\bar{x}$ ): ayuda a expresar el valor medio del conjunto de valores.
- Valores estadísticos de dispersión: son indicadores del grado de homogeneidad con que se agrupan los valores alrededor de las medias de la tendencia central. Reflejan la dispersión de los datos estudiados para las distintas variables, en nuestro caso se utiliza la desviación estándar.
- Contraste de hipótesis estadística: consiste en analizar si es significativa o no la diferencia entre la media en las muestras y el valor supuesto control del parámetro. La presencia de esta característica se mide por el valor de 'p' (probabilidad). Se ha considerado diferencia significativa una  $p < 0,05$ .
- Pruebas de homogeneidad:

- *t de Student*. Test paramétrico que se basa en la suposición de que los datos están muestreados de una población que sigue una distribución normal. Permite comparar dos medias muestrales obtenidas de dos grupos que difieren en un factor (por ejemplo tratamiento) para analizar si entre ellos existen diferencias significativas. La diferencia significativa nos confirma que es muy poco probable que esta diferencia pueda ser explicada al azar.
- *U de Mann-Witney*. Test no paramétrico, equivalente a la *t* de Student, que se utiliza cuando la población no sigue una distribución normal.
- Chi cuadrado ( $X^2$ ): en el contraste de hipótesis, esta prueba nos permite comparar la homogeneidad de la distribución de dos variables cualitativas.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS 18.0 (SPSS Sciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos).





# Resultados



## 1. CUANTIFICACIÓN DE PLAQUETAS EN SANGRE Y DE FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS HEMODERIVADOS HUMANOS

La concentración de plaquetas en las muestras de sangre de cada uno de los 16 voluntarios se cuantificó mediante citometría de flujo, obteniendo una media de  $193,42 \times 10^6 \pm 51,58 \times 10^6$  plaquetas/ml. Si diferenciamos por sexo, para las mujeres se obtuvo una media de  $204,8 \times 10^6 \pm 56,6 \times 10^6$  y para los hombres  $171,9 \times 10^6 \pm 44,1 \times 10^6$  plaquetas/ml. En el recuento plaquetario no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos rangos de edades ni entre los dos sexos (Tabla 1).

**Tabla 1.** Número de plaquetas en las muestras de sangre de los 16 voluntarios que participaron en este estudio, representadas por rangos de edad y/o por sexo en número de plaquetas  $\times 10^6$ /ml.

EDAD (años)	30-39		40-49		50-59	
MEDIA $\pm$ SD	169,7 $\pm$ 27,2		212,1 $\pm$ 36,8		203,7 $\pm$ 73,5	
	↓	↓	↓	↓	↓	↓
	MUJER	HOMBRE	MUJER	HOMBRE	MUJER	HOMBRE
MEDIA $\pm$ SD	161,6 $\pm$ 39,6	179,7 $\pm$ 5,2	226,3 $\pm$ 28,8	197,9 $\pm$ 49,4	226,4 $\pm$ 66,4	158,3 $\pm$ 87,2

Una vez obtenidas las tres preparaciones (AS, PRP y s-PRGF) a partir de la sangre de cada voluntario (media de edad  $44,25 \pm 9,22$  años), tal como se describe en el apartado de materiales y métodos, se cuantificó la concentración de distintos factores de crecimiento en cada uno de ellas mediante ensayos inmunoenzimáticos (Tabla 2).

Los resultados mostraron que los niveles de EGF fueron significativamente mayores en el s-PRGF al comparar con los otros dos preparados. Además, en el PRP, en el cual no se ha producido el proceso de coagulación, los niveles fueron menores que en los otros dos hemoderivados, siendo estadísticamente significativo al comparar con el s-PRGF. Asimismo, cuando comparamos los resultados por rangos de edad para este factor se observaron diferencias estadísticamente significativas del PRP respecto a AS y s-PRGF dentro de cada rango de edad (Figura 1).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de FGF de los distintos preparados. Sin embargo, se observó que la concentración de este factor es dependiente de la edad. Así, la media de los niveles de FGF de los voluntarios jóvenes ( $88,94 \pm 9,04$  pg/ml) fue mayor que la media correspondiente a los grupos de edad de 40-49

## Resultados

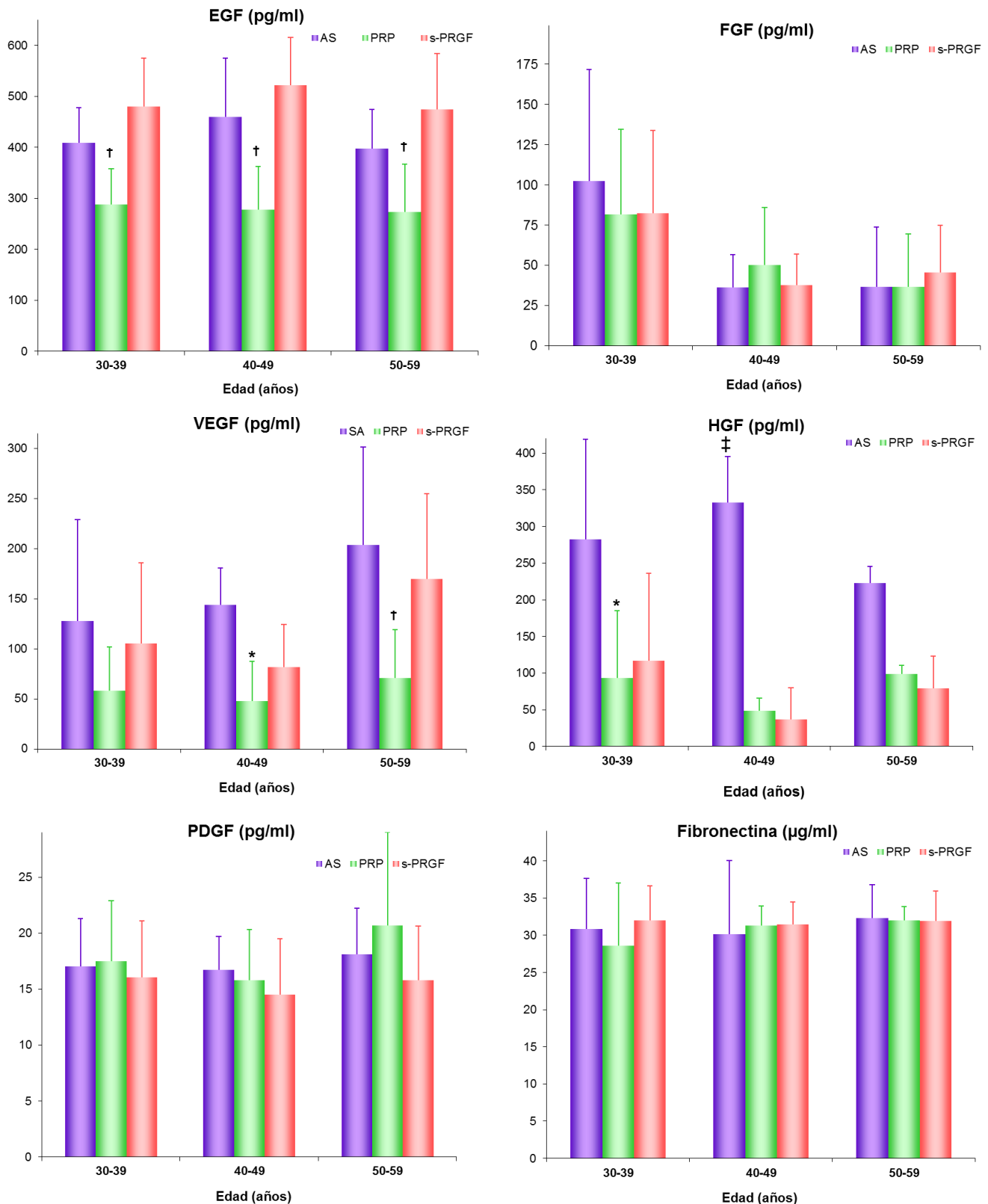
**Tabla 2.** Concentración de algunos factores de crecimiento en cada uno de los tres hemoderivados. Se expresa por rango de edad la media  $\pm$  SD.

\* Diferencias estadísticamente significativas del s-PRGF respecto a AS y PRP ( $p \leq 0,05$ ).

† Diferencias estadísticamente significativas del PRP respecto a AS y s-PRGF ( $p \leq 0,05$ ).

‡ Diferencias estadísticamente significativas del AS respecto a s-PRGF y PRP ( $p \leq 0,05$ ).

Hemoderivados	EDAD (años)	EGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	PDGF (ng/ml)	Fibronectina ( $\mu$ g/ml)
<b>AS</b>	30-39	409,52 $\pm$ 69,04	102,50 $\pm$ 69,17	127,69 $\pm$ 100,84	282,47 $\pm$ 136,57	17,06 $\pm$ 4,24	30,83 $\pm$ 6,86
	40-49	460,39 $\pm$ 114,83	36,35 $\pm$ 20,42	143,68 $\pm$ 36,92	333,13 $\pm$ 62,59	16,71 $\pm$ 2,99	30,18 $\pm$ 9,86
	50-59	398,07 $\pm$ 76,16	36,73 $\pm$ 37,21	203,35 $\pm$ 97,65	222,90 $\pm$ 22,94	18,11 $\pm$ 4,15	32,34 $\pm$ 4,45
	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>417,94 <math>\pm</math> 82,62</b>	<b>58,55 <math>\pm</math> 54,64</b>	<b>160,06 <math>\pm</math> 89,90</b>	<b>275,83 <math>\pm</math> 101,65<sup>‡</sup></b>	<b>17,36 <math>\pm</math> 3,73</b>	<b>31,11 <math>\pm</math> 6,76</b>
<b>PRP</b>	30-39	287,79 $\pm$ 70,88	81,87 $\pm$ 52,93	57,97 $\pm$ 43,59	93,13 $\pm$ 92,45	17,48 $\pm$ 5,44	28,65 $\pm$ 8,37
	40-49	277,79 $\pm$ 85,61	50,30 $\pm$ 35,86	47,59 $\pm$ 39,76	48,47 $\pm$ 17,71	15,80 $\pm$ 4,52	31,36 $\pm$ 2,56
	50-59	273,49 $\pm$ 93,73	36,71 $\pm$ 32,83	70,75 $\pm$ 48,20	98,90 $\pm$ 11,49	20,68 $\pm$ 8,36	31,99 $\pm$ 1,90
	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>279,83 <math>\pm</math> 78,18</b>	<b>57,04 <math>\pm</math> 44,44</b>	<b>60,31 <math>\pm</math> 42,50<sup>†</sup></b>	<b>84,60 <math>\pm</math> 63,87</b>	<b>18,26 <math>\pm</math> 6,44</b>	<b>30,55 <math>\pm</math> 5,10</b>
<b>s-PRGF</b>	30-39	480,80 $\pm$ 94,88	82,45 $\pm$ 51,61	105,06 $\pm$ 80,33	117,32 $\pm$ 118,64	16,07 $\pm$ 5,01	32,05 $\pm$ 4,60
	40-49	522,64 $\pm$ 93,75	37,76 $\pm$ 19,33	81,49 $\pm$ 42,68	37,13 $\pm$ 42,88	14,49 $\pm$ 5,00	31,47 $\pm$ 3,02
	50-59	475,09 $\pm$ 109,06	45,66 $\pm$ 29,16	169,62 $\pm$ 84,88	79,07 $\pm$ 44,11	15,80 $\pm$ 4,83	31,98 $\pm$ 3,99
	<b>MEDIA <math>\pm</math> SD</b>	<b>489,12 <math>\pm</math> 95,48*</b>	<b>58,27 <math>\pm</math> 41,25</b>	<b>124,60 <math>\pm</math> 79,64</b>	<b>83,74 <math>\pm</math> 79,42</b>	<b>15,58 <math>\pm</math> 4,65</b>	<b>31,83 <math>\pm</math> 3,56</b>



**Figura 1.** Cuantificación en voluntarios sanos de varios factores de crecimiento presentes en los tres hemoderivados (AS, PRP y s-PRGF), representados por rangos de edades. Se indican las diferencias estadísticas entre los tres hemoderivados dentro de un mismo rango de edad.

† Diferencias estadísticamente significativas del PRP respecto a AS y s-PRGF ( $p \leq 0,05$ ) dentro de un rango de edad.

‡ Diferencias estadísticamente significativas del AS respecto a s-PRGF y PRP ( $p \leq 0,05$ ) dentro de un rango de edad.

\* Diferencias estadísticamente significativas del PRP respecto a AS ( $p \leq 0,05$ ) dentro de un rango de edad.

## Resultados

(41,47 ± 5,89 pg/ml) y 50-59 (39,70 ± 3,97 pg/ml) no habiendo diferencias estadísticamente significativas.

Por el contrario, los niveles más altos de VEGF (147,91 ± 51,44 pg/ml) se encontraron en los voluntarios de mayor edad, siendo este factor de crecimiento también dependiente de la edad (Figura 1). Además, los niveles de VEGF son significativamente menores en el PRP respecto al de los otros dos preparados (Tabla 2). Igualmente, al comparar los distintos hemoderivados dentro del mismo rango de edad se observaron diferencias estadísticamente significativas en los voluntarios de mayor edad en el PRP respecto al AS y s-PRGF, y también dentro del rango de edad de 40-49 años en PRP respecto al AS (Figura 1).

También se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración media de HGF en el AS comparando con el PRP y s-PRGF (Tabla 2). Además, dentro del rango de edad 30-39 años se dieron diferencias significativas en la concentración del HGF en el del PRP respecto a AS, y en el AS respecto a s-PRGF y PRP dentro del rango de edad de 40-49 años (Figura 1).

Por último, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres preparados ni con respecto a la edad, en lo que a las concentraciones de PDGF y Fibronectina se refiere. Para ambas moléculas en estudio, las concentraciones presentes en los tres preparados se consideran altas.

## 2. CULTIVO CELULAR: INFLUENCIA DE LOS SUPLEMENTOS DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA VIABILIDAD CELULAR

Para determinar cómo afecta a la viabilidad de las células HCE la ausencia de algunos de los suplementos que *a priori* resultaban indispensables para su mantenimiento *in vitro*, se realizaron ensayos de viabilidad celular mediante el método MTT a tiempos 0, 24, 48 y 72 horas. Todos los ensayos se repitieron cuatro veces y con tres lotes distintos de células HCE.

Las condiciones a evaluar se reflejan en la Tabla 3. Se utilizó como control el medio de cultivo habitual HCE, el cual contiene medio DMEM:Ham's F12, 2mM L-glutamina, penicilina-estreptomina al 1%, SBF al 10% y todos los suplementos (10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulina, 0,1 µg/ml toxina colérica y DMSO al 0,5%).

Los resultados obtenidos (Tabla 3) demuestran que la presencia de EGF en el cultivo resulta crítica para el crecimiento celular, pues cuando se retira éste y ningún otro, la tasa de proliferación celular se reduce a la mitad después de 72 horas de cultivo.

**Tabla 3.** Ratio de crecimiento y porcentaje de viabilidad de las células HCE tras 72 horas de cultivo en ausencia de algunos de los factores esenciales, con respecto al crecimiento en presencia de todos ellos (cultivo control).

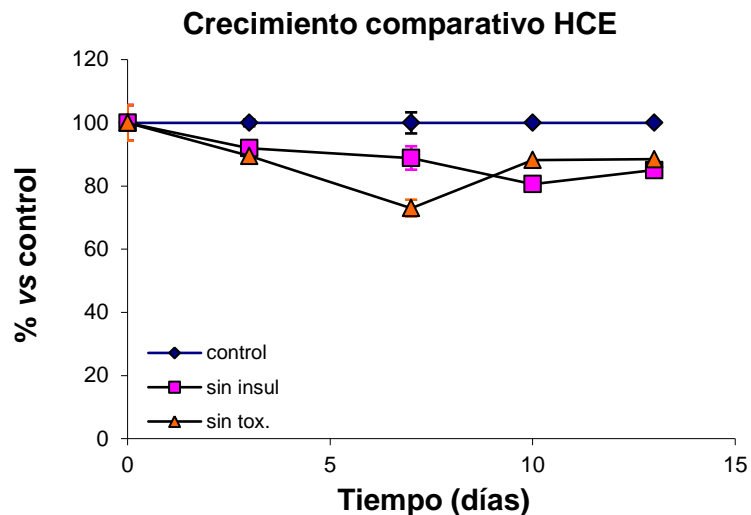
\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ).

CONDICIÓN / TRATAMIENTO	MEDIA $\pm$ SD	% vs CONTROL
1. Medio de cultivo habitual HCE (control)	1,23 $\pm$ 0,039	100%
2. Medio de cultivo habitual <u>sin insulina</u>	1,14 $\pm$ 0,007	93%
3. Medio de cultivo habitual <u>sin toxina colérica</u>	1,24 $\pm$ 0,014	101%
4. Medio de cultivo habitual <u>sin EGF</u>	0,67 $\pm$ 0,007	54% *
5. Medio de cultivo habitual <u>sin DMSO</u>	0,96 $\pm$ 0,004	78% *
6. Medio de cultivo habitual <u>sin insulina ni toxina</u>	0,93 $\pm$ 0,004	76% *
7. Medio de cultivo habitual <u>sin insulina ni EGF</u>	0,56 $\pm$ 0,004	45% *
8. Medio de cultivo habitual <u>sin toxina ni EGF</u>	0,76 $\pm$ 0,004	62% *
9. Medio de cultivo habitual <u>sin toxina ni EGF ni DMSO</u>	0,57 $\pm$ 0,004	46% *
10. Medio de cultivo habitual <u>sin suplementos</u> (EGF, toxina colérica, insulina, DMSO)	0,57 $\pm$ 0,004	47% *

La ausencia de DMSO, a pesar de ser un factor diferenciador, también reduce significativamente la proliferación celular, aunque en menor medida, aproximadamente un 20% trascurridas 72 horas. Sin embargo, el efecto sobre la proliferación celular de la insulina y/o la toxina colérica, no parecía quedar claro para un cultivo mantenido durante 72 horas, pues no se mostraban diferencias estadísticamente significativas en ausencia de uno de ellos, pero sí en ausencia de ambos. Así, en un segundo ensayo, se decidió mantener el cultivo durante 13 días sin insulina y sin toxina comparándolo con el cultivo control.

Transcurridos 13 días de cultivo, realizando los pases necesarios, en ausencia de insulina o toxina colérica, se observó que el descenso de la proliferación celular respecto a un cultivo control con todos los factores, es mínimo (10-15%) aunque estadísticamente significativo para ambas condiciones (Figura 2). Por este motivo, aunque para realizar ensayos puntuales quizá podríamos prescindir de alguna de ellas, para mantener la línea celular sin alteraciones sería conveniente añadir ambas al medio de cultivo, tal como indica las especificaciones de cultivo para esta línea y otras procedentes de células corneales y limbares.





**Figura 2.** Efecto sobre el crecimiento de las células HCE de la ausencia durante 13 días de insulina o toxina colérica en el medio de cultivo.

Se realizó un tercer ensayo, con la intención de evaluar si el hemoderivado humano s-PRGF era capaz de contrarrestar la ralentización en la proliferación celular que habíamos observado en el cultivo de células HCE al retirar los suplementos del medio habitual. En este caso, se cultivaron células HCE con el medio de cultivo habitual, que cuenta con SBF, retirando todos los suplementos necesarios para el crecimiento celular (toxina colérica, insulina y DMSO) excepto el EGF (suplemento crítico para la viabilidad del cultivo), frente a células HCE cultivadas en presencia de s-PRGF y en ausencia de todo el resto de los suplementos necesarios para el crecimiento celular, incluido el EGF. En la tabla 4 se observa como la tasa de proliferación celular tras 24 horas en un cultivo en presencia de SBF al 10% y EGF, pero no del resto de suplementos, se redujo a un 55%.

**Tabla 4.** Efecto de la retirada de los suplementos del medio de cultivo sobre el crecimiento de las células HCE cuando se utiliza un medio de cultivo que contiene bien SBF o bien s-PRGF. (Spl=suplementos)

CONDICIÓN / TRATAMIENTO	% PROLIFERACIÓN		CONDICIÓN / TRATAMIENTO	% PROLIFERACIÓN	
	t = 24 h.	t = 48 h.		t = 24 h.	t = 48 h.
Control (Spl+EGF+SBF)	100%	100%	Spl+EGF+PRGF	100%	100%
(-)Spl+EGF+SBF	54,71%	63,75%	(-)Spl+(-)EGF+PRGF	70,43%	82,15%

Sin embargo, en un cultivo celular en presencia de s-PRGF al 20% y al que se le han sustraído todos los suplementos, incluido el EGF, la tasa de proliferación celular se redujo solo a un 70%, comparando con un control en presencia de todos los suplementos.

### 3. EFECTO DE LOS HEMODERIVADOS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

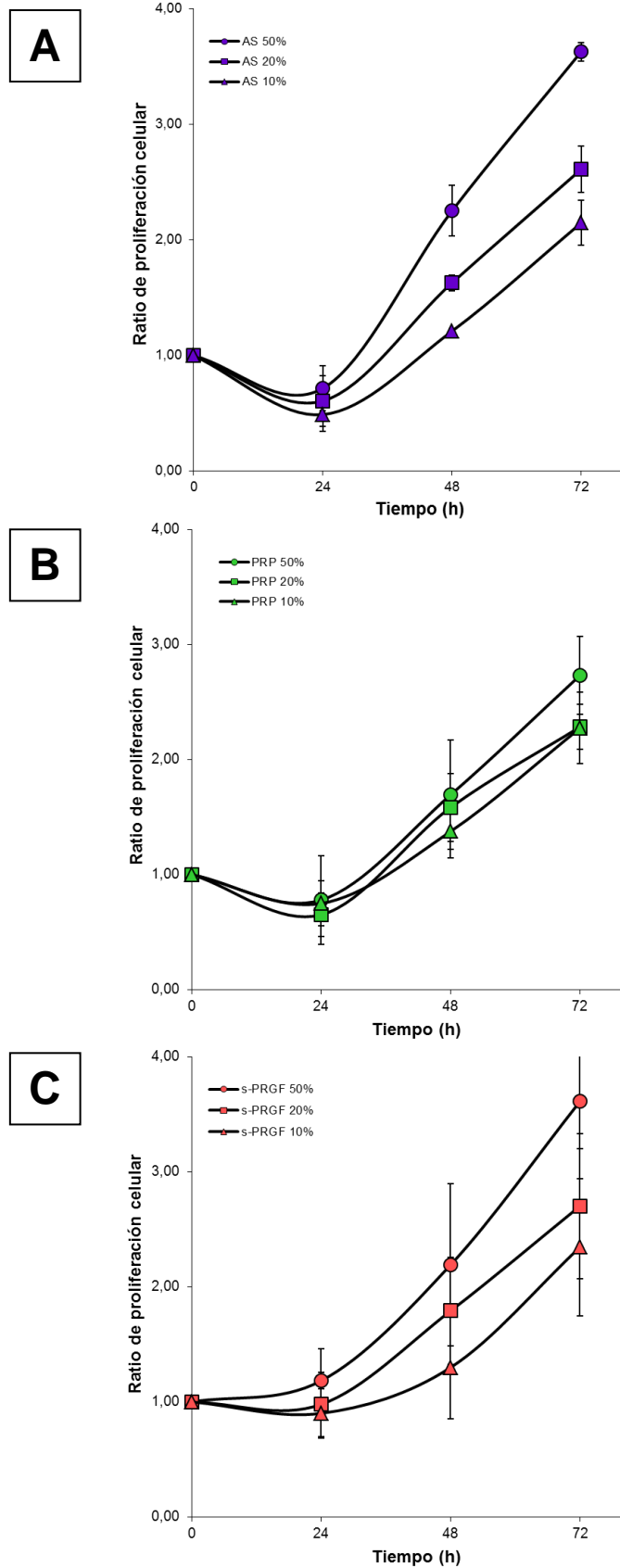
Con el fin de comparar la capacidad para promover la proliferación celular entre los tres hemoderivados humanos estudiados, además del s-PRGF que ya hemos utilizado en ensayos anteriores, se estudiaron el AS y el PRP. Para ello, se realizaron ensayos mediante el método del MTT para evaluar la viabilidad y proliferación celular de la línea establecida de epitelio corneal humano HCE y de los cultivos primarios de conejo RPCE.

#### 3.1. Cultivos de células de epitelio corneal humano (HCE)

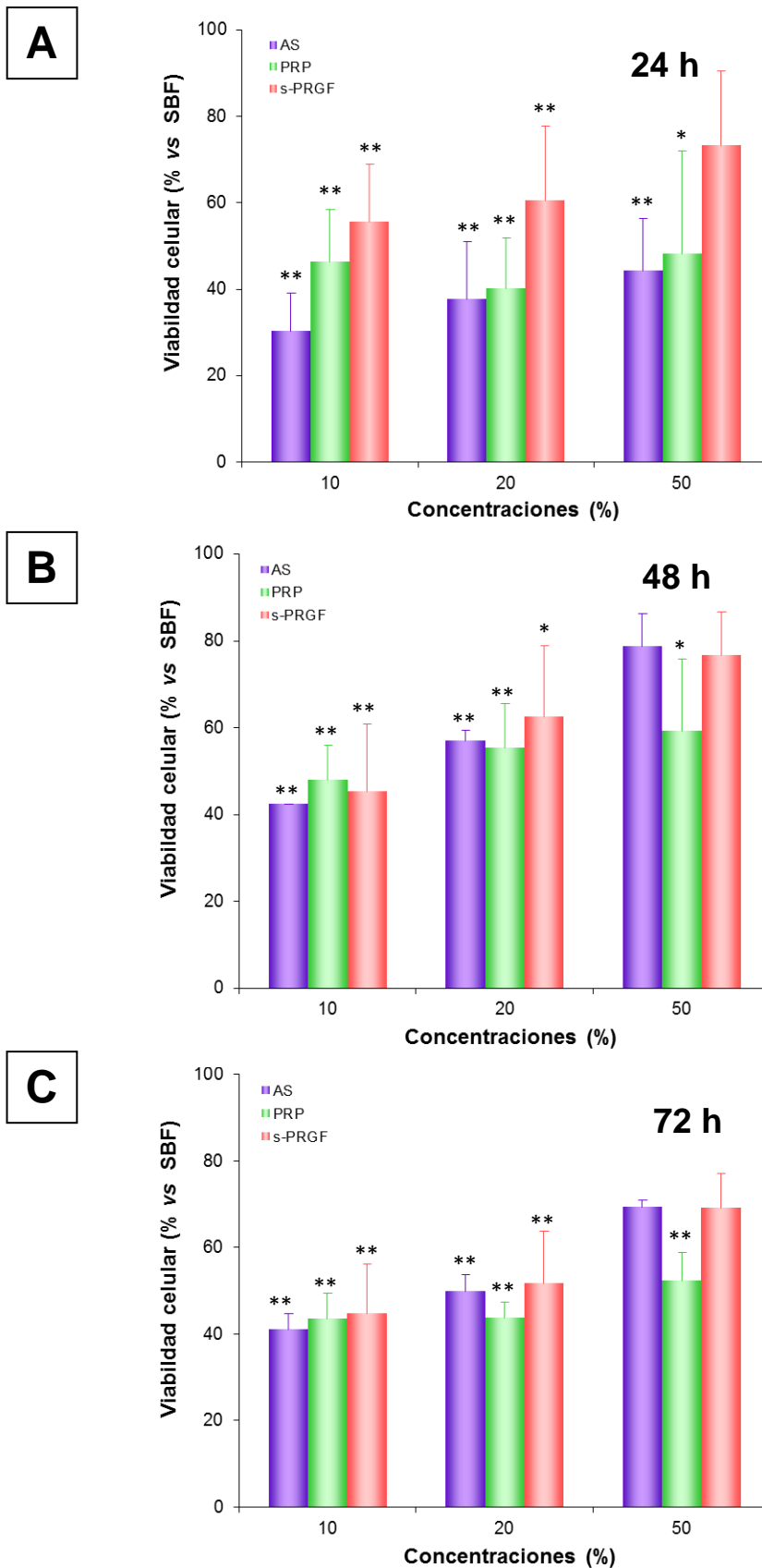
Se determinó la viabilidad tras 0, 24, 48 y 72 horas de cultivo en presencia de los distintos hemoderivados a concentraciones del 10, 20 y 50%. Los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, representados gráficamente, demostraron claramente que dos de los tres preparados (AS y s-PRGF) daban lugar a un patrón de crecimiento celular dosis-dependiente (Figura 3 A y C). Sin embargo, los tratamientos con diferentes concentraciones de PRP produjeron una respuesta más débil y un patrón similar entre las diferentes concentraciones, el cual no parece ser dosis-dependiente (Figura 3 B).

Centrándonos en la viabilidad celular obtenida a distintos tiempos, observamos que, en las primeras 24 horas de incubación con AS y PRP se produjo una disminución de la viabilidad a cualquiera de las concentraciones estudiadas (Figura 3 A y B), que no ocurría cuando las células se incubaban con s-PRGF (Figura 3 C).

Comparamos también la viabilidad celular tras la incubación con cada uno de los preparados con la viabilidad celular obtenida en un cultivo celular en presencia de SBF, el cual, se tomó como referencia ya que representa las condiciones estándares de cultivos celulares (Figura 4). Se observó que los cultivos crecidos en presencia de s-PRGF a cualquiera de las concentraciones estudiadas presentaban la más alta viabilidad para el tiempo de incubación 24 horas (Figura 4 A). Sin embargo, tras 48 y 72 horas de tratamiento, la viabilidad celular de los cultivos tratados con dosis de 10% y 20% de cada uno de los tres hemoderivados, es muy similar (Figura 4 B y C). Mientras que a la dosis de 50%, los cultivos tratados con AS y s-PRGF se desmarcaron respecto al PRP presentando una mayor viabilidad. Destacar que, en los cultivos tratados con s-PRGF al 50%, la viabilidad celular no mostró, a ninguno de los tiempos estudiados, diferencias estadísticamente significativas en comparación con la viabilidad obtenida en los cultivos con SBF, como tampoco lo hizo el AS a partir de las 48 horas de cultivo (Figura 4).



**Figura 3.** Patrón de proliferación de las células HCE tras la exposición durante 24, 48 y 72 horas a distintas concentraciones (10, 20 y 50%) de tres hemoderivados humanos: A) AS, B) PRP y C) s-PRGF. Los resultados se expresaron como el ratio de proliferación con respecto al número de células a tiempo 0 horas.



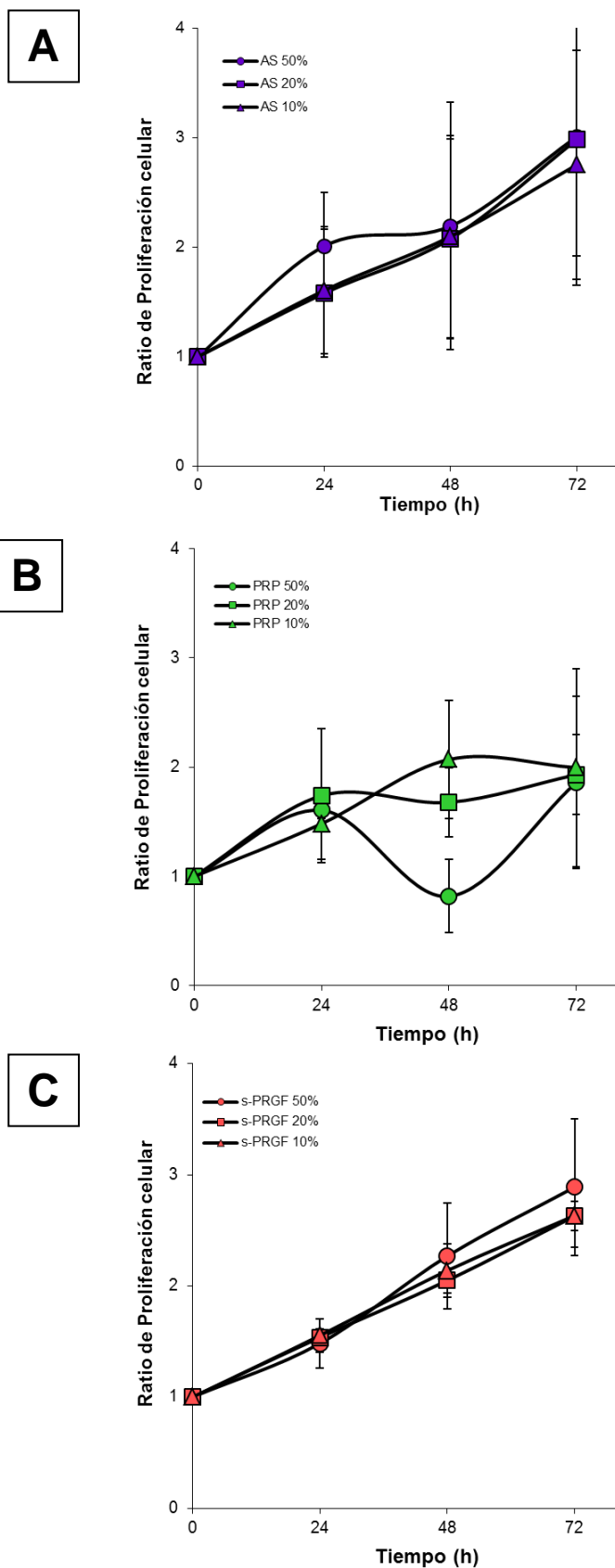
**Figura 4.** Viabilidad de las células HCE expuestas a diferentes concentraciones (10, 20 y 50%) de los hemoderivados humanos durante 24, 48 y 72 horas de cultivo. Los resultados se expresan como porcentaje promedio de la viabilidad celular con respecto al cultivo con SBF. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al cultivo de SBF: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

### 3.2. Cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE)

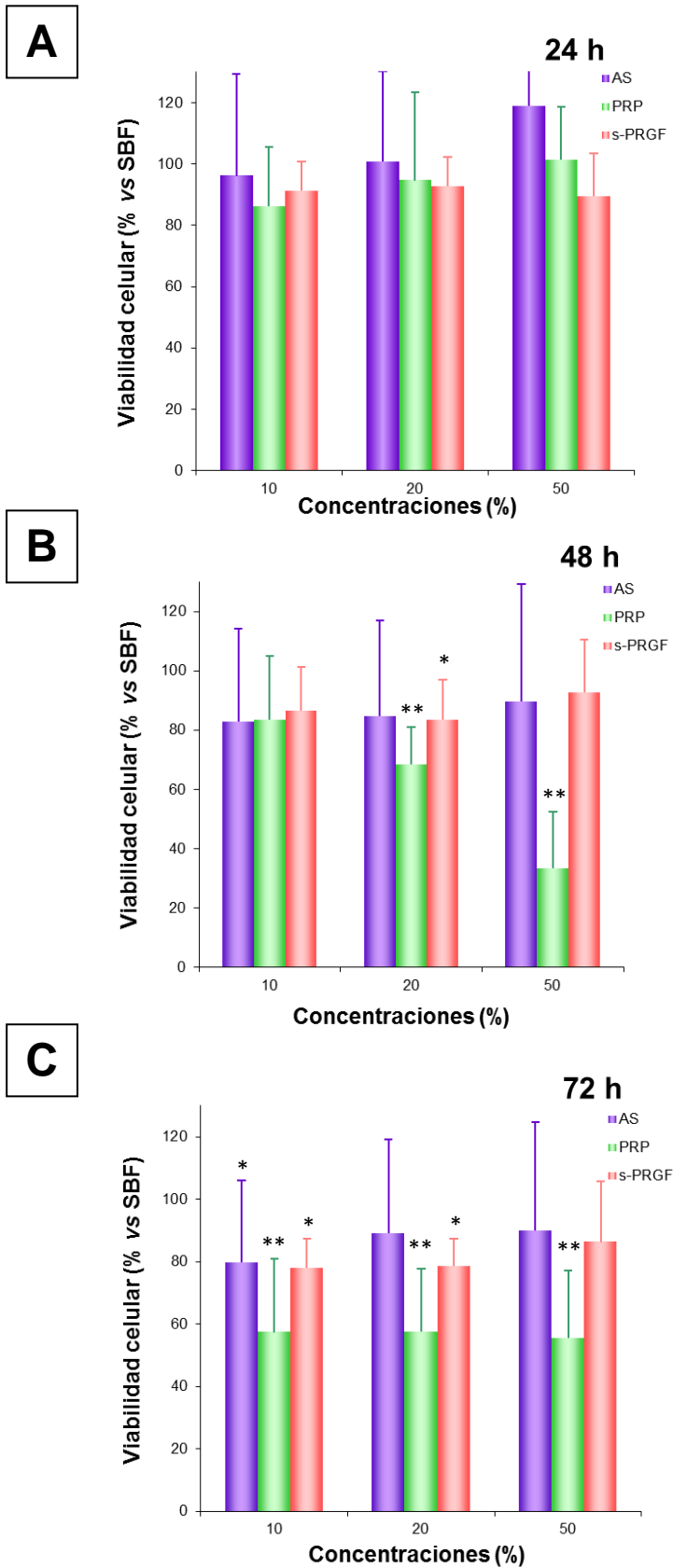
Para estudiar el efecto de los tres hemoderivados sobre la proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo se prepararon estos derivados de plasma a partir de sangre de conejo. De manera similar a como se realizó en los cultivos con células HCE, se determinó la viabilidad celular tras 0, 24, 48 y 72 horas de cultivo, en presencia de los hemoderivados AS, PRP y s-PRGF a concentraciones del 10, 20 y 50%.

Los cultivos RPCE crecidos en presencia tanto de AS como de s-PRGF, tuvieron una proliferación adecuada de tipo creciente a lo largo del tiempo que, aunque no fue dosis-dependiente, sí mostró una tendencia a ello para la concentración del 50% (Figura 5 A y C). Los cultivos RPCE incubados con diferentes concentraciones de PRP, al igual que ocurrió con los cultivos de la línea establecida HCE, mostraron una menor proliferación comparado con los otros hemoderivados. Además, se observó un patrón similar para las tres concentraciones y muy fluctuante a lo largo de las 72 horas (Figura 5 B). Incluso, se observó como la proliferación se inhibió conforme aumentó la concentración de PRP.

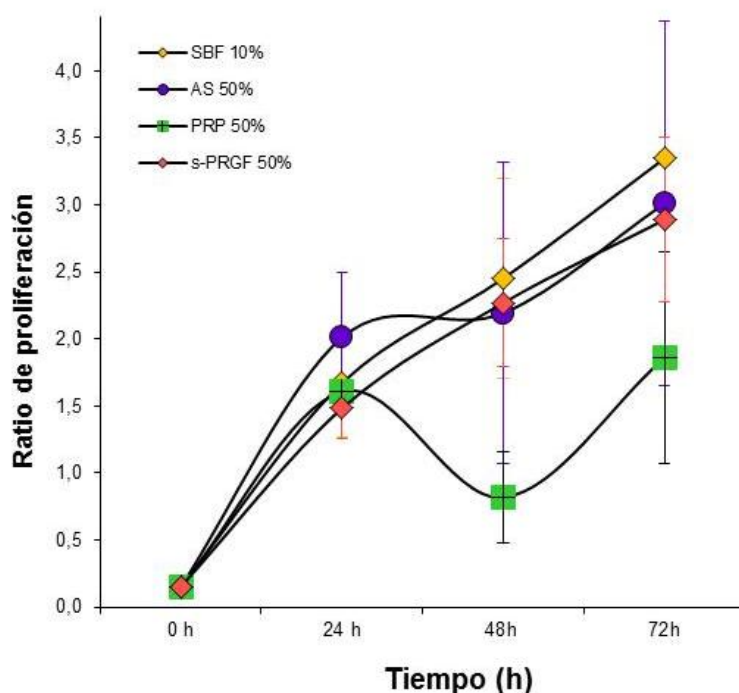
La viabilidad celular de los cultivos que contenían hemoderivados de conejo fue similar a la que mostraron los cultivos mantenidos con SBF al 10% (control) tras las 24 horas en cultivo (Figura 6), no observándose diferencias estadísticamente significativas. La alta viabilidad celular se repitió tanto a las 48 horas como a las 72 horas para prácticamente todas las concentraciones de AS y s-PRGF, a pesar de que para determinadas concentraciones y tiempos se observaron diferencias estadísticamente significativas con el control (Figura 6). Así, para el s-PRGF, se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular para las concentraciones de 10 y 20%, especialmente a las 72 horas de cultivo, no habiendo diferencias estadísticamente significativas en ningún momento para la concentración del 50%. En el caso de los cultivos incubados con AS, se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular solo para la concentración de 10% a las 72 horas de cultivo. Sin embargo, los cultivos mantenidos con PRP disminuyeron su viabilidad celular casi a la mitad, siendo más acusado el efecto a altas concentraciones y a mayor tiempo de cultivo (Figura 6). Por último, se observó un ritmo de proliferación muy similar entre los cultivos con SBF y aquellos cultivos mantenidos con los hemoderivados AS al 50% y, especialmente, s-PRGF al 50% después de 72 horas (Figura 7).



**Figura 5.** Patrón de proliferación de los cultivos RPCE tras la exposición durante 24, 48 y 72 horas a distintas concentraciones (10, 20 y 50%) de tres hemoderivados humanos: A) AS, B) PRP y C) s-PRGF. Los resultados se expresaron como el ratio de proliferación con respecto al número de células a tiempo 0 horas.



**Figura 6.** Viabilidad de los cultivos RPCE expuestos a diferentes concentraciones (10, 20 y 50%) de los hemoderivados humanos durante 24, 48 y 72 horas de cultivo. Los resultados se expresan como porcentaje promedio de la viabilidad celular con respecto al cultivo con SBF. Diferencias estadísticamente significativas con respecto al cultivo de SBF: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .



**Figura 7.** Patrón de proliferación de los cultivos RPCE tras la exposición durante 72 horas a cada uno de los hemoderivados humanos al 50% y al SBF al 10%.

#### 4. EFECTO DE LOS HEMODERIVADOS HUMANOS SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

##### 4.1. Análisis morfológico mediante microscopía de contraste de fases

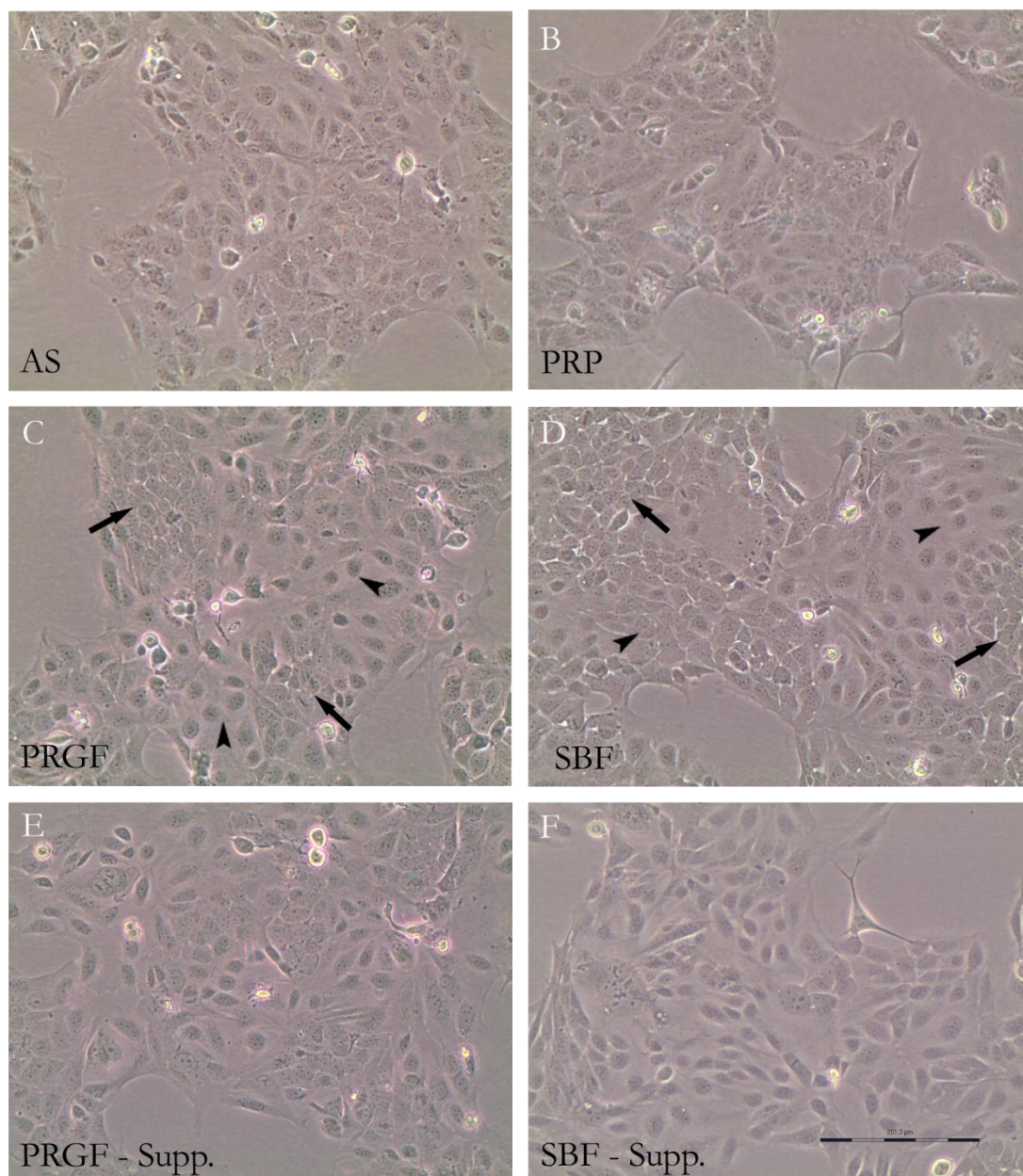
Con el fin de evaluar la diferenciación celular en los cultivos tratados con los diferentes hemoderivados, se realizó un primer análisis a nivel morfológico. Las células HCE se mantuvieron 14 días en cultivo con los distintos hemoderivados al 20% y con SBF al 10% como control, subcultivando cada tres días.

Las micrografías de contraste de fases (aumentos 100x), mostraron notables diferencias en la morfología celular en función de los distintos tratamientos (AS, PRP y s-PRGF) (Figura 8 A, B y C respectivamente). Así, los cultivos tratados con AS y PRP presentaron una población celular bastante homogénea, con células de mediano y gran tamaño. Además, los cultivos tratados con PRP mostraron una densidad celular menor, debida probablemente al patrón de crecimiento más lento que se da con este tratamiento, como habíamos observado en los ensayos de proliferación celular. También en los cultivos incubados con PRP se pudo observar un alto grado de turbidez, que no se aprecia en las micrografías ya que se realizó un lavado con PBS previo a la toma de fotos, y que sospechamos pueda ser debido a la importante cantidad de detritus que aporta el PRP tras su descongelación, por la rotura de las plaquetas. Por el contrario, los cultivos incubados con s-PRGF y SBF (Figura 8 C y D



## Resultados

respectivamente) muestran una morfología celular más heterogénea y son bastante similares entre sí. Como se observa en la imagen (Figura 8 C y D), en los cultivos incubados con s-PRGF y SBF, podemos distinguir dos tipos de poblaciones celulares: unas con fenotipo más indiferenciado, siendo células más pequeñas con ratio núcleo/citoplasma alto, y más juntas entre sí; y otras morfológicamente diferenciadas, siendo más grandes y aplanadas.



**Figura 8.** Fotografías de microscopía de contraste de fases de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a A) AS, B) PRP, C) s-PRGF, D) SBF, E) s-PRGF sin suplementos (- Supp.), F) SBF - Supp. AS, PRP y s-PRGF diluidos al 20%, y SBF al 10%. Se observan diferencias morfológicas entre los distintos cultivos. Se indican mediante flechas las colonias compactas de células pequeñas y redondeadas, y mediante puntas de flecha células grandes y aplanadas. En ausencia de suplementos, disminuye la densidad celular y predominan las células grandes y aplanadas. Los campos ilustrados en estas imágenes son representativos de la totalidad del cultivo. La barra de escala corresponde a 200 µm.

Por otro lado, se realizaron ensayos en ausencia de los suplementos habituales del medio de cultivo (EGF, insulina, toxina colérica y DMSO). Se observó en todos los casos un fenotipo más diferenciado. Sin embargo, este hecho fue más evidente en los cultivos incubados con s-PRGF y SBF, donde las colonias de células pequeñas que veíamos anteriormente se observaron ahora en raras ocasiones, mientras que las células de tamaño mediano y grande, coexistieron en colonias expandidas (Figura 8 E y F).

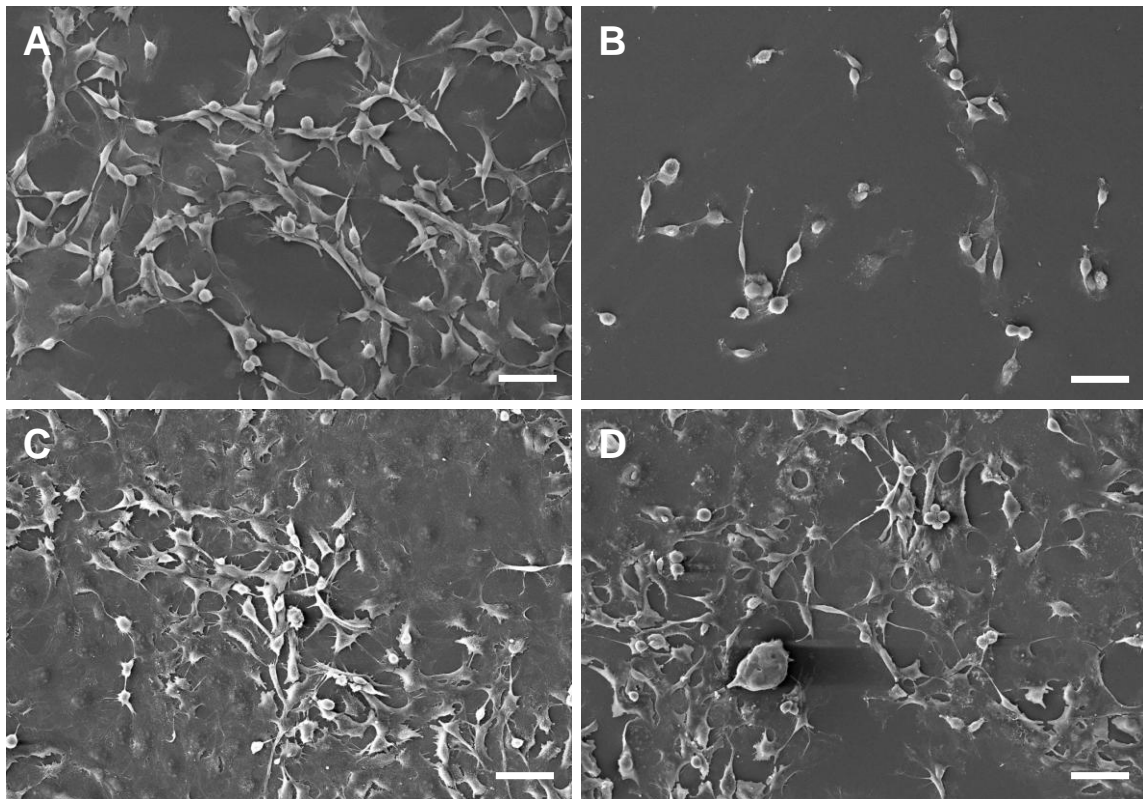
#### **4.2. Estudio de la ultraestructura mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM)**

##### **SEM**

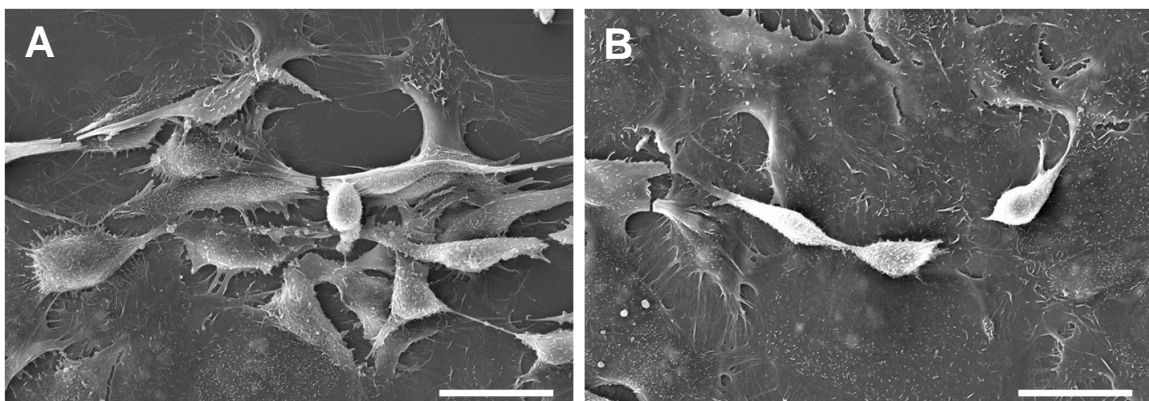
Las micrografías tomadas mediante microscopía electrónica de barrido mostraron, nuevamente, diferencias entre los cultivos celulares mantenidos con los distintos hemoderivados (AS, s-PRGF y PRP al 50%, y SBF al 10%) durante 14 días. A pocos aumentos (250x), observamos gran actividad mitótica en todos los cultivos, aunque en aquellos tratados con PRP la densidad celular es mucho menor (Figura 9). En los cultivos tratados con SBF y con s-PRGF puede apreciarse mayor heterogeneidad celular, observándose, de forma prácticamente equitativa, células muy aplanadas de aspecto diferenciado, junto con otras tridimensionalmente más voluminosas y de aspecto menos diferenciado. En los cultivos mantenidos con AS o PRP predomina este último tipo celular (Figura 9).

En todos los cultivos tratados con hemoderivados humanos pueden observarse colonias celulares bien delimitadas, si bien las más abundantes y con morfología típica de colonias que contienen células indiferenciadas/células madre, es decir, colonias tipo holoclón (Barrandon & Green, 1987), se detectan en los cultivos mantenidos con s-PRGF. A mayores aumentos (1.000-2.300x), podemos observar la heterogeneidad de los cultivos tratados con SBF (Figura 10) y s-PRGF (Figura 11, A y B), así como detalles de las colonias tipo holoclón en este último cultivo (Figura 11, C y D).

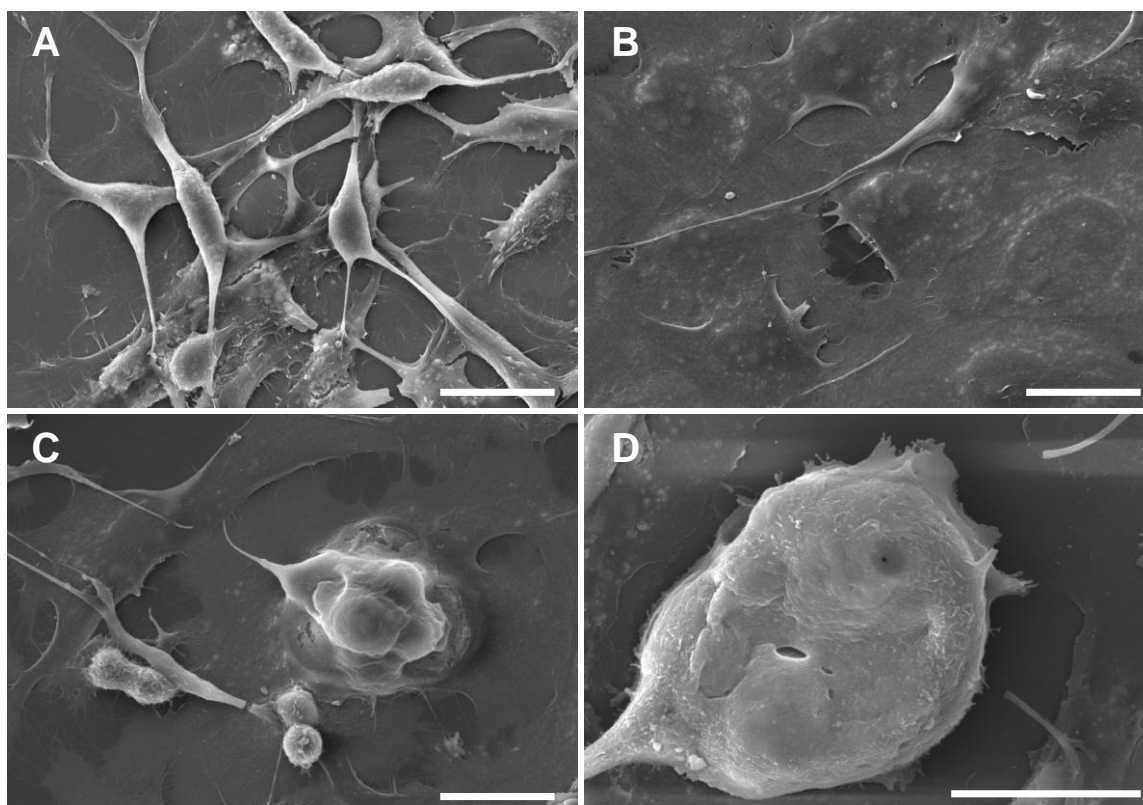




**Figura 9.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a A) AS al 50%, B) PRP al 50%, C) s-PRGF al 50% y D) SBF al 10%. Se observa heterogeneidad celular principalmente en los cultivos tratados con SBF y s-PRGF. Este último cultivo presenta un mayor número de colonias tipo holoclón. La barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.

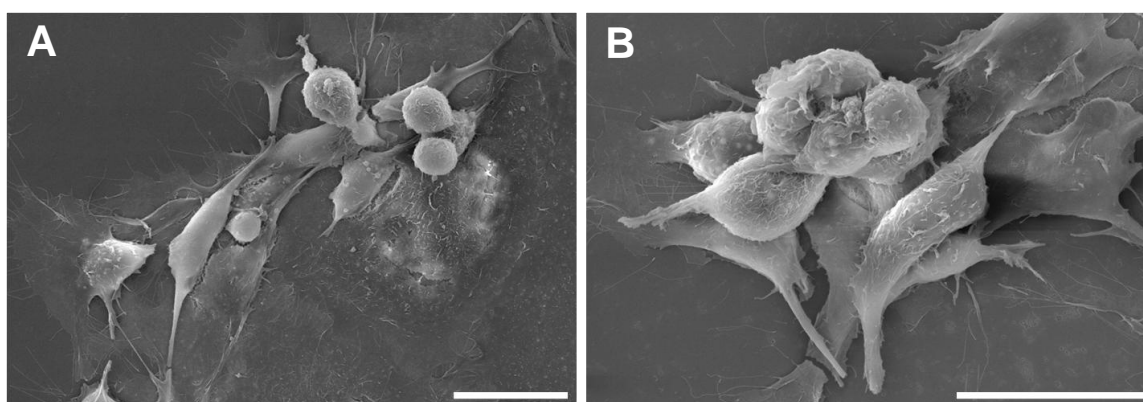


**Figura 10.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a SBF al 10%. Detalles de los distintos tipos celulares: células más indiferenciadas y proliferativas (A) y células más diferenciadas (B). La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.

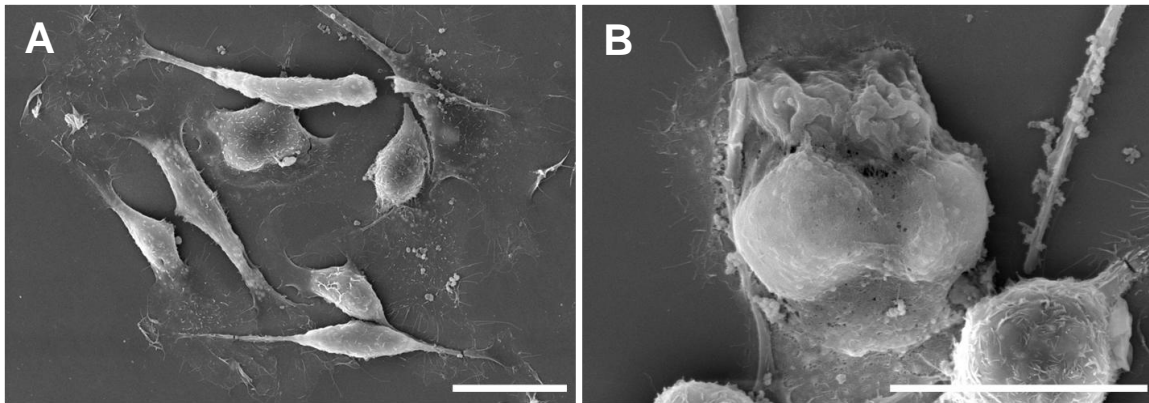


**Figura 11.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a s-PRGF al 50%. Detalles de los distintos tipos celulares: células más indiferenciadas y proliferativas (A) y células más diferenciadas (B). Detalles de colonias tipo holoclón (C) y (D). La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.

Como hemos comentado, los cultivos sometidos a tratamiento con AS y PRP también presentan alguna colonia celular (Figura 12 y 13), pero éstas tienen un aspecto menos compactado y sus bordes no son tan suaves y delimitados como en el caso de los holoclones de los cultivos de s-PRGF. En general, de los cuatro, el SBF es el tratamiento que muestra mayor número de microvellosidades en la superficie de las células.



**Figura 12.** Micrografías de microscopía electrónica de barrido de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a AS al 50%. Vista representativa del cultivo (A) y detalle de una colonia (B). La barra de escala corresponde a 25  $\mu$ m.



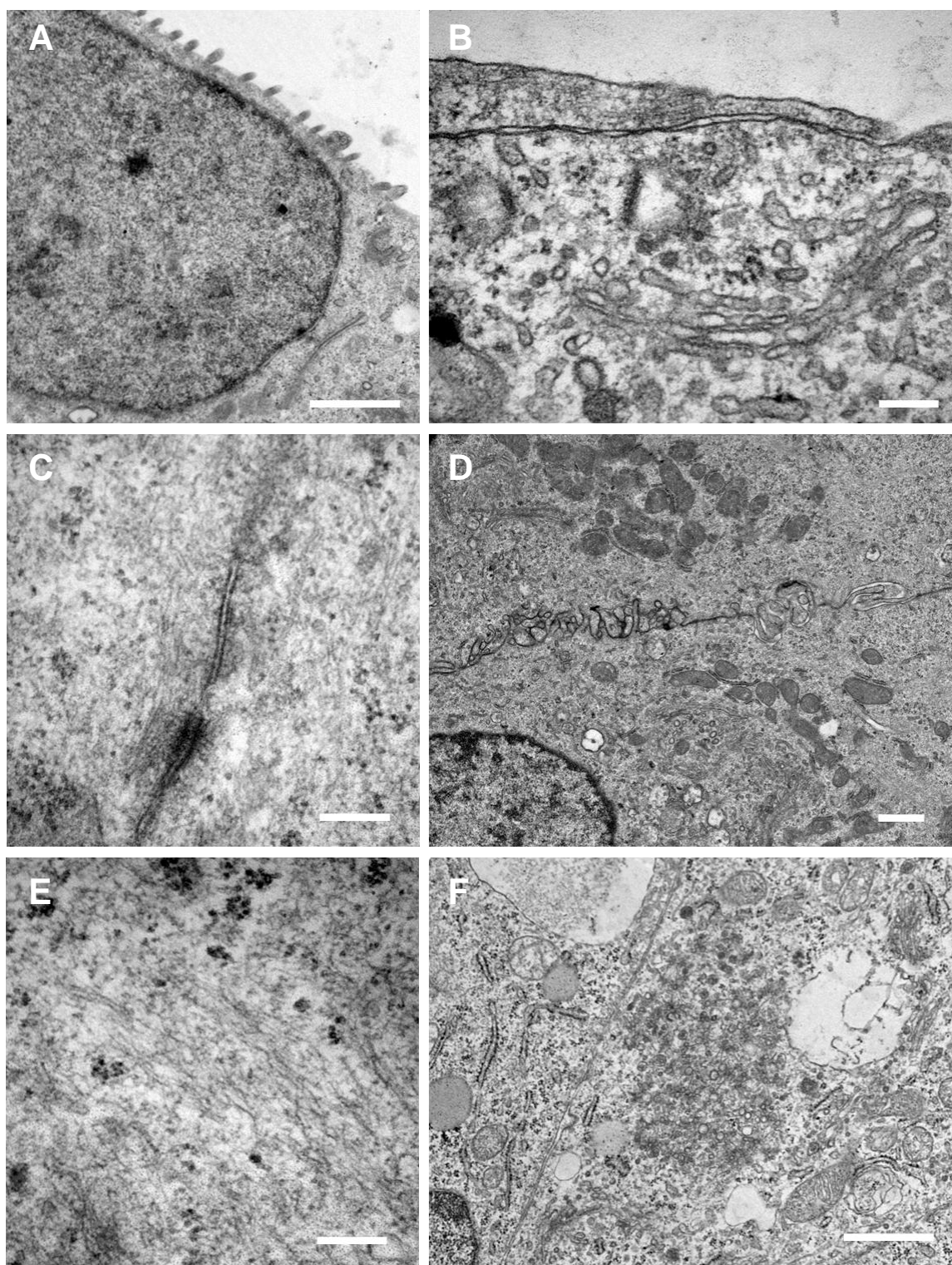
**Figura 13.** Micrográficas de microscopía electrónica de barrido de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a PRP al 50%. Vista representativa del cultivo (A) y detalle de una colonia (B). La barra de escala corresponde a 25 µm.

## TEM

Mediante microscopía electrónica de transmisión observamos, en general, células epiteliales con morfología de célula muy activa, caracterizada por núcleos muy eucromáticos con dos o tres nucléolos muy patentes y mitosis frecuentes. En todos los cultivos constatamos numerosas características de las células epiteliales, como diversas especializaciones de membrana, abundantes uniones intercelulares y un citoplasma rico en filamentos intermedios (Figura 14). Así pues, las superficies celulares en contacto con el medio de cultivo mostraban abundantes microvellosidades (Figura 14, A).

Se observaron uniones intercelulares de tipo ocluyente (Figura 14, B), así como desmosomas y uniones tipo GAP (Figura 14, C), e interdigitaciones (Figura 14, D). El citoplasma celular presentaba grandes cantidades de citoqueratinas (Figura 14, E) y mucha riqueza de orgánulos e inclusiones citoplasmáticas, entre los que destacaban el aparato de Golgi, retículo endoplasmático liso, abundantes perfiles de retículo endoplasmático rugoso, mitocondrias y gotas lipídicas (Figura 14, B y F).





**Figura 14.** Micrografías de microscopía electrónica de transmisión de cultivos de células HCE después de 14 días de exposición a SBF al 10% o a alguno de los hemoderivados, en las que se muestran microvellosidades (A, 10.000x), uniones ocluyentes (B, 56.000x), uniones tipo GAP y desmosoma (C, 71.000x), interdigitaciones (D, 11.500x), filamentos intermedios de tipo citoqueratina (E, 71.000x) y riqueza de orgánulos y otros componentes citoplasmáticos (F, 18.000x). La barra de escala corresponde a 1  $\mu$ m (Figuras A, D y F) o a 200 nm (Figuras B, C, E).

### 4.3. Expresión génica de marcadores de diferenciación corneal mediante RT-PCR a tiempo real (RT-qPCR)

Comparamos los niveles de transcripción de un panel de genes relacionados con el estado de diferenciación del epitelio corneal en células HCE sometidas a tratamiento durante 14 días con SBF al 10% o AS al 20% o PRP al 20% o s-PRGF al 20%, y en presencia o ausencia de los distintos suplementos que se aportan al medio de cultivo, quedando cada una de las ocho condiciones definida por un medio de cultivo diferente (Tabla 5).

**Tabla 5.** Componentes del medio de cultivo para cada una de las ocho condiciones bajo las que se cultivaron las células HCE para los ensayos de qPCR.

	MEDIO DE CULTIVO
1. (CONTROL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base: DMEM:Ham's F12, 2mM L-glutamina, 1% penicilina-estreptomicina.</li> <li>✓ Suplementos: 10 ng/ml EGF, 5 µg/ml insulina, 0,1 µg/ml toxina colérica, 0,5% DMSO</li> <li>✓ SBF al 10%</li> </ul>
2.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ SBF al 10%</li> </ul>
3.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ Suplementos</li> <li>✓ AS al 20%</li> </ul>
4.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ AS al 20%.</li> </ul>
5.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ Suplementos</li> <li>✓ PRP al 20%.</li> </ul>
6.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ PRP al 20%.</li> </ul>
7.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ Suplementos</li> <li>✓ s-PRGF al 20%.</li> </ul>
8.	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Medio base</li> <li>✓ s-PRGF al 20%.</li> </ul>

Mediante RT-qPCR se estudió la expresión de varias conexinas (Cx26, 30, 31.1 y 43). Las conexinas son proteínas transmembrana que forman los conexones de las uniones tipo gap. A través de esta unión se da el paso de señales que pueden regular la proliferación y diferenciación de células epiteliales humanas. El tipo de conexinas de las uniones gap se

distribuyen de forma diferente en las distintas capas del epitelio corneal. En general se admite que a mayor número de conexinas, mayor grado de diferenciación.

Además se analizó la expresión del gen de la integrina  $\alpha 6$ , componente de los hemidesmosomas, expresada principalmente en células epiteliales de la capa basal (células teóricamente más indiferenciadas). También se estudió la involucrina, que se expresa específicamente en células epiteliales superficiales de la córnea humana (células epiteliales más diferenciadas).

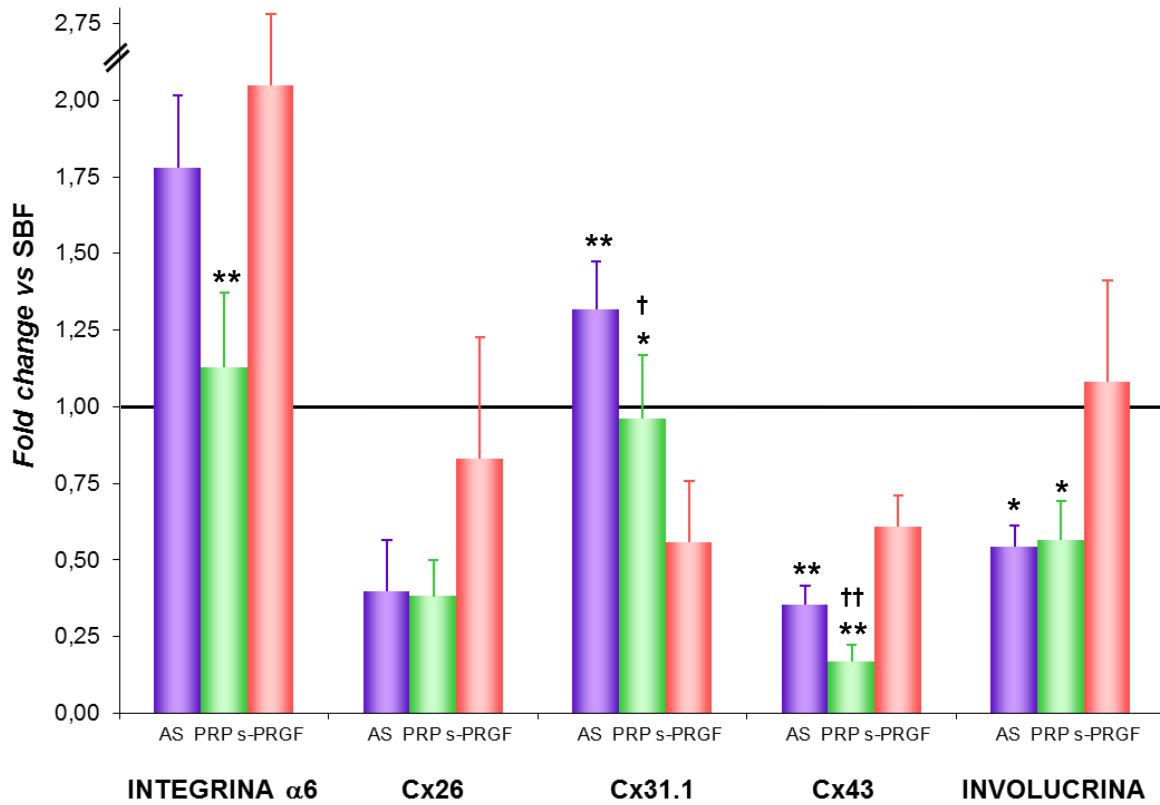
El análisis de los resultados de la RT-qPCR reveló distintos patrones de expresión génica en las células HCE cultivadas con los distintos medios de cultivo. Cuando se utilizó medio de cultivo con suplementos, se observó que el tratamiento con s-PRGF indujo una mayor expresión de Cx26, Cx43 e involucrina en comparación con los tratamientos de AS y PRP (Figura 15), con diferencias estadísticamente significativas en el caso de los dos últimos genes. La expresión de la Cx31.1, que fue la más variable entre las distintas condiciones de cultivo, fue mayor en las células tratadas con AS y menor en aquellas tratadas con s-PRGF, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre la expresión de las células cultivadas con s-PRGF respecto a las de aquellas cultivadas con otros sueros. También, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de las Cx31.1 y Cx43 cuando comparamos la expresión de las células cultivadas con AS con las de PRP.

Las células cultivadas con s-PRGF muestran la expresión más alta de la integrina  $\alpha 6$ , característica de células de la capa basal del epitelio, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto a la expresión de las células cultivadas con PRP.

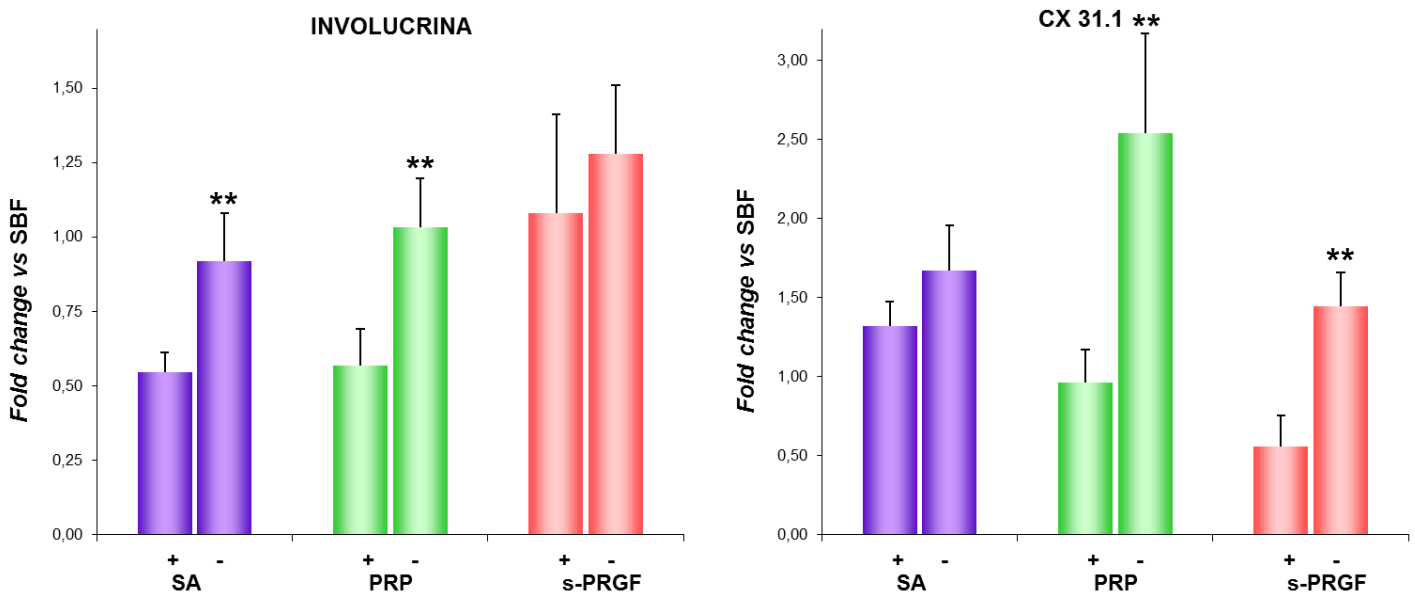
Finalmente, se examinó el efecto de la presencia o ausencia de los suplementos del cultivo sobre la expresión de estos genes en las células HCE cultivadas con los tres hemoderivados, ya que como hemos observado previamente, estos factores pueden condicionar la morfología y la proliferación de los cultivos. En estos ensayos de expresión génica, se observó que, en ausencia de los suplementos, la expresión de la involucrina y particularmente de la Cx31.1 aumentó en todos los tratamientos (Figura 16) comparado con los tratamientos en presencia de suplementos.



Resultados



**Figura 15.** Análisis mediante qPCR de la expresión la de integrina α6, varias conexas e involucrina en las células HCE expuestas durante 14 días a medio de cultivo con suplementos y uno de los tres hemoderivados o SBF. Los resultados se expresan en nº de veces de expresión génica respecto a la expresión de las células cultivadas con SBF (expresión=1.0 ± SD). Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los cultivos con s-PRGF (\*p ≤ 0,05 y \*\*p≤ 0,01) (test de la X<sup>2</sup>), y diferencias estadísticamente significativas de los cultivos con AS respecto a los cultivos con PRP (†p ≤ 0,05 y ††p≤ 0,01) (test de la X<sup>2</sup>).



**Figura 16.** Análisis mediante qPCR de la expresión la de involucrina y Cx31.1 en las células HCE expuestas durante 14 días a medio de cultivo con suplementos (+) y sin suplementos (-) y uno de los tres hemoderivados o SBF. Los resultados se expresan en número de veces de expresión génica respecto a la expresión de las células cultivadas con SBF (expresión=1.0 ± SD). Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los cultivos con suplementos (\*p ≤ 0,05 y \*\*p≤ 0,01).

## 5. EFECTO DE LOS HEMODERIVADOS SOBRE LA REEPITELIZACIÓN

Para comparar la capacidad de los tres hemoderivados de promover la migración celular y reepitelización del epitelio corneal se realizaron ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

### 5.1. Reepitelización *in vitro*: migración celular inducida por los hemoderivados

#### 5.1.1. Células HCE

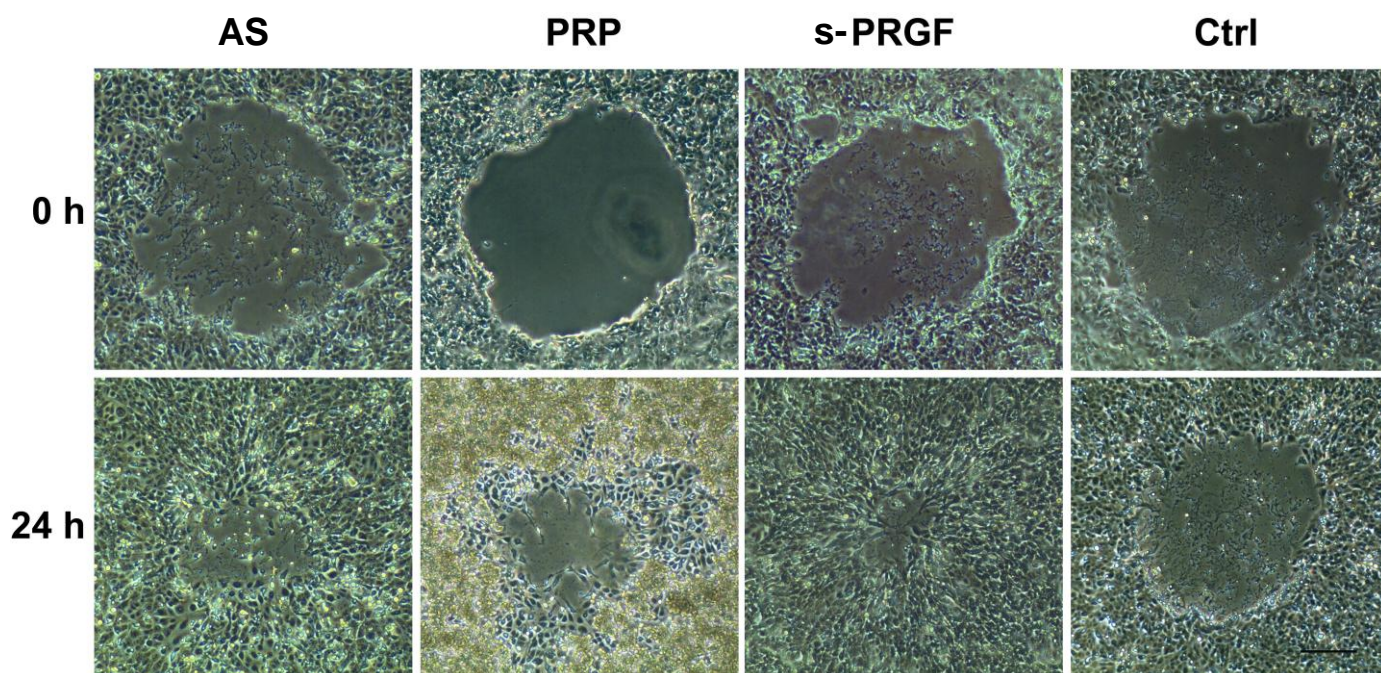
Estos ensayos, conocidos como ensayos de la herida o “*wound healing*”, se llevaron a cabo en la línea celular humana de epitelio corneal HCE.

Se sembraron células HCE en placas de 96 y 12 pocillos a una concentración alta para obtener una monocapa que tapizara el fondo del pocillo. Posteriormente, se realizaron erosiones con forma redondeada en la monocapa celular, y se incubaron estos cultivos con cada uno de los tres hemoderivados al 50% y con BSA al 1% como control. Se observaron y fotografiaron los cultivos a lo largo del tiempo con la intención de valorar la capacidad de cada hemoderivado para promover el cierre de la erosión.

Se vio que dos de los tres hemoderivados (AS y s-PRGF) aceleraron marcadamente la reconstrucción de la monocapa con respecto al control (Figura 17). AS y s-PRGF promovieron una rápida resolución del defecto en la monocapa respecto al PRP y al control, generando diferencias estadísticamente significativas ya desde el inicio y a cualquiera de los tiempos estudiados al comparar con el control (Tabla 6). Concretamente, la media del área sin cerrar ( $\text{mm}^2$ ) de los cultivos tratados con AS y s-PRGF fue casi inexistente ya a las 36 horas ( $0,02 \pm 0,04$  y  $0,01 \pm 0,03 \text{ mm}^2$  respectivamente), aunque la recuperación completa de la monocapa en todos los pocillos no se dio hasta las 48 horas (Tabla 6).

En cuanto a los cultivos tratados con PRP la capacidad mostrada para promover el cierre de la erosión fue más débil que la de los otros dos preparados, y la media del área sin cerrar era mayor a todos los tiempos. Sin embargo, a partir de las 24 horas, este área sin cerrar de los cultivos tratados con PRP empezó a mostrar diferencias estadísticamente significativas respecto al control.

Con respecto al número de réplicas que presentaban una resolución total del defecto epitelial (número de pocillos con la monocapa totalmente recubierta), en los cultivos de HCE a las 48 horas, el 100% de los defectos tratados con AS y s-PRGF fueron resueltos, mientras que solo el 20% de los tratados con PRP se habían resuelto (Figura 18). Sin embargo, los tres hemoderivados mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar con el control en cuanto al número de pocillos totalmente recubiertos.

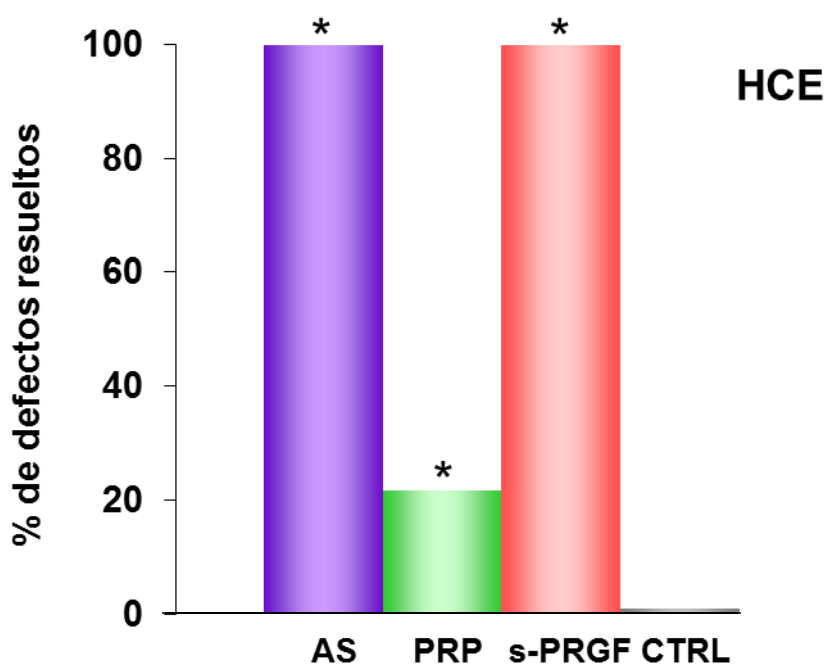


**Figura 17.** Fotografías de microscopía de contraste de fases que ilustran la evolución de la migración de las células HCE tras 24 horas de incubación con los distintos tratamientos. Estas imágenes resaltan la capacidad del AS y del s-PRGF para recubrir el defecto en la monocapa celular más rápidamente que el PRP y el tratamiento control. Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 6.** Progresión del recubrimiento de la monocapa en los cultivos HCE incubados con los tres hemoderivados al 50% o el control. Los resultados se expresan como la media del área sin recubrir  $\pm$  SD en  $\text{mm}^2$ .

Hemo-derivados	Tiempo (h)				
	0	12	24	36	48
<b>AS</b>	<b>0,72 <math>\pm</math> 0,19</b>	<b>0,43 <math>\pm</math> 0,14*</b>	<b>0,10 <math>\pm</math> 0,11*</b>	<b>0,02 <math>\pm</math> 0,05*</b>	<b>Cerrado*</b>
<b>PRP</b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>0,52 <math>\pm</math> 0,17</b>	<b>0,34 <math>\pm</math> 0,13*</b>	<b>0,22 <math>\pm</math> 0,13*</b>	<b>0,12 <math>\pm</math> 0,11*</b>
<b>s-PRGF</b>	<b>0,72 <math>\pm</math> 0,23</b>	<b>0,38 <math>\pm</math> 0,16*</b>	<b>0,11 <math>\pm</math> 0,09*</b>	<b>0,01 <math>\pm</math> 0,03*</b>	<b>Cerrado*</b>
<b>Control</b>	<b>0,74 <math>\pm</math> 0,13</b>	<b>0,48 <math>\pm</math> 0,10</b>	<b>0,39 <math>\pm</math> 0,08</b>	<b>0,29 <math>\pm</math> 0,09</b>	<b>0,21 <math>\pm</math> 0,12</b>

\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ). (Prueba U de Mann-Whitney).



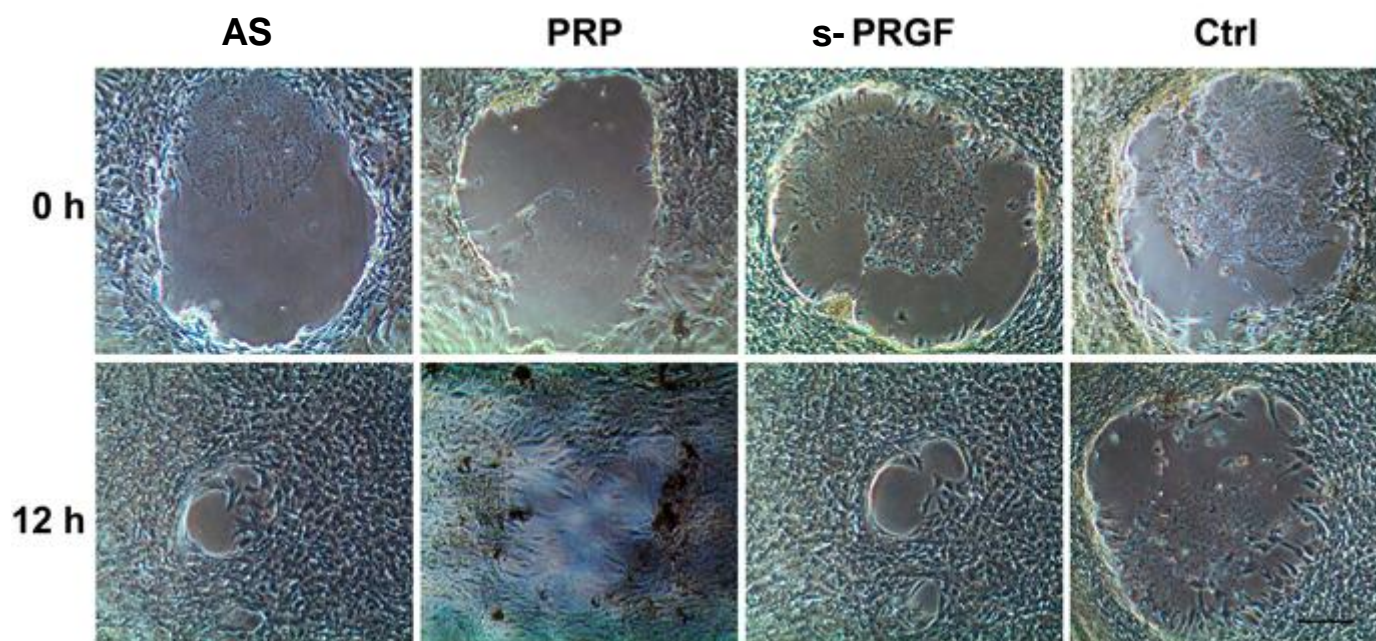
**Figura 18.** Porcentaje de pocillos con células HCE en los que el defecto en la monocapa celular fue completamente resuelto a las 48 horas. Todas las monocapas celulares tratadas con AS o s-PRGF habían sido recubiertas. \*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ) (test de la  $X^2$ ).

### 5.1.2. Cultivos RPCE

Se repitieron estos ensayos de “*wound healing*” en cultivos primarios de conejo RPCE. Se observó, al igual que en los cultivos de la línea celular humana de epitelio corneal HCE, cómo el AS y el s-PRGF aceleraron marcadamente el recubrimiento de la monocapa con respecto al control (Figura 19). Por el contrario, los cultivos tratados con PRP tuvieron una respuesta muy similar al control. El patrón seguido en el proceso de reepitelización en cultivos RPCE fue muy similar al seguido por la línea celular HCE, aunque algo más rápido.

Así en los cultivos de RPCE tratados con AS o s-PRGF se observaron diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos estudiados al comparar con el control. Concretamente, la media del área sin cerrar ( $\text{mm}^2$ ) de los cultivos tratados con AS y s-PRGF fue casi inexistente después de 12 horas de exposición ( $0,06 \pm 0,07$  y  $0,09 \pm 0,13$  en  $\text{mm}^2$  respectivamente), aunque la recuperación completa de la monocapa en todos los pocillos se dio a las 36 horas tras la erosión (Tabla 7), en vez de a las 48 horas, como ocurría en la línea celular HCE.





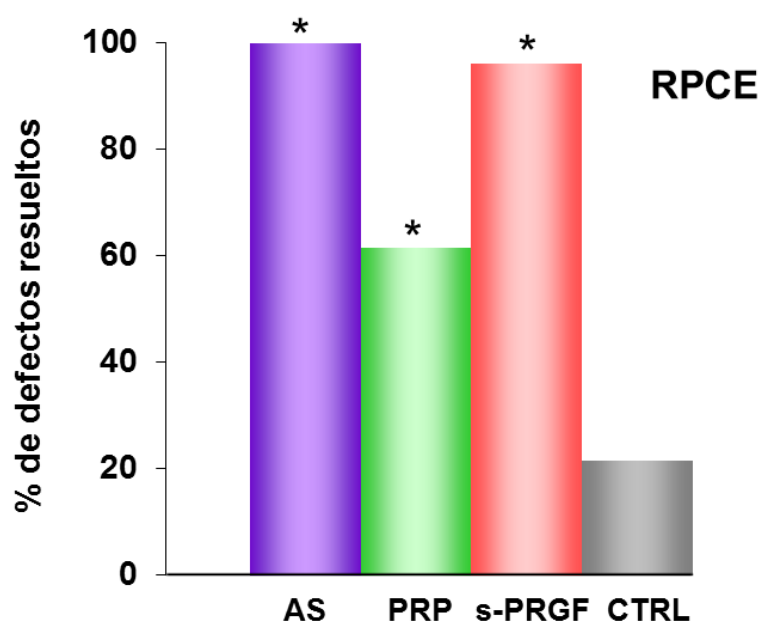
**Figura 19.** Fotografías de microscopía de contraste de fases que ilustran la evolución de la migración de las células RPCE tras 12 horas de incubación con los distintos tratamientos. Al igual que en el caso de los cultivos de la línea celular HCE cabe destacar la capacidad del AS y del s-PRGF para recubrir el defecto en la monocapa celular, más rápidamente que el PRP y el tratamiento control. Barra de escala 200  $\mu\text{m}$ .

Con respecto al porcentaje de pocillos en los que a las 36 horas se había recuperado completamente la monocapa, fue mucho mayor para los cultivos tratados con AS y con s-PRGF (casi del 100%) que para los tratados con PRP (60%) o los tratamientos controles (20%) (Figura 20). No obstante, los tres hemoderivados mostraron a las 36 horas diferencias estadísticamente significativas al comparar con el control en cuanto al número de pocillos en los cuales la monocapa se había recuperado completamente.

**Tabla 7.** Progresión del recubrimiento de la monocapa en los cultivos RPCE incubados con los tres hemoderivados al 50% o el control. Los resultados se expresan como la media del área sin recubrir  $\pm$  SD en  $\text{mm}^2$ .

Tratamientos	Tiempo (h)			
	0	12	24	36
AS	0,63 $\pm$ 0,13	0,06 $\pm$ 0,09*	0,01 $\pm$ 0,03*	Cerrado*
PRP	0,63 $\pm$ 0,13	0,20 $\pm$ 0,12	0,10 $\pm$ 0,11	0,11 $\pm$ 0,13*
s-PRGF	0,63 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,13*	0,03 $\pm$ 0,06*	Cerrado*
Control	0,63 $\pm$ 0,15	0,32 $\pm$ 0,14	0,15 $\pm$ 0,12	0,13 $\pm$ 0,38

\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0.05$ ) (Prueba U de Mann-Whitney).



**Figura 20.** Porcentaje de pocillos con cultivos RPCE en los que el defecto en la monocapa celular estaba completamente resuelto a las 36 horas. Casi todas las monocapas celulares tratadas con AS o s-PRGF habían sido recubiertas. \*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ) (test de la  $X^2$ ).

## 5.2. Reepitelización *in vivo* en un modelo de conejo.

Con el fin de confirmar *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro*, se realizaron ensayos de reepitelización en un modelo animal de conejo. Para ello, se indujeron quirúrgicamente defectos epiteliales en córneas de conejo ( $n=32$ ), que se trataron tres veces al día con uno de los tres derivados de la sangre, o con lágrima artificial como tratamiento control.

No se observó ningún evento adverso, tales como inflamación de la córnea o neovascularización en ninguno de los ojos de los conejos de estudio, ya sea durante el proceso de curación de las úlceras o tras la completa reepitelización (Figura 21).

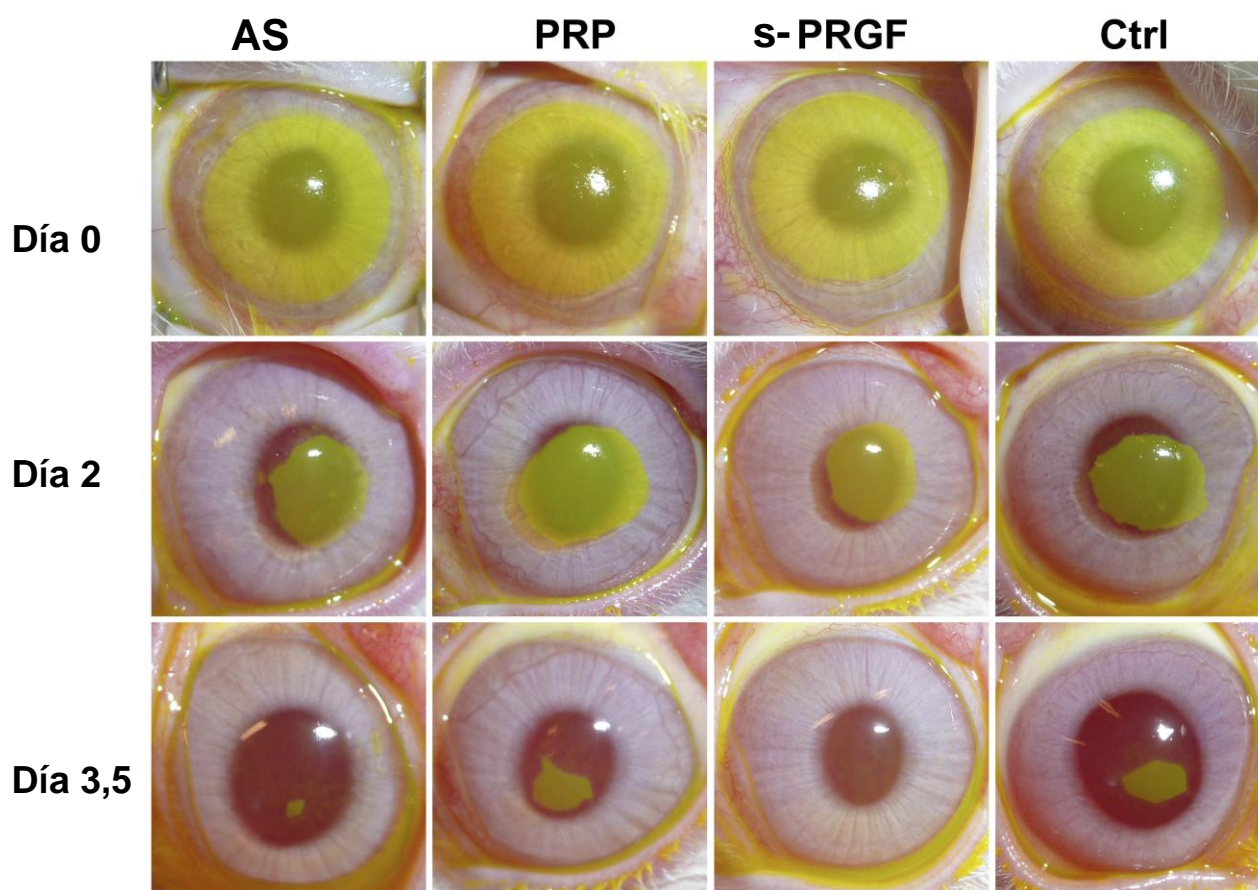
Los resultados mostraron que las heridas corneales reepitelizaban más rápido al ser tratadas con AS o s-PRGF que con PRP o el tratamiento control (Figura 21, Tabla 8). En concreto, el tiempo medio para completar el cierre del defecto epitelial en los ojos tratados con AS o s-PRGF fue de  $3,80 \pm 0,27$  y  $3,50 \pm 0,35$  días, respectivamente, mientras que en el PRP y el control el tiempo medio de cierre fue mayor,  $4,42 \pm 0,97$  y  $4,75 \pm 0,76$  días, respectivamente. Los hemoderivados AS y s-PRGF mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con el del tratamiento control (Figura 22).

Al analizar la progresión de cierre de la herida, se observó que en la fase inicial todos los tratamientos provocaron una respuesta similar, no siendo detectadas diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo a partir del segundo día, el proceso de

## Resultados

cicatrización de la herida se acelera en los ojos tratados con AS y s-PRGF en comparación con el PRP y la lágrima artificial. Cabe destacar que, aunque el tiempo final de cierre de las heridas fue casi el mismo con los tratamientos AS y s-PRGF, los tamaños de úlcera más pequeños en todos los tiempos analizados se dieron en el grupo de tratamiento del s-PRGF (Tabla 8). Además, sólo en el caso del tratamiento con s-PRGF se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños de la úlcera con respecto al tratamiento control en todos los tiempos medidos a partir del día 2,5 después de la cirugía.

Si nos centramos en el día 3,5 después de la inducción del defecto epitelial, la mayoría de los defectos corneales tratados con s-PRGF ya habían sido reepitelizados completamente, mientras que en el caso del AS y PRP sólo el 35-40% se habían resuelto (Figura 23). Únicamente el tratamiento con s-PRGF (80% de defectos corneales cerrados) mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ; Chi-squared test) respecto al tratamiento control (ningún defecto cerrado).

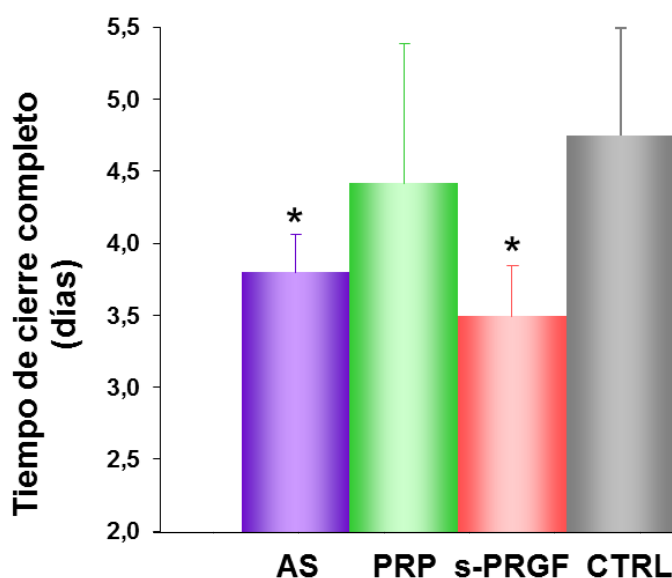


**Figura 21.** Evolución del defecto epitelial en los ojos de conejo tratados con cada uno de los tres hemoderivados y la lágrima artificial como control (monitorizado con tinción de fluoresceína). Las imágenes revelan que los ojos tratados con AS y s-PRGF reepitelizan la córnea más rápidamente.

**Tabla 8.** Progresión de la reepitelización en los ojos de conejo tratados con los tres hemoderivados al 100% o con lágrima artificial (control). Los resultados se expresan como la media del área sin reepitelizar  $\pm$  SD en mm<sup>2</sup>.

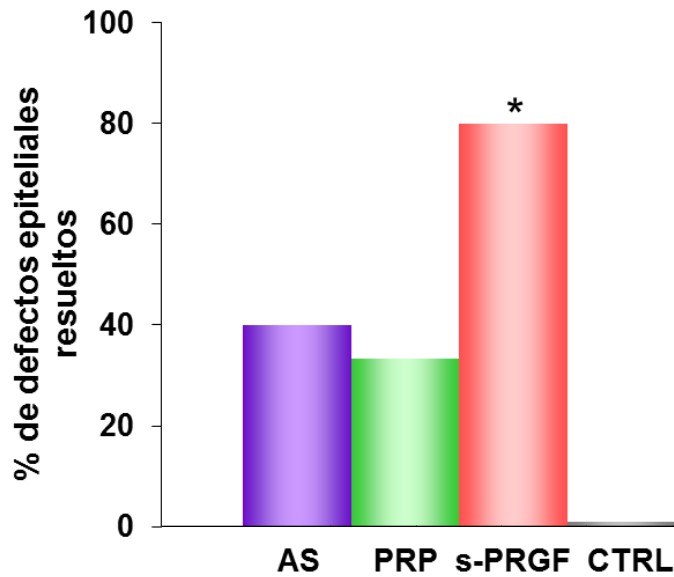
Tratamiento	Tiempo (días)					
	0	2	2,5	3	3,5	4
AS	73,65 $\pm$ 4,08	16,87 $\pm$ 2,89	9,07 $\pm$ 3,74	2,26 $\pm$ 1,36*	0,45 $\pm$ 0,49	Cerrado*
PRP	73,33 $\pm$ 3,31	17,89 $\pm$ 6,49	11,89 $\pm$ 5,24	4,25 $\pm$ 3,31	3,11 $\pm$ 1,97	1,24 $\pm$ 0,80
s-PRGF	73,58 $\pm$ 2,33	17,02 $\pm$ 1,82	7,78 $\pm$ 2,39*	0,82 $\pm$ 1,02*	0,04 $\pm$ 0,08*	Cerrado*
Control	73,50 $\pm$ 2,36	18,23 $\pm$ 3,86	11,04 $\pm$ 2,77	6,09 $\pm$ 3,66	3,05 $\pm$ 2,38	1,76 $\pm$ 2,52

\* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p \leq 0,05$ ). (Prueba U de Mann-Whitney).



**Figura 22.** Tiempo medio (días) que tarda en resolverse el defecto epitelial inducido en las córneas de conejo y tratado con cada uno de los hemoderivados y el control. El tratamiento con AS y s-PRGF muestran menores tiempos de resolución del defecto epitelial, mostrando en ambos casos diferencias estadísticamente significativas con el control. \*  $p \leq 0,05$  (U-Mann Whitney).





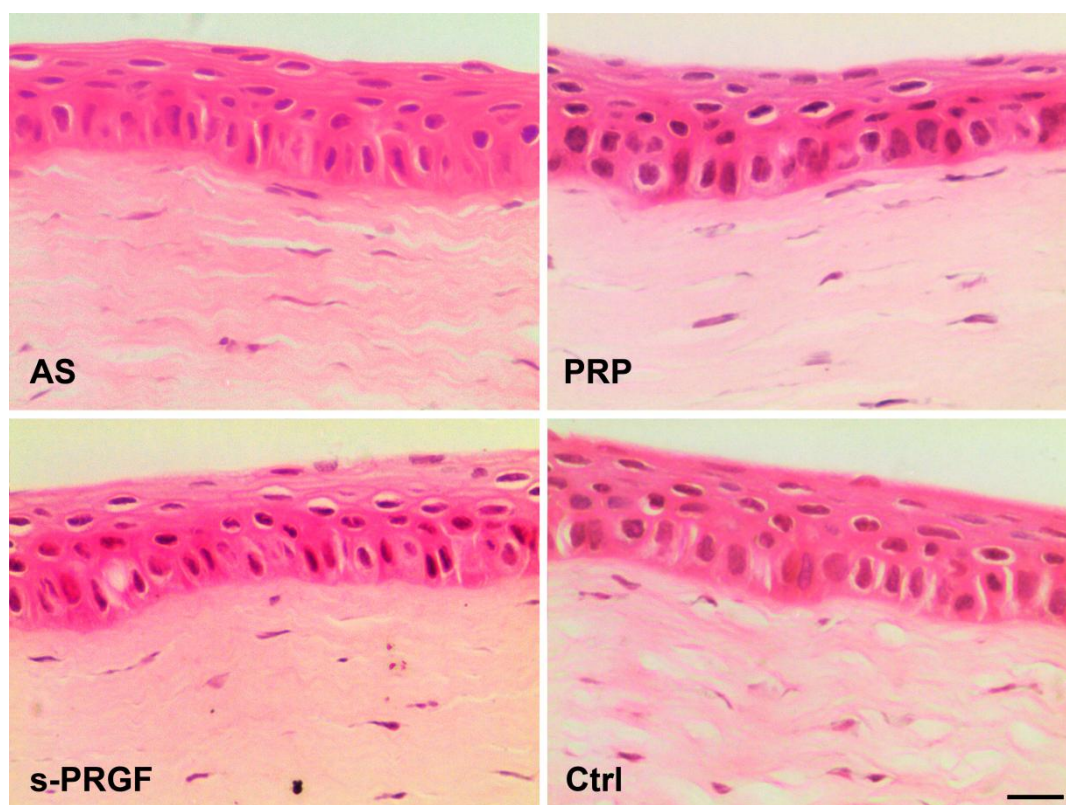
**Figura 23.** Porcentaje de defectos epiteliales resueltos en las córneas de conejo 3,5 días después de la operación. El tratamiento con s-PRGF muestra el mayor número de defectos epiteliales corneales solventados, siendo éste el único que presenta diferencias estadísticamente significativas con el control. \*  $p \leq 0,05$  (Chi-squared test).

## 6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS CÓRNEAS DE CONEJO TRAS LA REEPITELIZACIÓN

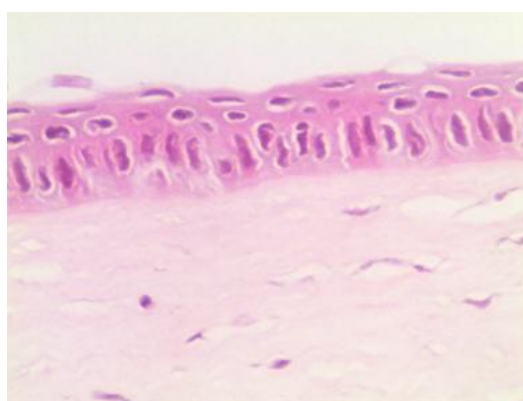
Las córneas desepitelizadas y tratadas con los diferentes hemoderivados fueron procesadas para su estudio histológico una vez finalizado el proceso de reepitelización en todos los grupos.

Como muestran las imágenes (Figura 24) se observó en todos los ojos de conejo un epitelio sano, pluriestratificado no queratinizado y bien organizado, sin diferencias entre los cuatro grupos de estudio.

Sin embargo cabe destacar que las secciones histológicas revelaron una hiperplasia focal de una o dos capas más de células epiteliales en las áreas reepitelizadas de todas las córneas operadas, independientemente del tratamiento empleado, al compararlas con secciones histológicas de una córnea sana en la que nunca se ha inducido quirúrgicamente un defecto epitelial (Figura 25).



**Figura 24.** Secciones histológicas de las córneas centrales de conejo tras la resolución completa del defecto epitelial. Las córneas fueron tratadas con cada uno de los tres hemoderivados a estudiar o la lágrima artificial (tratamiento control). Se observa un epitelio corneal sano y bien estructurado en todas las córneas. Barra de escala 200  $\mu$ m.



**Figura 25.** Sección histológica de una córnea central de conejo sana sin defecto epitelial previo.



# Discusión



Los defectos epiteliales corneales son frecuentes en la práctica diaria de las consultas oftalmológicas. Normalmente, cicatrizan con tratamientos convencionales como las lágrimas artificiales sin conservantes, y antibióticos y/o corticoides tópicos, cuya presentación puede ser en forma de colirio o pomada. Sin embargo, cuando se retrasa la cicatrización de estas úlceras pueden progresar al estroma e incluso llegar a la perforación del ojo, afectando a la visión y en ocasiones a la integridad del globo ocular. Es en estos casos cuando los hemoderivados suponen una alternativa terapéutica (López-Plandolit, 2010). En esta tesis, hemos querido comparar la capacidad de tres hemoderivados para promover la regeneración de las úlceras epiteliales corneales, estudiando su efecto tanto *in vitro* como *in vivo* sobre la reepitelización corneal.

La regeneración corneal implica la participación de diferentes procesos celulares, tales como la proliferación celular, para restablecer el número de células, la migración de estas células epiteliales para cubrir la herida, la adherencia del epitelio a su matriz extracelular, y la diferenciación celular para adquirir diferentes fenotipos epiteliales (Akyol-Salman, 2006). Así, ante una lesión o un defecto epitelial corneal se inicia una primera fase de estabilización de la herida, en la cual se eliminan los restos celulares, las células se redondean y se reducen los hemidesmosomas del área de la lesión. A continuación, se sucede una *fase reparativa* en la que priman la migración celular, la proliferación celular y la producción de matriz extracelular. En esta fase, la movilidad celular se acelera, llegando a cubrirse en poco tiempo la zona, y recuperando el efecto barrera gracias a un incremento de la superficie celular. Además, las células primordiales del limbo se activan y proliferan, y se restablecen los complejos de unión entre las células y la membrana basal, así como las terminaciones nerviosas. Y por último, se da una *fase remodeladora o regenerativa*, en la que se produce la diferenciación y organización del nuevo tejido hasta alcanzar, en condiciones ideales, las características del tejido original (Klenkler *et al.*, 2004; Eraslan & Toker, 2009). En el caso de la córnea sólo el epitelio es capaz de llevar a cabo una regeneración completa.

El interés por el estudio de estos procesos biológicos que integran la reparación y regeneración de los tejidos ha ido en aumento (Deschaseaux *et al.*, 2009; Anitua *et al.*, 2010). Así, la mayor comprensión de la biología molecular de la célula y de las diversas funciones de los factores de crecimiento ha conducido a abrir múltiples líneas de investigación en la reparación y regeneración de los tejidos. De hecho, se sabe que un gran número de mediadores biológicamente activos tales como el EGF, el TGF- $\beta$ 1, el KGF, el HGF, el PDGF o el FGF, entre otros, regulan los mecanismos y vías implicados en la curación de heridas y regeneración de tejidos (Klenkler *et al.*, 2004). A la luz de estos conocimientos, diversos grupos investigadores están buscando nuevas tecnologías

personalizadas que permitan la liberación de múltiples factores de crecimiento de una manera rentable, así como facilitar la adaptación de la terapia para cada tipo de paciente. De este modo, han surgido nuevas disciplinas como la medicina regenerativa y la ingeniería de tejidos, basadas en la utilización de materiales como factores de crecimiento, células madre, preferentemente del propio paciente, junto con otros biomateriales que permitan desde la regeneración de los tejidos hasta su sustitución por tejidos y órganos bioingenierizados (Anitua *et al.*, 2008 a; Anitua *et al.*, 2016).

En los últimos años, se han desarrollado numerosos protocolos y tecnologías que utilizan la propia sangre del paciente, y especialmente las proteínas del plasma, derivados de las plaquetas, y factores de crecimiento, para promover la reparación y regeneración de tejidos (Wang *et al.*, 1999). De este modo, los hemoderivados han despertado un gran interés en diversas áreas de la medicina, incluyendo la oftalmología, concretamente en los trastornos de la superficie ocular. Teniendo en cuenta que la córnea es un tejido avascular, y que uno de los factores determinantes del potencial curativo de los tejidos consiste en su capacidad para aumentar el suministro de sangre a través de la angiogénesis fisiológica (Akyol-Salman, 2006), resulta interesante poder compensar la falta de angiogénesis fisiológica en la córnea mediante tratamientos tópicos con derivados de la sangre.

Dos de estos derivados de sangre, el AS y el PRP, han sido empleados como agentes terapéuticos en patologías de la superficie ocular (Alio *et al.*, 2007 a y 2007 b; López-García *et al.*, 2007 y 2014). Sin embargo, el uso del tercer hemoderivado objeto de nuestro estudio, el s-PRGF, tiene un origen más reciente, y ha sido introducido en los últimos años en el campo de la oftalmología por nuestro grupo (López-Plandolit *et al.*, 2010 y 2011). Así pues, en la práctica clínica el tratamiento con s-PRGF nos ha llevado a observar una mejoría sintomática en pacientes con ojo seco, debido probablemente a distintos efectos del mismo: una reducción indirecta de la inflamación mediante la disminución de la osmolaridad de la lágrima, la dilución de factores proinflamatorios presentes en la misma, la presencia en el s-PRGF de inhibidores potenciales de la inflamación y apoptosis, y de otros importantes factores de crecimiento, conocidos a su vez por su implicación en la reepitelización corneal, como el EGF (Hwang *et al.*, 2014; Stenwall, *et al.*, 2015). En esta tesis se presenta el primer estudio de investigación básica en el cual se compara la eficacia de este nuevo preparado con otros ya empleados en el campo de la oftalmología.

Las plaquetas juegan un papel fundamental en la elaboración de los hemoderivados. La plaqueta puede considerarse un reservorio de factores de crecimiento que son secretados durante diversos procesos fisiológicos, muchos de los cuales son clave para la regeneración

de los tejidos (Nurden *et al.*, 2008). Basándose en esta circunstancia, y en la posibilidad de obtener un alto número de plaquetas de sangre periférica, se han ido desarrollando terapias que emplean hemoderivados, denominados genéricamente como concentrados de plaquetas, ricos en cientos de proteínas que parecen tener potencial terapéutico.

La concentración fisiológica media de las plaquetas en un humano adulto sano es de 200.000 plaquetas/ $\mu$ l aproximadamente (rango entre 150.000 y 350.000 plaquetas/ $\mu$ l) (Marx, 2001). Actualmente, la hipótesis inicial de que “a mayor concentración plaquetaria, mayor beneficio regenerativo”, ha sido puesta en entredicho, y cada vez son más las publicaciones que apuntan a que cifras muy altas de plaquetas pueden tener un efecto nulo o incluso negativo sobre la regeneración de los tejidos (Lee *et al.*, 2016). Así pues, encontramos discrepancias en la bibliografía sobre el número ideal de plaquetas en un derivado plaquetario (Dohan *et al.*, 2014). Para algunos autores el concentrado rico en plaquetas ideal debe tener de cuatro a cinco veces la concentración sanguínea de plaquetas (Marx *et al.*, 1998; Weibrich *et al.*, 2004). Mientras, para otros autores una concentración superior a 300.000 plaquetas/ $\mu$ l es criterio suficiente para definirlo como un plasma rico en plaquetas (Anitua *et al.*, 2004). En el caso del PRGF se consigue una concentración plaquetaria de entre 2-5 veces la basal, cifra que según los autores citados anteriormente podríamos considerar moderada y óptima para la estimulación de la proliferación y la diferenciación celular. Además, nuestro grupo ha empleado con éxito todo el sobrenadante por encima de la capa leucocitaria, para el tratamiento de patologías oculares, en vez de solo la fracción inmediatamente por encima de la capa leucocitaria, conocida como fracción F3, que es la más rica en plaquetas (López-Plandolit *et al.*, 2010 y 2011). Cabe mencionar esta peculiaridad, ya que el volumen de la fracción F3 es pequeño, y sería necesario obtener grandes volúmenes de sangre en los caso de tratamientos crónicos. En este sentido, un estudio comparativo *in vitro* ha demostrado, de acuerdo con nuestros resultados, la misma eficacia cuando se usa la fracción F3 o todo el sobrenadante (Anitua *et al.*, 2011).

La concentración de plaquetas que se puede obtener de un individuo está directamente relacionada con la concentración basal de plaquetas en sangre periférica. Se ha publicado que esta variable es dependiente del sexo y del estado de salud del sujeto, sin embargo, no es dependiente de la edad (Weibrich *et al.*, 2002). Los valores obtenidos de la cuantificación plaquetaria de los voluntarios sanos que han participado en el presente estudio se encontraron dentro del rango de normalidad ( $193.420 \pm 51.580$  plaquetas/ $\mu$ l). Por el contrario, en la cuantificación de plaquetas de nuestros voluntarios no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos rangos de edad pero tampoco se encontraron diferencias entre los dos sexos.



Por otro lado, hay autores como Weibrich y Kleis, que muestran en sus estudios que no existe una correlación estadísticamente significativa entre el número de plaquetas y los niveles de los factores de crecimiento (Weibrich *et al.*, 2002), concluyendo que el número de plaquetas no es predictivo de los niveles de factores de crecimiento observados en los plasmas ricos en plaquetas. Nosotros también hemos observado este hecho. Otros autores defienden que las distintas técnicas de obtención de los plasmas ricos en plaquetas contribuyen a la variabilidad en la concentración de los factores de crecimiento. Así pues, la efectividad de los plasmas ricos en plaquetas puede depender de factores como el estado de activación plaquetario, o la fuerza y el tiempo de centrifugación, garantizando con ello que las plaquetas permanezcan intactas hasta su utilización (Zimmermann *et al.*, 2001; Dugrillon *et al.*, 2002). Así, Burmeister y sus colaboradores observaron diferencias en la concentración de factores epiteliotróficos (EGF, PDGF o TGF- $\beta$ ) en los concentrados de plaquetas, según el modo en que estimulaban la agregación y activación plaquetaria (Burmeister *et al.*, 2009). De hecho, hay prácticamente tantos métodos de obtención de hemoderivados como autores, lo que contribuye a dificultar la realización de estudios comparativos exactos.

En lo que respecta al anticoagulante utilizado, el citrato sódico parece ser el más idóneo ya que, a diferencia de otros, como el EDTA, no altera los receptores de membrana de las plaquetas y permite la reversibilidad del proceso al añadir cloruro cálcico. En estos casos, la centrifugación ha de ser menos potente que en la preparación del AS ya que nos interesa mantener integras las plaquetas para que la liberación de los factores de crecimiento sea una liberación activa y no se vea dificultada por una ruptura o fragmentación de las membranas celulares (Marx *et al.*, 1998). Además, se requiere de la integridad de la membrana plaquetaria para su correcta consecución puesto que muchos de los factores de crecimiento son secretados en su forma inactiva precisando de la adición de histonas y cadenas de carbohidratos a nivel de la membrana plasmática para poder desempeñar sus funciones (Eppley *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2010).

De los tres hemoderivados ensayados en esta tesis, el colirio de AS fue el primer preparado derivado de la sangre usado para el tratamiento de patologías de la superficie ocular (Tsubota *et al.*, 1999 a y 1999 b; Geerling *et al.*, 2004). Las primeras aplicaciones descritas en la bibliografía se atribuyen a Fox y sus colaboradores (Fox *et al.*, 1984), aunque no fue hasta 1999, gracias a los trabajos llevados a cabo por Tsubota (Tsubota *et al.*, 1999 a y 1999 b), cuando se tomó conciencia de los efectos beneficiosos del AS. A nivel de superficie ocular el AS no solo actúa como lubricante sino que también aporta numerosas sustancias esenciales para la recuperación del epitelio dañado, incluyendo entre otras la vitamina A, el

EGF, la fibronectina y una variedad de citoquinas (Lee *et al.*, 2016). En el proceso de elaboración de este hemoderivado la coagulación es espontánea, y se va a dar en presencia de leucocitos. En nuestro caso utilizamos tubos de extracción con gelosa que facilitan el proceso de coagulación. De manera secundaria a este proceso de coagulación, se produce la liberación del contenido plaquetario.

En el caso del plasma rico en plaquetas preparado en este estudio, denominado como PRP a lo largo de toda la tesis, las plaquetas no son activadas ni eliminadas. Concretamente, el PRP se obtiene a partir del sobrenadante que resulta de la centrifugación de la sangre no coagulada en tubos con citrato sódico. Así, algunos autores afirman que la activación del proceso de coagulación se produce sólo cuando el preparado se instila en el ojo y entra en contacto con la superficie ocular (Alio *et al.*, 2012). Por lo tanto, la liberación endógena de activadores de la coagulación en el sitio de la aplicación daría lugar a una liberación más lenta de factores de crecimiento y mediadores químicos, proporcionando un efecto más largo, y según Alio y sus colaboradores, aventajando el PRP sobre el AS gracias a esta particularidad (Alio *et al.*, 2007 a y 2007 b). Sin embargo, otros autores afirman que cuando el PRP se congela para su mantenimiento durante meses, las plaquetas se rompen con la congelación-descongelación de las mismas, secretando todo su contenido en factores de crecimiento. No obstante, este proceso también hace que en el PRP resultante permanezcan libres los restos de las membranas plaquetarias lisadas. Incluso, algunos autores afirman que las membranas rotas de las plaquetas además de dar un aspecto turbio al preparado, desencadenan una respuesta inflamatoria, pudiendo incluso inducir la muerte celular por apoptosis (Dugrillon *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006).

En la elaboración del tercero de los hemoderivados, el s-PRGF, tras obtener el sobrenadante resultante de la centrifugación de la sangre no coagulada, se induce la coagulación con cloruro cálcico activando las plaquetas y así, liberando los factores de crecimiento al sobrenadante. La activación con cloruro cálcico se considera preferible frente a la activación con trombina, ya que permite una liberación más sostenida y fisiológica de los componentes plaquetarios, sin reacciones inmunológicas ni la aparición de coagulopatías (Lawson, 2006). Así, el cloruro cálcico aporta calcio y desbloquea el efecto quelante producido por los anticoagulantes presentes en el tubo de extracción, como el citrato sódico. Además, al haber eliminado los elementos formes de la sangre por centrifugación, la liberación de los factores de crecimiento en este caso se produce en ausencia de leucocitos, evitando así posibles efectos anti-inflamatorios de las proteasas y las hidrolasas ácidas contenidas en los glóbulos blancos (Weibrich *et al.*, 2005; Trindade-Suedam *et al.*, 2007; Anitua *et al.*, 2009).

Por lo tanto, una de las principales diferencias en la producción de estos preparados derivados de sangre, radica en la presencia o ausencia de los leucocitos durante la coagulación. Este es un tema controvertido, ya que algunos autores destacan la necesidad de que estos preparados no presenten ni leucocitos ni eritrocitos, pues la presencia de enzimas proteolíticas y sustancias proinflamatorias del leucocito podría mermar sus potenciales beneficios (Schnabel *et al.*, 2007; Anitua *et al.*, 2009). Por ejemplo, los leucocitos secretan citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- $\alpha$ , el interferón- $\gamma$ , la IL-6 y -1b, que causan la destrucción de la matriz a través de la producción de MMP-1, -3 y -13 (Anitua *et al.*, 2015). Sin embargo, otros autores afirman que la presencia de leucocitos durante la activación de las plaquetas puede ser altamente beneficiosa debido a sus propiedades antimicrobianas (Cieslik-Bielecka *et al.*, 2007; Moojen *et al.*, 2008), y su capacidad para liberar mediadores con efecto analgésico como la IL-4, IL-10, beta endorfina y otros opioides (Bielecki *et al.*, 2012). Dohan Ehrenfest y sus colaboradores afirman que posiblemente los leucocitos serán más o menos beneficiosos dependiendo de si son monocitos, linfocitos o granulocitos, de su cantidad y su estado de activación (Dohan Ehrenfest *et al.*, 2014). En lo que se refiere a las propiedades antimicrobianas, Anitua y sus colaboradores afirman que el potencial antimicrobiano observado se debe tanto a las proteínas antimicrobianas procedentes de las plaquetas como a la fibrina, y no a la presencia de leucocitos en su composición. Así, han observado que la actividad antimicrobiana/bacteriostática del s-PRGF en presencia o ausencia de leucocitos era similar, no mejorando significativamente las propiedades antimicrobianas con la presencia de leucocitos en el preparado (Anitua *et al.*, 2012).

Para la comprensión del efecto terapéutico de los hemoderivados autólogos, conocer la concentración de los factores de crecimiento presentes en los mismos resulta un paso muy importante. Se considera que estos factores de crecimiento pueden influir de algún modo en el proceso de cicatrización y regeneración corneal, y su concentración podría explicar los diferentes efectos de cada uno de los derivados de sangre. Con el fin de caracterizar el contenido de estos factores en cada hemoderivado se cuantificó la concentración de varios factores de crecimiento y de la fibronectina. No es fácil comparar la concentración de factores de crecimiento entre diferentes preparados derivados de sangre, encontrándose en la bibliografía una gran variabilidad de resultados. Esta variabilidad se podría atribuir a la metodología de elaboración empleada según los distintos autores, a los sistemas de cuantificación y a la variabilidad interindividual de los donantes (Geerling *et al.*, 2004; López-García *et al.*, 2007). Cabe tener en cuenta que el efecto de los factores de crecimiento no depende sólo de su concentración sino también de la cantidad y sensibilidad de sus

receptores de membrana en las células, cuya presencia en la membrana plasmática es regulable por las propias células.

Los resultados obtenidos en nuestra muestra de voluntarios sanos, en cuanto a la cuantificación de algunos de los factores de crecimiento más importantes implicados en los procesos de regeneración y remodelación del epitelio corneal, reflejan importantes diferencias en las concentraciones de los factores de crecimiento entre los distintos voluntarios. Esta variabilidad interindividual hace difícil obtener conclusiones generales acerca de la relación entre la eficacia del hemoderivado, su método de elaboración y la concentración de factores de crecimiento. Por ello, para minimizar esta variabilidad entre los donantes (voluntarios) y que pudieran observarse las diferencias entre los distintos hemoderivados, en los ensayos *in vitro* se realizó un pool de todos los voluntarios para cada tipo de hemoderivado, inactivando previamente el factor del complemento. Posteriormente, Anitua y sus colaboradores han demostrado que tras la inactivación del complemento e inmunoglobulinas mediante calentamiento del s-PRGF a 56° C durante una hora, con el objetivo de disminuir los componentes proinflamatorios, el hemoderivado conserva la mayoría de proteínas y morfógenos involucrados en los procesos de la regeneración y cicatrización de heridas mientras reduce drásticamente el contenido de Ig E y la actividad del complemento (Anitua *et al.*, 2014). Cabe destacar que observaron una reducción significativa de la concentración de EGF en el hemoderivado tras la inactivación, no mostrando correlación con una disminución en la proliferación celular (Anitua *et al.*, 2014).

Sin embargo, es interesante reseñar que nuestros resultados son altamente concordantes con los resultados observados en un estudio previo sobre pacientes con defecto epitelial persistente (López-Plandólit *et al.*, 2010). La única salvedad encontrada en este trabajo previo fueron niveles de HGF superiores y niveles de PDGF algo más bajos a nuestros resultados. Se observó que a pesar de que la edad media de nuestros voluntarios ( $44,25 \pm 9,22$  años) es menor que la edad media de los pacientes de dicho estudio ( $57,78 \pm 5,41$  años), y que posiblemente el estado de salud de nuestros voluntarios sea mejor que el del grupo de pacientes, los datos en cuanto a la cuantificación de factores de crecimiento son considerablemente reproducibles.

Se ha demostrado que el EGF induce la proliferación de células epiteliales, (Kitazawa *et al.*, 1990; Rodeck *et al.*, 1997) y, como en toda reparación de tejidos, la proliferación celular es un paso necesario para la cicatrización y reparación corneal. En concordancia con esta afirmación, observamos que el EGF, en nuestro estudio, es un factor crítico para la proliferación de células HCE, ya que la ausencia de EGF en el medio de cultivo, conduce a casi una reducción del 50% en la proliferación de estas células. Tras la cuantificación del

EGF en los distintos derivados de sangre, las mayores concentraciones de EGF se obtuvieron en el preparado s-PRGF. Así, la presencia de estos altos niveles de EGF es probable que sea una de las razones para la alta actividad proliferativa de las células HCE incubadas con s-PRGF, seguidas por las incubadas con AS. Por el contrario, en el preparado de PRP, en el cual no ha habido coagulación ni activación de las plaquetas, se encontraron los niveles más bajos de EGF y además se observó un efecto más débil sobre el crecimiento de las células epiteliales de córnea. En este sentido, observamos que las células mantenidas en medio de cultivo básico con s-PRGF, sin añadir siquiera un suplemento de EGF, que suele ser habitual añadir al medio de cultivo de células epiteliales, no disminuyen sustancialmente su ritmo de proliferación. Esto pudiera ser debido a que el s-PRGF compensa la falta de EGF, gracias a la elevada concentración de este factor de crecimiento en el propio hemoderivado.

Se ha descrito que el FGF promueve la proliferación y diferenciación de diversas estirpes celulares, entre las que están las células epiteliales (Wilson *et al.*, 1992 a y 1992 b). Este factor de crecimiento presente en los tres hemoderivados estudiados puede actuar como un factor trófico en los cultivos celulares ya que así lo hace en la superficie ocular tras un daño corneal (Schechter *et al.*, 2000). En nuestro caso, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los tres preparados, aunque sí observamos que se trata de un factor de crecimiento dependiente de la edad; a mayor rango de edad se cuantificó menor concentración de FGF y viceversa.

Concentraciones del factor de crecimiento HGF entre 1 y 25 ng/ml, las cuales no han sido alcanzadas en ninguno de nuestros tres hemoderivados, estimulan la proliferación celular en las células epiteliales corneales (Klenkler *et al.*, 2007). También, este factor de crecimiento promueve la migración de células e inhibe la diferenciación en las regiones de baja densidad celular (Klenkler *et al.*, 2007). Otros autores, también sugieren que el HGF puede contribuir a recubrir la zona dañada tras una lesión corneal y que su presencia en la lágrima contribuye en parte a la proliferación y diferenciación normal del epitelio de la superficie ocular (Tervo *et al.*, 1997). Además, el HGF ha demostrado estar implicado en la mejora paracrina de la angiogénesis mediante la inducción de la expresión del VEGF. Por lo tanto, VEGF y HGF pueden ser secretados o sintetizados en el mismo ambiente local (Anitua *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, la concentración significativamente elevada de HGF presente en el AS obtenida en nuestro estudio, podría inducir efectos angiogénicos. Sin embargo, a pesar de estos niveles de VEGF y HGF, no se ha detectado neovascularización en ninguno de los pacientes tratados con AS (López-Plandolit *et al.*, 2010). Esta ausencia de neovascularización podría ser debida a un efecto inhibitorio, o a la existencia de un equilibrio

entre factores proangiogénicos (VEGF, HGF, etc) y factores anti-angiogénicos (trombospondina-1, factor plaquetario-4, endostatina) en los preparados derivados de sangre (Anitua *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que el PDGF estimula *in vitro* e *in vivo* la mitosis y la migración de los queratocitos, así como la quimiotaxis de células epiteliales en presencia de fibronectina (Molloy *et al.*, 2003; Klenkler *et al.*, 2007). Sin embargo, esta actividad mitogénica se inhibe sólo modestamente por un anticuerpo anti-PDGF (Anitua *et al.*, 2007), lo que sugiere que otras proteínas pueden contribuir a la proliferación celular total. De hecho, nuestros datos mostraron niveles similares de PDGF en los tres derivados de sangre, los cuales sin embargo han mostrado patrones muy diferentes de proliferación celular tanto en células HCE como en cultivos primarios RPCE. Hartwig y sus colaboradores observaron cantidades significativamente altas de PDGF en el suero descrito por el autor en comparación con un plasma rico en plaquetas (Hartwig *et al.*, 2005), pudiendo ser el PDGF, junto con la mayor concentración de EGF, uno de los factores que concede mayor capacidad epiteliotrófica al suero que presenta el autor. Estos mismos investigadores comparan el suero con un concentrado plaquetario en el cual han inducido coagulación, y observan que la concentración de PDGF es significativamente menor al comparar con el concentrado plaquetario (Hartwig *et al.*, 2004). Cabe destacar que las concentraciones de PDGF del suero de estos ensayos eran parecidas a las observadas en nuestros tres hemoderivados, ya que como hemos comentado fueron similares y sin diferencias estadísticamente significativas entre los tres.

En nuestros tres preparados derivados de sangre detectamos altas concentraciones de fibronectina, aunque no son valores tan altos como los encontrados por Geerling y sus colaboradores (Geerling *et al.*, 2004) en su suero autólogo, pues ellos obtienen una concentración del orden de casi siete veces más concentrada. Aun así, las concentraciones de fibronectina de nuestros hemoderivados son superiores a la encontrada en lágrima (Geerling *et al.*, 2004). La fibronectina es una glicoproteína de la matriz extracelular, implicada en la adhesión de las células a dicha matriz (Fukuda *et al.*, 1996). Durante la cicatrización de las heridas, los receptores de fibronectina aumentan en las células epiteliales, de forma que las células migran sobre la zona desepitelizada (Stepp *et al.*, 1993). Por lo tanto, los altos niveles de fibronectina encontrados en los derivados sanguíneos podrían favorecer la migración celular. Sin embargo, cabe suponer que otras moléculas entrarán en juego durante el proceso de migración, las cuales serían responsables de marcar las diferencias observadas en los resultados de los ensayos de migración *in vitro*, tanto en células HCE como en cultivos RPCE en presencia de cada uno de los tres

hemoderivados. Conviene apuntar en este sentido, que las células que migran sobre la herida expresan altos niveles de receptor de EGF (Ratkay-Traub *et al.*, 2001) y también, se ha descrito *in vitro* que el EGF activa la expresión de las integrinas, las cuales se unen a la fibronectina, favoreciendo la unión de las células a la matriz extracelular (Nishida, 2010). Por lo tanto, los niveles relativamente altos de EGF en el s-PRGF también podrían contribuir a mejorar la cicatrización y regeneración de heridas favoreciendo la migración celular.

En un estudio de similares características al nuestro, Liu y sus colaboradores observaron una mayor concentración de factores de crecimiento, como el EGF, el PDGF y el TGF- $\beta$ 1 en un concentrado plaquetario en el cual se había inducido la coagulación (similar a nuestro s-PRGF), que en el suero utilizado por ellos (similar a nuestro AS), o en un plasma fresco congelado (parecido a nuestro PRP). El concentrado plaquetario fue claramente mejor en la estimulación de la actividad metabólica de las HCE, promoviendo una mayor proliferación celular (Liu *et al.*, 2006), siendo probablemente debido a las altas concentraciones de los factores de crecimiento citados. Además, estos autores obtienen, con el plasma fresco congelado, una baja estimulación en el crecimiento celular, siendo este preparado el que contiene concentraciones de factores de crecimiento más bajas de los tres hemoderivados. Por otro lado, la concentración de fibronectina y vitamina A y E fue significativamente mayor en el suero que en los otros dos hemoderivados (Hartwig *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006). López-García y sus colaboradores obtienen en su suero una concentración de EGF muy similar a la observada por nuestro grupo en nuestro AS, y también a la observada por Geerling o Fischer en sus sueros (Geerling *et al.*, 2004; Fischer *et al.*, 2012). Al comparar los valores publicados, vemos como la concentración del EGF en el suero es mayor que en otros preparados como el plasma, pero menor que en los concentrados plaquetarios (López-García *et al.*, 2011). Sin embargo, hemos encontrado en la bibliografía un trabajo (Kim *et al.*, 2012) en el que un plasma rico en plaquetas contiene una elevada concentración plaquetaria, una alta concentración de TGF- $\beta$  y 2,5 veces más concentración de EGF, comparado con el suero que emplean en este trabajo. Cabe destacar que en la elaboración de este concentrado plaquetario se incluye la fracción leucocitaria que está inmediatamente por debajo de la fracción más enriquecida en plaquetas, además de no haber tenido lugar la coagulación.

Para determinar los efectos *in vitro* de cada preparado derivado de sangre usado en la presente tesis doctoral, se estudiaron en la línea celular de epitelio corneal humano, HCE, y en cultivos primarios de células del epitelio corneal de conejo, RPCE, diversos procesos celulares implicados en la cicatrización corneal. Para ello, se usaron las concentraciones de los hemoderivados que se utilizan habitualmente en la práctica clínica, 10, 20 y 50%. Cabe

destacar que para los cultivos de células HCE los hemoderivados evaluados fueron de sangre humana, mientras que en los cultivos primarios RPCE los hemoderivados fueron obtenidos a partir de sangre de conejo, siendo nuestro grupo el primero en adaptar la elaboración del s-PRGF a este modelo animal (Etxebarria *et al.*, 2016). En lo que respecta a la proliferación celular, tanto el AS como el s-PRGF, indujeron una robusta proliferación en los cultivos de células HCE. Notablemente, los cultivos incubados en presencia de s-PRGF no mostraron una tendencia a reducir su viabilidad celular en las primeras 24 horas, como ocurrió en los cultivos incubados con AS y PRP. Estos resultados, plantean la posibilidad de que el s-PRGF pueda ser mejor tolerado inicialmente por el epitelio corneal que los otros dos tratamientos. Por otro lado, las células HCE que se cultivaron con otros preparados derivados de sangre similares producidos por otros investigadores, han mostrado también una reducción sustancial en la viabilidad celular en las primeras 24 horas de cultivo (Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, mostramos que la viabilidad de los cultivos expuestos a las tres preparaciones estudiadas en esta tesis mantiene un ritmo de proliferación creciente y constante, una vez transcurridas las primeras 24 horas, demostrando que el tratamiento prolongado con estos hemoderivados es adecuado para su aplicación clínica.

En este contexto la respuesta proliferativa de las células expuestas a AS y s-PRGF fue dosis-dependiente, no siendo así para las células cultivadas con PRP donde la respuesta fue muy similar para las tres concentraciones. En esta línea, Liu y sus colaboradores observaron en cultivos de células HCE incubadas con dos hemoderivados parecidos a nuestros AS y PRP, que estas no mostraban una respuesta proliferativa dosis dependiente, obteniéndose a las 24 horas y a la concentración del 12% su mejor proliferación (Liu *et al.*, 2006). Esta disminución de la tasa de crecimiento celular al aumentar la concentración del hemoderivado podría ser debida a la presencia de factores de inhibición del crecimiento en los propios derivados hemáticos (Liu *et al.*, 2006). En esta línea, Choi y sus colaboradores observaron que un plasma rico en plaquetas, similar a nuestro PRP, en concentraciones superiores al 5% tiene un efecto inhibitor sobre la regeneración de injertos de hueso autólogos *in vitro*, y que dicho efecto aumenta progresivamente a mayor concentración del hemoderivado (Choi *et al.*, 2005). Por el contrario, en el estudio de Liu y sus colaboradores, y en otro llevado a cabo por Hartwig, un concentrado plaquetario en el cual la coagulación había sido inducida, como ocurre en el s-PRGF, estimuló una respuesta proliferativa dosis dependiente (Hartwig *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006) en consonancia con nuestros resultados.

En lo que respecta a los ensayos llevados a cabo con cultivos primarios RPCE, los cultivos crecidos en presencia de AS y s-PRGF tuvieron una proliferación creciente a lo largo del tiempo no llegando a ser dosis dependiente como en el caso de las células HCE. Liu y sus



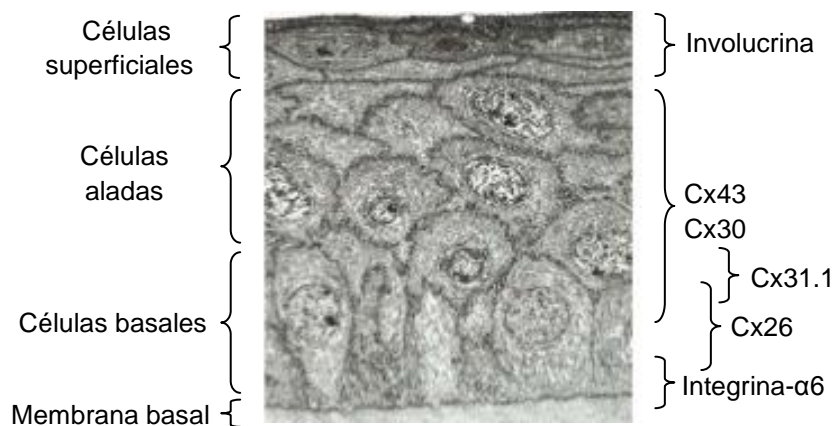
colaboradores afirmaron que la respuesta proliferativa de células epiteliales de cultivos primarios de conejo en presencia de un hemoderivado al 50%, en el cual las plaquetas habían sido activadas tras su concentración, fue menor que la de las células HCE (Liu *et al.*, 2006). Igualmente, nuestros resultados muestran que la tasa proliferativa de los cultivos primarios RPCE incubados con cada uno de los tres hemoderivados al 50% fue menor que en las células HCE. Sin embargo, cuando Liu *et al* cultivaron los cultivos primarios con su hemoderivado a una concentración del 100% la proliferación fue mayor en los cultivos primarios de conejo que en la línea establecida HCE (Liu *et al.*, 2006).

Con el fin de profundizar en el conocimiento de los efectos de los factores de crecimiento y otras moléculas fundamentales del medio de cultivo sobre las células epiteliales HCE, se realizaron ensayos suprimiendo del medio de cultivo alguno de los suplementos que *a priori* resultaban indispensables. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia de EGF en el cultivo resulta crítica para el crecimiento celular, ya que cuando no añadimos EGF al medio de cultivo y comparamos la tasa de proliferación celular con un cultivo en presencia de todos los suplementos, esta se ve reducida a la mitad tras 72 horas de cultivo. De acuerdo con esto, el hecho de que en el s-PRGF se detecten las dosis más altas de EGF de los tres preparados, como se ha visto en la cuantificación de los factores de crecimiento, puede ser una de las razones que explique el mejor patrón de proliferación en los cultivos de HCE con s-PRGF. Así, cuando los suplementos (EGF, insulina, toxina colérica y DMSO) se sustrajeron de un cultivo celular en presencia de s-PRGF, la tasa de proliferación tras 24 horas simplemente se redujo al 70% con respecto a la proliferación de las células del cultivo en presencia de s-PRGF con todos los suplementos. Sin embargo, el mismo cultivo con SBF en lugar de s-PRGF, pero añadiendo además EGF, redujo su tasa de proliferación al 55% con respecto a un cultivo control. Estos datos sugieren la presencia de factores en el s-PRGF, que compensan la falta de suplementos del medio de cultivo de forma muy superior a como lo hace el SBF.

La microscopía óptica y electrónica en los cultivos de células HCE mostró en presencia de AS y PRP, una población celular bastante homogénea, con células de mediano y gran tamaño. Los cultivos incubados con PRP mostraron una densidad celular menor, debida probablemente al patrón de crecimiento más lento que se da con este tratamiento, como habíamos observado en los ensayos de proliferación celular. También en estos cultivos incubados con PRP se pudo observar una importante cantidad de detritus, debido probablemente a los restos plaquetarios que le confieren un alto grado de turbidez al preparado, y que algunos autores sugieren que pueden inducir muerte celular por apoptosis (Dugrillon *et al.*, 2002). Por el contrario, las células HCE incubadas con el s-PRGF

mostraron una morfología celular más heterogénea y más parecida al SBF, donde distinguimos dos subpoblaciones: una subpoblación de células pequeñas formando colonias compactas que pueden corresponder a células fenotípicamente más indiferenciadas y que podrían ser una fuente importante para la renovación del epitelio; y otra subpoblación de células grandes y aplanadas, que probablemente representan una subpoblación con un fenotipo más diferenciado. En el caso de los cultivos de células HCE mantenidas en ausencia de los suplementos habituales del medio de cultivo, observamos en todos los casos un fenotipo más diferenciado, siendo más evidente en los cultivos incubados con s-PRGF y SBF (frente AS y PRP), puesto que las colonias de células de pequeño tamaño que habíamos observado con el medio de cultivo completo y, que habíamos asociado con un fenotipo en cierto modo indiferenciado, se veían ahora en raras ocasiones, coexistiendo en colonias expandidas las células de tamaño mediano y grande. En concordancia con estos datos, Shurman *et al* confirman que como consecuencia de la diferenciación de las células corneales en cultivo se da el aplanamiento celular y la formación de grandes capas epiteliales aumentando así la comunicación intercelular (Shurman *et al.*, 2005).

Las células epiteliales corneales se comunican entre ellas a través de uniones tipo gap que comunican los citoplasmas de células adyacentes (Scott *et al.*, 1997; Gipson, 1992; Suzuki *et al.*, 2000; Ban *et al.*, 2003). Estas uniones tipo gap, las cuales están formadas por proteínas denominadas conexinas, pueden contribuir a la regulación de las funciones de las células epiteliales corneales tales como las que se producen durante el proceso de reparación tras una herida corneal: crecimiento, diferenciación, adhesión y migración celular (Gipson *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2000; Kimura *et al.*, 2010), mediado por el paso de moléculas de señalización a través de estas uniones celulares. Conocemos a través de la bibliografía la existencia de la expresión de estas conexinas en las células HCE, y que se distribuyen de manera diferente en las distintas capas del epitelio corneal (Hernández Galindo *et al.*, 2003). La Cx26 se expresa en las membranas plasmáticas basolaterales de las células epiteliales basales (Shurman *et al.*, 2005; Zhai *et al.*, 2014), mientras que la Cx31.1 aparece en la membrana apical de las células basales (Figura 1). La Cx30 y la Cx43 se localizan específicamente en la cara apical de las células basales del epitelio y en todas las membranas de las células suprabasales o aladas (Dong *et al.*, 1994). Estas conexinas (Cx26, Cx30, Cx31.1 y Cx43) no se expresan en las células más diferenciadas de las capas superiores del epitelio (Shurman *et al.*, 2005), mientras que si lo hace la proteína involucrina.



**Figura 1.** Micrografía de microscopía electrónica de transmisión del epitelio corneal humano. (Adaptado de <http://image.slidesharecdn.com>)

Cuando se produce una herida corneal, el proceso de curación comienza inmediatamente, para poder restablecer la homeostasis de la córnea mediante la restauración de la función de barrera permeable de la superficie ocular (Zieske & Gipson, 1994). Así, el recubrimiento de la herida se consigue mediante la migración de las células adyacentes al área lesionada, las cuales experimentan cambios fenotípicos sustanciales, uniéndose tanto al sustrato como entre ellas (Chin, 2011; Kawakita *et al.*, 2011). Durante este proceso, numerosas uniones célula-célula se conservan, para asegurarse que las células migran como una lámina coherente (Matic *et al.*, 1997).

Sin embargo, se ha publicado que una baja expresión de la Cx-43 está relacionada con una mayor capacidad de las células para migrar (Suzuki *et al.*, 2000; Ratkay-Traub *et al.*, 2001; Matic *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 2008). En nuestros ensayos, encontramos que cuando las células HCE son tratadas con cualquiera de los tres hemoderivados se da una menor expresión del gen de la Cx43, si comparamos con la expresión observada en los controles cultivados con SBF. Esta bajada de expresión de la Cx43 puede reflejar un proceso de migración activo, indicando que el tratamiento inmediato de la herida con los hemoderivados podría favorecer la migración celular, en un primer paso para la reepitelización corneal tras una lesión. En consonancia con estos resultados, al estudiar la dinámica de la expresión de la proteína Cx43 durante la cicatrización corneal, Zhai y sus colaboradores encontraron una disminución de la expresión de la Cx43 en el frente de migración de la herida, pero un aumento de la misma en el epitelio de más atrás de los bordes de la herida (Zhai *et al.*, 2014).

Una vez transcurridas las primeras horas en que las células migran y recubren la herida, estableciendo la función de barrera del nuevo epitelio, las células epiteliales proliferan y van

diferenciándose para formar un epitelio estratificado. En este contexto, se ha sugerido que en general un aumento de expresión de conexinas, debido al establecimiento de nuevas uniones gap entre las células epiteliales corneales puede ser indicativo de la diferenciación celular (Ratkay-Traub *et al.*, 2001; Shurman *et al.*, 2005; Micallef *et al.*, 2009), y de la formación de un epitelio bien organizado y estructurado. En los cultivos tratados con s-PRGF detectamos una mayor expresión en dos de las tres conexinas estudiadas, en comparación con los cultivos tratados con AS o PRP. También es mayor la expresión de la proteína involucrina. Esta proteína se expresa de manera muy marcada en las células más diferenciadas (Chen *et al.*, 2004), siendo una proteína estructural presente únicamente en el citosol de las células superficiales del epitelio corneal humano (Chen *et al.*, 2004). Estos resultados están en consonancia con nuestras observaciones a nivel morfológico, en las que se presentaba una subpoblación de células grandes y aplanadas en estos cultivos tratados con s-PRGF, morfología típica de células diferenciadas, junto con colonias compactas de bordes redondeados y que contienen células pequeñas y con aspecto indiferenciado. En este tipo de células subyacería la mayor capacidad proliferativa de los cultivos de HCE tratados con s-PRGF, pudiendo ser las homólogas *in vitro* de las que son responsables de la renovación del epitelio. Además, estas células más indiferenciadas explicarían el gran aumento en los niveles de expresión de la molécula integrina- $\alpha 6$  inducido por s-PRGF en contraposición del AS y PRP. Esta molécula se expresa principalmente en las células de la capa basal del epitelio como componente de los hemidesmosomas, siendo una molécula de adhesión que une las células epiteliales menos diferenciadas de la capa basal a proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina (Schlötzer-Schrehardt & Kruse, 2005). Esto, junto con el alto contenido en fibronectina que presentan los tres hemoderivados favorecería la adhesión y migración celular, como ya se ha comentado anteriormente.

Respecto a los cultivos mantenidos en ausencia de suplementos, estos mostraron un claro aumento de la expresión génica de la involucrina y la Cx31.1, sugiriendo un fenotipo más diferenciado también descrito por otros autores (Brissette *et al.*, 1994; Laux-Fenton *et al.*, 2003). Este fenotipo más diferenciado lo hemos corroborado mediante nuestros estudios de microscopía. Coherentemente, esta diferenciación celular se ha visto asociada a una reducción en la proliferación celular.

La cicatrización epitelial corneal tras un defecto epitelial en la córnea implica previamente a la proliferación y diferenciación celular, como hemos venido diciendo, la migración de las células epiteliales para cubrir el área desepitelizada. Así, en la curación de las heridas, las células epiteliales distales al área de la herida son estimuladas para migrar hacia ella, y así poder restaurar la función de barrera del epitelio corneal (Zieske & Gipson, 1994). En la

bibliografía encontramos estudios de “*wound healing*” para determinar la capacidad de migración celular (Burmeister *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2007; Movahedan *et al.*, 2012), en los que se afirma que a mayor dilución del hemoderivado mayor retraso en el tiempo de cierre del área desepitelizada, así pues estos autores ratifican que las células estimuladas con AS sin diluir migran más rápidamente que las incubadas con el hemoderivado diluido (Fischer *et al.*, 2012). Sin embargo para nuestros ensayos, consideramos que la concentración adecuada para llevar a cabo estos experimentos era la del hemoderivado al 50%, ya que los cultivos celulares necesitan medio de cultivo básico y otra serie de suplementos imprescindibles para un mantenimiento normal del cultivo. Además, gracias a un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo concluimos que concentraciones de s-PRGF superiores al 50% no reflejaban buenos resultados en los ensayos de migración celular, induciendo un menor efecto quimiotáctico que los cultivos tratados con s-PRGF al 50% (Etxebarria *et al.*, 2016). Así, concentraciones altas de factores de crecimiento como el PDGF pueden reducir el proceso de migración. Concretamente en fibroblastos NIH3T3 el efecto de la migración fue más fuerte con una concentración moderada de PDGF, disminuyendo su efecto con concentraciones más altas (De Donatis *et al.*, 2008). Igualmente, esto junto con la presencia de un exceso de moléculas inflamatorias que podrían producir efectos inhibidores y citotóxicos en los hemoderivados altamente concentrados, podría ser la razón de la eficacia óptima de hemoderivados moderadamente concentrados para promover la quimiotaxis *in vitro*. Sin embargo, *in vivo*, esta cuestión no es relevante ya que aunque los hemoderivados no sean diluidos para su utilización como colirio, se diluirán con la película lagrimal al entrar en contacto con la superficie ocular (Etxebarria *et al.*, 2016).

Los ensayos de “*wound healing*” realizados en este estudio demostraron que los tres hemoderivados mejoran la capacidad migratoria de las células, tanto en células HCE como en cultivos RPCE, comparando con los cultivos control en presencia de BSA al 1%. Sin embargo, AS y s-PRGF inducen una recuperación de la herida notablemente más rápida. Esta capacidad de los hemoderivados de mejorar la migración celular, ha sido asociada, por determinados autores, con el alto contenido en fibronectina de los hemoderivados (Fukuda *et al.*, 1996; Nishida, 2010). Así, la fibronectina, como se ha comentado, favorece la adhesión de las células a la matriz extracelular (Fukuda *et al.*, 1996), por lo que podría servir como una matriz provisional para la migración de las células epiteliales promoviendo la curación de la herida epitelial (Nishida, 2010). Precisamente, cuando cuantificamos la concentración de la fibronectina en nuestros tres hemoderivados estudiados obtuvimos valores más altos que los observados por otros autores en sus preparados derivados de sangre (Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, Fischer y sus colaboradores en su preparado de

suero, que se diferencia del AS estudiado en esta tesis en la mayor velocidad de centrifugación durante su elaboración, presenta niveles cinco veces superiores a los observados en nuestro estudio (Fischer *et al.*, 2012). Por otro lado, algunos autores sugieren que en presencia de fibronectina, el factor de crecimiento PDGF estimula la migración de células del epitelio corneal durante la reparación corneal (Klenkler *et al.*, 2007), factor de crecimiento que también se encontraba en grandes cantidades en nuestros preparados.

Como se ha discutido previamente, en los tres hemoderivados estudiados observamos un alto contenido en fibronectina y en PDGF, y una baja expresión de la Cx-43. Sin embargo, estos factores no parecen ser los responsables de la mayor capacidad de migración de las células tratadas con AS o s-PRGF con respecto a las células que fueron tratadas con PRP. El diferente comportamiento de estos tres hemoderivados podría deberse a otras diferencias bioquímicas entre ellos, ya que está demostrado que la diferente metodología empleada para obtener cada derivado de la sangre conduce a diferentes contenidos de algunas moléculas claves. Una de ellas puede ser el factor de crecimiento EGF, pues se ha descrito que el EGF tiene un papel importante en la proliferación de células epiteliales y mejora la migración mediante el reordenamiento de filamentos de actina (Shen *et al.*, 2011). Además, altos niveles del receptor del EGF han sido determinados en células que migran sobre las heridas (Ratkay-Traub *et al.*, 2001). Así, en nuestros experimentos las mayores concentraciones de EGF las cuantificamos en el AS y en el s-PRGF, lo cual podría explicar no solo la mayor tasa de proliferación celular en células HCE y cultivos RPCE en comparación con el PRP, sino también la mayor capacidad de migración celular en ambos tipos celulares. Sin olvidar, que otras moléculas no cuantificadas en este trabajo también podrían explicar el diferente comportamiento de los hemoderivados.

Por lo tanto, las concentraciones más bajas de EGF, así como el efecto más débil sobre el crecimiento y la migración de las células epiteliales de la córnea, las observamos con el PRP, el único de los tres hemoderivados en el que no se ha producido la activación plaquetaria. Estos resultados concuerdan con los datos reportados previamente por otros autores como Burmeister y sus colaboradores (Burmeister *et al.*, 2009). En su estudio, la migración de las células de Müller (células gliales localizadas en la retina) fue claramente más rápida cuando las células se incubaron con un hemoderivado en el cual se había inducido previamente la coagulación con trombina, que con otros derivados de la sangre similares al PRP, en los que no se había producido coagulación (Burmeister *et al.*, 2009).

Sin embargo, no debemos olvidar que a pesar de que los sistemas de cultivo *in vitro* son herramientas muy útiles para entender mejor y emular las situaciones *in vivo*, son ambientes simplificados en los cuales no se puede reproducir la complejidad fisiológica y las

interacciones moleculares entre la película lagrimal y la superficie ocular (Shen *et al.*, 2011). Además, en los ensayos *in vitro* las células están expuestas de forma continuada a los hemoderivados, mientras que en los modelos *in vivo* no es continua, pues el tratamiento se va diluyendo con la lágrima, y su eficacia puede estar condicionada por la frecuencia de administración, pudiendo ser este otro factor a tener en cuenta en el proceso de curación de la herida (Shen *et al.*, 2011). Por todo ello, los experimentos *in vivo* con hemoderivados autólogos (hemoderivados elaborados a partir de la sangre de cada conejo) son necesarios para confirmar que las observaciones en los cultivos se correlacionan con los efectos sobre la reparación corneal. Probablemente por estas razones, hemos encontrado que, aunque el AS y el s-PRGF se comportan de una manera similar *in vitro*, hay diferencias en su efecto *in vivo*. En nuestros ensayos de reepitelización *in vivo* observamos que los tres hemoderivados autólogos aceleraron el proceso de cicatrización de la herida corneal en comparación con una lágrima artificial farmacéutica sin conservantes. Sin embargo, la capacidad de cicatrización no ha sido igual de eficaz para los tres derivados de la sangre, siendo el s-PRGF el más eficaz en dichos ensayos *in vivo*.

En nuestros ensayos *in vivo* en córneas de conejos, aunque el tiempo medio para completar la reepitelización fue similar con los tratamientos de AS y de s-PRGF, la mayoría de los defectos epiteliales (80%) en el grupo de s-PRGF estaban reepitelizados en 3,5 días después de la cirugía, mientras que menos de la mitad (40%) lo había hecho en el grupo tratado con AS a este tiempo. Además, el preparado de s-PRGF es el único tratamiento en el que, a partir de los 2,5 días en adelante desde la cirugía, el tamaño de la herida fue significativamente menor que en los ojos de conejo que recibieron lágrima artificial sin conservantes como tratamiento. En este contexto, cabe destacar que la rápida disminución en el tamaño de los defectos epiteliales se asocia generalmente con reducciones en el riesgo de infección, así como en el dolor y el malestar del paciente. Además, existen algunos estudios realizados en otros campos de la medicina que demuestran como el PRGF ha reducido la inflamación y el dolor en los pacientes tratados (Mozzati *et al.*, 2010; Wang-Saegusa *et al.*, 2011). Por el contrario, los defectos epiteliales tratados con PRP mostraron un tamaño mayor en todos los tiempos analizados cuando los comparamos con el AS o el s-PRGF, presentando diferencias estadísticamente significativas en muchos de los tiempos estudiados. Como han constatado otros autores, la prolongación de episodios de desepitelización corneal puede llevar a un aumento de la producción de colagenasas en el estroma corneal, y esto a su vez a una perforación corneal, con la destrucción tisular que ello supone (Márquez de Aracena, 2007).

Según lo expuesto, existe una gran heterogeneidad de productos con diferentes contenidos bioquímicos, como consecuencia de los distintos métodos de producción utilizados en su elaboración, y que podrían tener unas indicaciones clínicas distintas. Sin embargo, apenas existen ensayos clínicos controlados que evalúen de forma adecuada la seguridad y eficacia de estos productos (Foster *et al.*, 2009). Por lo tanto, queda por consensuar aspectos importantes como el modo idóneo de preparación del hemoderivado (Dhurat & Sukesh, 2014), la concentración óptima de factores de crecimiento en el producto final, la dosificación del mismo, o la influencia del estado de salud del sujeto en la actividad del preparado final. En este contexto, los estudios *in vivo* que hemos realizado en nuestro grupo proporcionan datos muy relevantes sobre el efecto de los hemoderivados en la cicatrización de heridas corneales. Así, al utilizar los hemoderivados de forma autóloga, obtenemos datos sobre la eficacia del hemoderivado. Esto no es posible cuando se utiliza un hemoderivado humano en ojos de animales, ya que, al tratarse de dos especies diferentes, nos proporcionaría datos sobre la seguridad del producto, pero no sobre su eficacia. Además, son ensayos controlados, por lo que se compara al mismo tiempo el efecto del hemoderivado con el de un tratamiento control.

En lo que respecta a la concentración y a la frecuencia de administración de los derivados de sangre, varios estudios han defendido la eficacia de las concentraciones diluidas de derivados sanguíneos en la cicatrización epitelial tras un daño mecánico corneal (Akyol-Salman, 2006; Tanidir *et al.*, 2010) y tras quemaduras alcalinas corneales (Salman & Gündoğdu, 2010), mientras en otros estudios no se han observado efectos significativos cuando se utiliza el hemoderivado diluido al 20% (Shahriari *et al.*, 2008; Etxebarria *et al.*, 2016). En el caso del estudio llevado a cabo por Akyol y sus colaboradores, el tratamiento con hemoderivado, bien al 100% (sin diluir) o bien al 20%, aceleraba significativamente el proceso de curación del defecto epitelial al compararlo con un tratamiento con lágrima artificial sin conservantes. Sin embargo, el cierre del defecto epitelial se producía más rápido cuando se trataban los ojos con el hemoderivado al 100% que cuando estaba diluido al 20% (Akyol-Salman, 2006). En los ensayos *in vivo* realizados en el presente trabajo también usamos los hemoderivados sin diluir, y aplicándolos cuatro veces al día debido a los resultados obtenidos por nuestro grupo en un experimento previo en conejos, en el cual la concentración más eficaz del hemoderivado fue la del 100% (Etxebarria *et al.*, 2016).

Cuando comenzaron a utilizarse los hemoderivados en clínica como tratamientos en patologías de la superficie ocular se prefería el uso de diluciones entre el 20 y el 50%, frente a concentraciones al 100% que podrían ser mal toleradas (Geerling *et al.*, 2004). De hecho, algunos oftalmólogos optaban por utilizar el hemoderivado al 20% para aproximarse más a las concentraciones en lágrima de determinados factores de crecimiento, como el TGF- $\beta$ ,



con el fin de prevenir problemas con la proliferación de las células epiteliales (Soni & Jeng, 2016). Sin embargo, hoy en día, en la práctica habitual la tendencia es a prescribir los hemoderivados al 100%, sin diluir. En un estudio realizado por nuestro grupo entre el año 2008 y 2015 en pacientes con defectos epiteliales persistentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas concentraciones de s-PRGF analizadas (20%, 50% y 100%) en cuanto a sus efectos terapéuticos o efectos adversos (López-Plandolit, 2015). En dicho estudio, muchas de las patologías oculares eran de origen neurotrófico. La invasión corneal dañada en los pacientes podría explicar el hecho de que bajas concentraciones de los hemoderivados produzcan efectos significativos respecto al control. En nuestros ensayos *in vivo*, los conejos tenían ojos sanos y una sensibilidad corneal intacta, lo que podría explicar la necesidad de usar dosis del 100% para observar diferencias estadísticamente significativas.

Por último, sabiendo que un epitelio sano es esencial para un balance correcto entre las interacciones del epitelio y del estroma, y también para la calidad de la propia visión (Chen *et al.*, 2012), realizamos un análisis histológico de las córneas de conejo tras la reepitelización total de todas las heridas. Los resultados no mostraron diferencias histológicas entre los epitelios corneales de los cuatro grupos de estudio, observándose en todos los casos un epitelio normal, y que mantiene la integridad y la estructura. Lo que si observamos es una hiperplasia epitelial con una o dos capas más de células en las áreas reepitelizadas de todas las córneas operadas, cuando las comparamos con la córnea de un ojo sano de conejo en el que no ha habido desepitelización. Esta hiperplasia epitelial la observamos en todas las córneas independientemente del tratamiento que ha sido empleado. Del mismo modo, otros autores también han observado esta hiperplasia epitelial en todos los conejos en los que habían inducido una desepitelización mecánica (Salman & Gündoğdu, 2010), por lo que creemos que ésta puede ser una respuesta transitoria al daño corneal. Así, con el paso del tiempo se esperaría observar un epitelio sin hiperplasia, lo cual nos indica que la regeneración completa del epitelio se produce tras un largo periodo de tiempo.

En conclusión, el conjunto de nuestros resultados (Freire *et al.*, 2012; Freire *et al.*, 2014), en consonancia con los de otros autores (Everts *et al.*, 2006; Anitua *et al.*, 2009), apoyan la idea de que el proceso de fabricación de los derivados hemáticos conduce a variaciones en las concentraciones de distintas moléculas bioactivas y, por lo tanto, influye fuertemente en la eficacia de estos preparados en la curación de las heridas corneales. Los tres hemoderivados estudiados (AS, PRP, y s-PRGF), en mayor o menor medida, favorecen la reepitelización corneal. El s-PRGF junto con el AS, presenta una mayor capacidad proliferativa *in vitro* que el PRP, y además, no muestra una tendencia a reducir la viabilidad

celular en las primeras 24 horas, como lo hacen el AS y el PRP. Este hecho hace del s-PRGF un buen candidato para favorecer la proliferación de las células epiteliales con una mejor tolerancia desde el inicio del tratamiento.

Al igual que en el caso de la proliferación celular, el s-PRGF y el AS, promueven la reepitelización *in vitro* de heridas más rápidamente que el PRP. Sin embargo, en la cicatrización corneal *in vivo*, el s-PRGF favorece que el cierre de las heridas se produzca en menor tiempo que con los otros dos hemoderivados. Este hecho es crucial para disminuir el riesgo de infección, y proporcionar un aumento en el confort del paciente en los primeros días tras producirse la herida corneal.

La diferencia en los niveles de algunos factores de crecimiento en los preparados, como el EGF y el VEGF, podría ser una de las razones que expliquen que el s-PRGF sobresalga sobre el PRP, y en menor medida sobre el AS, respecto a la promoción de la proliferación y migración *in vitro*. Ya que, los niveles de PDGF, fibronectina y la expresión de Cx43, implicados en procesos de proliferación y migración, son similares en los tres preparados. Sin embargo, la implicación de otras moléculas e interacciones moleculares más complejas deben de ocurrir *in vivo*, haciendo que el s-PRGF destaque frente a los otros dos preparados como promotor de la cicatrización corneal.

Los análisis microscópicos de los cultivos tratados de forma prolongada con s-PRGF muestran una morfología heterogénea, frente a aquellos con AS y PRP. Así, presentan una población epitelial con fenotipo indiferenciado que podría funcionar como fuente de renovación del epitelio, y que coexiste con otra población con aspecto diferenciado. A nivel molecular, la expresión de moléculas implicadas en la comunicación y diferenciación celular corroboran la existencia de estas dos poblaciones en los cultivos con s-PRGF, ya que es en éstos en los que hay mayor expresión de moléculas propias de células epiteliales maduras (involucrina), como de moléculas propias de células menos diferenciadas, implicadas en la unión de las células epiteliales basales a la matriz extracelular (integrina- $\alpha 6$ ). Además, es en los cultivos con s-PRGF donde se da una mayor expresión de dos de las tres conexinas estudiadas, implicadas en la comunicación y diferenciación celular, en comparación con los cultivos tratados con los otros dos hemoderivados. Así, la expresión génica de los cultivos tratados con s-PRGF representa a las tres poblaciones del epitelio corneal: células proliferativas de la capa basal, células aladas con muchas uniones comunicantes y células superficiales totalmente diferenciadas siendo ésta la expresión propia de las células de un epitelio, correctamente organizado y diferenciado.

La medicina regenerativa en general y los hemoderivados en particular han supuesto una revolución para la salud, permitiendo abordar algunas patologías desde un punto de vista más personalizado. Así, la relevancia clínica de esta tesis reside en proporcionar una base científica a la utilización de un nuevo derivado hemático, el s-PRGF. Éste se postula como un tratamiento alternativo y prometedor para los trastornos de la superficie ocular, tanto o más eficaz que el AS, considerado hasta la fecha el *gold standar* en oftalmología. Nuestros resultados corroboran que, gracias a su actividad biológica, promueve una rápida reepitelización del epitelio corneal, pudiendo reducir la inflamación, el dolor, y la posibilidad de infección de la herida. En la práctica clínica habitual los preparados derivados de plaquetas se están usando en ausencia de ensayos clínicos robustos y controlados, los cuales servirían para establecer unos protocolos clínicos precisos para la producción de los mismos (Marques *et al.*, 2015). Nuestros resultados proporcionan datos consistentes y favorables como para justificar la ejecución de ensayos clínicos controlados con s-PRGF.

**Conclusiones**



## CONCLUSIONES

1. El método elegido para el procesamiento de la sangre en la elaboración de los derivados hemáticos influye notablemente en la concentración final de determinados factores de crecimiento. Además, utilizando un mismo método de obtención, se observa una gran variabilidad interindividual en las concentraciones de dichos factores de crecimiento.
2. Los hemoderivados s-PRGF y AS promueven un ritmo de proliferación celular superior al del PRP. Sin embargo, el s-PRGF presenta una mayor tolerabilidad *in vitro* durante las primeras 24 horas que los otros dos hemoderivados.
3. El s-PRGF induce una mayor expresión tanto de moléculas propias de células epiteliales diferenciadas como de células epiteliales indiferenciadas. Coherentemente, estos dos fenotipos celulares confluyen en la formación de colonias heterogéneas en los cultivos tratados con s-PRGF, mientras que aquellos tratados con AS y PRP se organizan en colonias homogéneas.
4. Los derivados hemáticos, s-PRGF y AS, promueven la reepitelización *in vitro* más rápidamente que el PRP.
5. Los tres hemoderivados estudiados (AS, PRP, y s-PRGF) favorecen, en mayor o menor medida, la reepitelización corneal en el modelo animal de conejo tras un defecto epitelial corneal inducido. Sin embargo, el s-PRGF promueve la reepitelización de las heridas corneales a mayor velocidad, y resuelve mayor número de casos para un mismo tiempo, pudiendo, de este modo, disminuir el riesgo de infección, y aumentar el confort y beneficio del paciente.

Las propiedades terapéuticas de los derivados hemáticos se basan en su capacidad para estimular la reparación y regeneración de diferentes tejidos, gracias a los factores de crecimiento y proteínas bioactivas presentes en ellos. Los tres hemoderivados estudiados (AS, PRP, y s-PRGF) favorecen la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales corneales y reducen el tiempo de cierre del defecto epitelial corneal. Por ello, pueden considerarse promotores de la reepitelización corneal tras un defecto epitelial. En concreto, el s-PRGF ha demostrado ser un nuevo tratamiento alternativo particularmente prometedor, a la altura del *gold standar* AS, y en ciertos aspectos superior, para su aplicación clínica en la reparación y regeneración del epitelio corneal.









# Bibliografía



- Akyol-Salman I.** Effects of autologous serum eye drops on corneal wound healing after superficial keratectomy in rabbits. *Cornea*. 2006; 25: 1178-81.
- Albert DM,** Edwards DD. The history of ophthalmology. Cambridge: Blackwell Science; 1996.
- Alio JL,** Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res*. 2007; 39: 124-9 (a).
- 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: 1286-93 (b).
- Alio JL,** Arnalich-Montiel F, Rodriguez AE. The role of "eye platelet rich plasma" (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13: 1257-65.
- Andia I,** Maffulli N. Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013; 9: 721-30.
- Andollo N,** Boyano MD, Andrade R, Aréchaga JM. Epigenetic regulation of the imprinted U2af1-rs1 gene during retinoic acid-induced differentiation of embryonic stem cells. *Dev Growth Differ*. 2006; 48: 349-60.
- Andresen JL,** Ledet T, Ehlers N. Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr Eye Res*. 1997; 16: 605-13.
- 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: 529-35.
- Anitua E,** Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004; 91: 4-15.
- Anitua E,** Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*. 2006; 24: 227-34.
- Anitua E,** Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 2007; 28: 4551-60.
- Anitua E,** Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29: 37-41 (a).
- Anitua E,** Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, *et al.* Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008; 84: 415-21(b).
- Anitua A,** Sánchez M, Zaldueño MM, de la Fuente M, Prado R, Orive G, *et al.* Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif*. 2009; 42: 162–170.

- Anitua E**, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010; 62: 741-52.
- Anitua E**, Sánchez 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-beta1-Induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 6066-73.
- Anitua E**, Alonso R, Girbau C, Aguirre JJ, Muruzabal F, Orive G. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol.* 2012; 37: 652-7.
- Anitua E**, Sánchez M, Orive G, Padilla S. A biological therapy to osteoarthritis treatment using platelet-rich plasma. *Expert Opin Biol Ther.* 2013 Aug; 13: 1161-72.
- 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: 27-34.
- 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: e0121713.
- 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; 41: 875-82.
- Araki-Sasaki K**, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 614-21.
- Arffa RC**, Grayson B. *Enfermedades de la córnea.* 4a ed. Madrid: Harcourt Brace; 2006.
- Arntz A**, Durán JA. Anatomía funcional de la superficie ocular. En: Benítez del Castillo JM, Durán JA, Rodríguez MT. *Superficie ocular.* Madrid: Sociedad Española de Oftalmología; 2004. p. 1-12.
- Arroyo-Berdugo Y**, Alonso S, Ribas G, Ibarrola-Villava M, Peña-Chilet M, Martínez-Cadenas C, et al. Involvement of ANXA5 and ILKAP in Susceptibility to Malignant Melanoma. *PLoS One.* 2014; 9: e95522.
- Ban Y**, Dota A, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Tsuzuki M, et al. Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Exp Eye Res.* 2003; 76: 663-9.
- Barrandon Y**, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 2302-6.
- Barton K**, Nava A, Monroy DC, Pflugfelder SC. Cytokines and tear function in ocular surface disease. *Adv Exp Med Biol* 1998; 438: 461-9.

- Beca T**, Hernández G, Morante S, Bascones A. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol*. 2007; 19, 1: 39-52.
- Bell GI**, Fong NM, Stempien MM, Wormsted MA, Caput D, Ku LL, Urdea MS, *et al*. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acids Res*. 1986; 14: 8427-46.
- Bengoa A**. Atlas Urgencias en Oftalmología. Barcelona: Editorial Glosa; 2003.
- Bergsten E**, Uutela M, Li X, Pietras K, Ostman A, Heldin CH, *et al*. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor. *Nat Cell Biol*. 2001; 3: 512-6.
- Berman M**. The pathogenesis of corneal epithelial defects. *Acta Ophthalmol*. 1989; 192: 55-64.
- Bielecki T**, Dohan Ehrenfest DM, Everts PA, Wiczkowski A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13: 1153-62.
- Bisla K**, Tanelian DL. Concentration-dependent effects of lidocaine on corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992; 33: 3029-33.
- Blair P**, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*. 2009; 23: 177-89.
- Bonci P**, Bonci P, Lia A. Suspension made with amniotic membrane: clinical trial. *Eur J Ophthalmol*. 2005; 15: 441-5.
- Borrione P**, Gianfrancesco AD, Pereira MT, Pigozzi F. Platelet-rich plasma in muscle healing. *Am J Phys Med Rehabil*. 2010; 89: 854-61.
- Brissette JL**, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE, Dotto GP. Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91: 6453-7.
- Buck RC**. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1979; 18: 767-84.
- Burmeister SL**, Hartwig D, Limb GA, Kremling C, Hoerauf H, Müller M, *et al*. Effect of various platelet preparations on retinal muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50: 4881-6.
- Bustin SA**, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, *et al*. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009; 55: 611-22.
- Cai X**, Foster CS, Liu JJ, Kupferman AE, Filipec M, Colvin RB, Lee SJ. Alternatively spliced fibronectin molecules in the wounded cornea: analysis by PCR. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993; 34: 3585-92.

- Cao R**, Bråkenhielm E, Li X, Pietras K, Widenfalk J, Ostman A, *et al.* Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- $\alpha$  and - $\beta$  receptors. *FASEB J.* 2002; 16: 1575-83.
- Chen Z**, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells.* 2004; 22: 355-66.
- Chen RN**, Lee LW, Chen LC, Ho HO, Lui SC, Sheu MT, Su CH. Wound-healing effect of micronized sacchachitin (mSC) nanogel on corneal epithelium. *Int J Nanomedicine.* 2012; 7: 4697-706.
- Chin KY.** Connexins, a new target in wound treatment. *J Wound Care.* 2011; 20: 386-90. Review.
- Choi BH**, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34: 420-4.
- Cieslik-Bielecka A**, Gazdzik TS, Bielecki TM, Cieslik T. Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 303-5.
- Cintron C**, Hassinger LC, Kublin CL, Cannon DJ. Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J Ultrastruct Res.* 1978; 65: 13-22.
- De Donatis A**, Comito G, Buricchi F, Vinci MC, Parenti A, Caselli A, *et al.* Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J Biol Chem* 2008; 283: 19948-56.
- DeLong JM**, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy.* 2012; 28: 998-1009.
- Denk PO**, Knorr M. The in vitro effect of platelet-derived growth factor isoforms on the proliferation of bovine corneal stromal fibroblasts depends on cell density. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997; 235: 530-4.
- Deschaseaux F**, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med.* 2009; 15: 417-29.
- 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: 189-97.
- Dohan Ehrenfest DM**, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009; 27: 158-67.
- Dohan Ehrenfest DM**, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, *et al.* In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13: 1131-7.

- Dohan Ehrenfest DM**, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, 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: 3-9.
- Dong Y**, Roos M, Gruijters T, Donaldson P, Bullivant S, Beyer E, Kistler J. Differential expression of two gap junction proteins in corneal epithelium. *Eur J Cell Biol.* 1994; 64: 95-100.
- Dua HS**, Faraj LA, Said DG, Gray T, Lowe J. Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer). *Ophthalmology.* 2013; 120: 1778-85.
- Dugrillon A**, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 31: 615-9.
- Durán JA**. Complicaciones de las lentes de contacto. Madrid: Tecnimedia editorial; 1998.
- Eppley BL**, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004; 114: 1502-8.
- Eppley BL**, Pietrzak WS, Blanton M. Plateletrich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2006; 118: 147-59.
- Eraslan M**, Toker E. Mechanisms of corneal wound healing and its modulation following refractive surgery. *Marmara Medical Journal.* 2009; 22: 169-78.
- Etxebarria J**, Sanz-Lázaro S, Hernáez-Moya R, Freire V, Duran JA, Morales MC, Andollo N. Serum eye drops from plasma rich in growth factors (s-PRGF) regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol.* (en revisión). 2016.
- Everts PA**, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, Schönberger JP, Box HA, van Zundert A, *et al.* Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors.* 2006; 24: 165-71.
- Ezumi K**, Yamamoto H, Murata K, Higashiyama M, Damdinsuren B, Nakamura *et al.* Aberrant expression of connexin 26 is associated with lung metastasis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2008; 14: 677-84.
- Fernández-Delgado N**, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barrios M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* 2012; 28: 200-16.
- Fernández A**, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. *An Sist Sanit Navar.* 2008; 1: 53-69.



- Fine BS**, Yanoff M. Ocular Histology. 2a ed. Hagerstown: Harper and Row; 1979.
- Fini ME**, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 2005; 24 Supl 8: 2-11.
- Fischer KR**, Opitz A, Böeck M, Geerling G. Stability of serum eye drops after storage of 6 months. *Cornea*. 2012; 31: 1313-8.
- Foster TE**, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009; 37: 2259-72.
- Fox RI**, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum*. 1984; 27: 459-61.
- Freire V**, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales MC. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012; 53: 5571-8.
- Freire V**, Andollo N, Etxebarria J, Hernández-Moya R, Durán JA, Morales MC. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea*. 2014; 33: 614-20.
- Fromaget C**. Traitement rationnel des keratitis lacry-males. *Ann d'Ocul*. 1923; 160: 590-1.
- Fujikawa LS**, Foster CS, Harrist TJ, Lanigan JM, Colvin RB. Fibronectin in healing rabbit corneal wounds. *Lab Invest*. 1981; 45: 120-9.
- Fukuda M**, Fullard RJ, Willcox MD, Baleriola-Lucas C, Bestawros F, Sweeney D, *et al*. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996; 37: 459-67.
- Furie BC**, Furie B. Tissue factor pathway vs. collagen pathway for in vivo platelet activation. *Blood Cells Mol Dis*. 2006; 36: 135-8.
- Gay LJ**, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11: 123-34.
- Geerling G**, Sieg P, Meyer C, Bastian GO, Laqua H. Transplantation of autologous submandibular glands in very severe keratoconjunctivitis sicca. 2 year outcome. *Ophthalmologe*. 1998; 95: 257-65.
- Geerling G**, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 948-56.
- Geerling G**, Maclennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 1467-74.
- Gehring S**, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H. Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion*. 1999; 39: 144-8.
- Geremicca W**, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus*. 2010; 8: 107-12.

- Gipson IK.** Adhesive mechanisms of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol.* 1992; 70 Supl 202: 13-17.
- Gipson IK,** Spurr-Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Stepp MA. Redistribution of the hemidesmosome components alpha 6 beta 4 integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp Cell Res.* 1993; 207: 86-98.
- Gobbels M,** Spitznas M. Corneal epithelial permeability of dry eyes before and after treatment with artificial tears. *Ophthalmology* 1992; 99: 873-8.
- Gordon JF,** Johnson P, Musch DC. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. Chiron Vision Fibronectin Study Group. *Am J Ophthalmol.* 1995; 119: 281-7.
- Goto E,** Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea.* 2001; 20: 807-10.
- Grawitz PB.** Orienting experiments on the chemistry of inflammatory factors ("decomposition factor") in lacrimal fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1960; 162: 447-54.
- Guzman-Aranguéz A,** Argüeso P. Structure and biological roles of mucin-type O-glycans at the ocular surface. *Ocul Surf.* 2010; 8: 8-17.
- Hanna KD,** Pouliquen Y, Waring Go, Savoldelli M, Cotter J, Morton K, *et al.* Corneal stromal wound healing in rabbits after 193-nm excimer laser surface ablation. *Arch Ophthalmol.* 1989; 107: 895-901.
- Harloff S,** Hartwig D, Kasper K, Wedel T, Müller M, Geerling G. Epitheliotrophic capacity of serum eye drops from healthy donors versus serum from immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2008; 225: 200-6.
- 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; 44: 1724-31.
- Hartwig D,** Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L, *et al.* 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: 107-13.
- Heidaran MA,** Pierce JH, Yu JC, Lombardi D, Artrip JE, Fleming TP, *et al.* Role of alpha beta receptor heterodimer formation in beta platelet-derived growth factor (PDGF) receptor activation by PDGF-AB. *J Biol Chem.* 1991; 266: 20232-7.
- Heinmöller E,** Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, *et al.* Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1996; 122: 735-44.

- Hernández Galindo EE**, Theiss C, Steuhl KP, Meller D. Gap junctional communication in microinjected human limbal and peripheral corneal epithelial cells cultured on intact amniotic membrane. *Exp Eye Res.* 2003; 76: 303-14.
- Herrero-Vanrell R**, Molina-Martínez I. Autologous serum in the treatment of dry eye syndrome. Technological aspects. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2008; 83: 521-3.
- Hipócrates de Cos.** (siglo IV a.C.). Prorreticón (Predicciones II). Predicción 30. *Tratados Hipocráticos.* Madrid: Editorial Gredos; 1986.
- Hirakata A**, Gupta AG, Proia AD. Effect of protein kinase C inhibitors and activators on corneal re-epithelialization in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34: 216-21.
- Hirata Y**, Uchihashi M, Nakajima H, Fujita T, Matsukura S. Presence of human epidermal growth factor in human cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1982; 55: 1174-7.
- Ho PC**, Davis WH, Elliott JH, Cohen S. Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol.* 1974; 13: 804-9.
- Huang AJ**, Tseng SC. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32: 96-105.
- Humphries MJ.** Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 2000; 28: 311-39.
- Hynes RO.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002; 110: 673-87.
- Hwang J**, Chung SH, Jeon S, Kwok SK, Park SH, Kim MS. Comparison of clinical efficacies of autologous serum eye drops in patients with primary and secondary Sjögren syndrome. *Cornea.* 2014; 33: 663-7.
- Imanishi J**, Kamiyama K, Iguchi I, Kita M, Sotozono C, Kinoshita S. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res.* 2000; 19: 113-29.
- Jangi SM**, Ruiz-Larrea MB, Nicolau-Galmés F, Andollo N, Arroyo-Berdugo Y, Ortega-Martínez I, Díaz-Pérez JL, Boyano MD. Terfenadine-induced apoptosis in human melanoma cells is mediated through Ca<sup>2+</sup> homeostasis modulation and tyrosine kinase activity, independently of H1 histamine receptors. *Carcinogenesis.* 2008; 29: 500-9.
- Jester JV**, Barry-Lane PA, Petroll WM, Olsen DR, Cavanagh HD. Inhibition of corneal fibrosis by topical application of blocking antibodies to TGF beta in the rabbit. *Cornea.* 1997; 16: 177-87.
- Jester JV**, Huang J, Barry-Lane PA, Kao WW, Petroll WM, Cavanagh HD. Transforming growth factor(beta)-mediated corneal myofibroblast differentiation requires actin and fibronectin assembly. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 1959-67.
- Jones SM**, Kazlauskas A. Connecting signaling and cell cycle progression in growth factor-stimulated cells. *Oncogene.* 2000; 19: 5558-67.

- Kandarakis AS**, Page C, Kaufman HE. The effect of epidermal growth factor on epithelial healing after penetrating keratoplasty in human eyes. *Am J Ophthalmol.* 1984; 98: 411-5.
- Kawakita T**, Higa K, Shimmura S, Tomita M, Tsubota K, Shimazaki J. Fate of corneal epithelial cells separated from limbus in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52: 8132-7.
- Kazakos K**, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury.* 2009; 40: 801-5.
- Kim KM**, Shin YT, Kim HK. Effect of autologous platelet-rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Jpn J Ophthalmol.* 2012; 56: 544-50.
- Kimura K**, Teranishi S, Nishida T. Establishment of human corneal epithelial cells stably expressing human connexin43. *Exp Eye Res.* 2010; 90: 4-9.
- Kisucka J**, Butterfield CE, Duda DG, Eichenberger SC, Saffaripour S, Ware J, *et al.* Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 855-60.
- Kitazawa T**, Kinoshita S, Fujita K, Araki K, Watanabe H, Ohashi Y, *et al.* The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1990; 31: 1773-8.
- Klenkler B**, Sheardown H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res.* 2004; 79: 677-88.
- Klenkler B**, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: Role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Ocul Surf.* 2007; 5: 228-39.
- Klinger MH**. The storage lesion of platelets: ultrastructural and functional aspects. *Ann Hematol.* 1996; 73: 103-12.
- Klinger MH**, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2002; 22: 913-22.
- Knighton DR**, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 1986; 204: 322-30.
- Kolli S**, Lako M, Figueiredo F, Ahmad S. Corneal epithelial stem cells and their therapeutic application. In: Baharvand H editor. *Trends in stem cell Biology and Technology.* New York: Humana Press; 2009. p. 319-65.
- Kon E**, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, *et al.* Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18: 472-9.
- Krachmer JH**, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals, diagnosis and management.* 1 vol. 3a ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2010.
- Kruse FE**, Rohrschneider K, Völcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology.* 1999; 106: 1504-10.

- Lambiase A**, Rama P, Bonini S, Caprioglio G, Aloe L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1174-80.
- Laux-Fenton WT**, Donaldson PJ, Kistler J, Green CR. Connexin expression patterns in the rat cornea: molecular evidence for communication compartments. *Cornea.* 2003; 22: 457-64.
- Lawson JH**. The clinical use and immunologic impact of thrombin in surgery. *Semin Thromb Hemost.* 2006; 32 Supl 1: 98-110.
- 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; 30: 101-7.
- Li DQ**, Tseng SC. Differential regulation of keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor by different cytokines in human corneal and limbal fibroblasts. *J Cell Physiol.* 1997; 172: 361-72.
- Li Q**, Weng J, Mohan RR, Bennett GL, Schwall R, Wang ZF, *et al.* Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37: 727-39.
- Liang CC**, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007; 2: 329-33.
- Liu L**, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K, *et al.* Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 2438-44.
- Livak KJ**, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.
- López-García JS**, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2007; 82: 9-20.
- López-García JS**, Rivas L, García-Lozano I, Elosua I, Sánchez-Carnerero F. Diferencias entre suero autólogo y derivados plaquetarios. En: López-García JS, Murube del Castillo J, García-Lozano I, Rivas L. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Madrid: Sociedad Española de oftalmología; 2011. p. 189-97.
- 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: e22-9.
- López-Plandolit S**, Morales MC, Freire V, Etxebarria J, Durán JA. Plasma Rich in Growth Factors as a Therapeutic Agent for Persistent Corneal Epithelial Defects. *Cornea.* 2010; 29: 843-8.
- López-Plandolit S**, Morales MC, Freire V, Grau AE, Durán JA. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea.* 2011; 30: 1312-7.

- López-Plandolit S.** El plasma rico en factores de crecimiento como alternativa terapéutica en el ojo seco y en defectos epiteliales persistentes [tesis doctoral]. Bilbao: Universidad del País Vasco, Facultad de Medicina; 2015.
- Marques LF,** Stessuk T, Camargo IC, Sabeh Junior N, dos Santos L, Ribeiro-Paes JT. Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications. *Platelets*. 2015; 26: 101-13.
- Márquez de Aracena R,** Montero de Espinosa I, Muñoz M, Pereira G, Martín F. Tratamiento con concentrado plaquetario plasmático subconjuntival y tópico en el trasplante de limbo. *Mapfre Medicina*. 2006; 17: 280-5.
- Márquez de Aracena R,** Montero de Espinosa I, Muñoz M, Pereira G. Subconjunctival application of plasma platelet concentrate in the treatment of ocular burns. Preliminary results. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2007; 82: 475-81.
- Marx RE,** Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1998; 85: 638-46.
- Marx RE.** Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001;10: 225-8.
- Marx RE.** Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62: 489-96.
- Matic M,** Petrov IN, Rosenfeld T, Wolosin JM. Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997; 38: 600-9.
- Matras H.** Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. *Osterr Z Stomatol*. 1970; 67: 338-59.
- Matsumoto Y,** Dogru M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology*. 2004; 111: 1115-20.
- May AE,** Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28: 5-10.
- McGill JI,** Liakos GM, Goulding N, Seal DV. Normal tear protein profiles and age-related changes. *Br J Ophthalmol*. 1984; 68: 316-20.
- McMenamin PG,** Steele C, McGhee CNJ. Cornea: anatomy, physiology and healing. In: McGhee CNJ, Taylor HR, Gartry DS, Trokel SL, editors. *Excimer lasers in Ophthalmology: Principles and Practice*. London: Martin Dunitz; 1997. p. 41-63.
- Micallef L,** Belaubre F, Pinon A, Jayat-Vignoles C, Delage C, Charveron M, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2009; 18: 143-51.
- Mishima S,** Gasset A, Klyce SD Jr, Baum JL. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol*. 1966; 5: 264-76.

- Mishra A**, Harmon K, Woodall J, Vieira A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012; 13: 1185-95.
- Molina-Miñano F**, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Vicente-Ortega V. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int Wound J.* 2009; 6: 145-8.
- Molloy T**, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003; 33: 381-94.
- Monteiro MC**, O'Connor JE, Martínez M. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: Aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Diagn Biol.* 2001; 50: 111-36.
- Moojen DJ**, Everts PA, Schure RM, Overdeest EP, van Zundert A, Knape JT, *et al.* Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008; 26: 404-10.
- Movahedan A**, Majdi M, Afsharkhamseh N, *et al.* Notch inhibition during corneal epithelial wound healing promotes migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53: 7476-83.
- Mozzati M**, Martinasso G, Pol R, Polastri C, Cristiano A, Muzio G, Canuto R. The impact of plasma rich in growth factors on clinical and biological factors involved in healing processes after third molar extraction. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 95: 741-6.
- Müller LJ**, Vrensen GF, Pels L, Cardozo BN, Willekens B. Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 985-94.
- Müller LJ**, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res.* 2003; 76: 521-42.
- Mullis K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986; 51: 263-73.
- Murali S**, Hardten DR, DeMartelaere S, Olevsky OM, Mindrup EA, Hecht ML, *et al.* Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Curr Eye Res.* 1994; 13: 857-62.
- Nakamura M**, Hikida M, Nakano T. Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Curr Eye Res.* 1992; 11: 981-6.
- Nakamura M**, Nishida T, Ofuji K, Reid TW, Mannis MJ, Murphy CJ. Synergistic effect of substance P with epidermal growth factor on epithelial migration in rabbit cornea. *Exp Eye Res.* 1997; 65: 321-9.
- Nakamura Y**, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res.* 1998; 17: 673-6.

- Nakano Y**, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T. Connexin43 knockdown accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49: 93-104.
- Nishida T**, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol.* 1983; 101: 1046-8.
- Nishida T**, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J Cell Physiol.* 1990; 145: 549-54.
- Nishida T**, Nakamura M, Mishima H, Otori T. Hyaluronan stimulates corneal epithelial migration. *Exp Eye Res.* 1991; 53: 753-8.
- Nishida T**, Nakamura M, Murakami J, Mishima H, Otori T. Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 2464-9.
- Nishida T**, Nakamura M, Ofuji K et al. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol.* 1996; 169: 159-66.
- Nishida T**. The cornea: stasis and dynamics. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 2008; 112: 179-212.
- Nishida T**. Translational research in corneal epithelial wound healing. *Eye Contact Lens.* 2010; 36: 300-4.
- Noecker R**. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther.* 2001; 18: 205-15.
- Nurden AT**, Nurden P, Sánchez M, Andia I, Anitua E. Platelets and wound healing. *Front Biosci.* 2008; 13: 3532-48.
- Ohashi Y**, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, *et al.* Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1989; 30: 1879-82.
- Pallua N**, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns.* 2010; 36: 4-8.
- Panda A**, Pushker N, Bageshwar LM. Lateral tarsorrhaphy: is it preferable to patching? *Cornea.* 1999; 18: 299-301.
- Paques M**, Chastang C, Mathis A, Sahel J, Massin P, Dosquet C, *et al.* Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group. *Ophthalmology.* 1999; 106: 932-8.
- Pastor JC**, Calonge M. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea.* 1992; 11: 311-4.
- Pfaffl MW**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.



- Pflugfelder SC**, Solomon A, Dursun D, Li DQ. Dry eye and delayed tear clearance: "a call to arms". *Adv Exp Med Biol.* 2002; 506: 739-43.
- Phan TM**, Foster CS, Shaw CD, Zagachin LM, Colvin RB. Topical fibronectin in an alkali burn model of corneal ulceration in rabbits. *Arch Ophthalmol.* 1991; 109: 414-9.
- Piccin A**, Di Pierro AM, Canzian L, Primerano M, Corvetta D, Negri G, *et al.* Platelet gel: a new therapeutic tool with great potential. *Blood Transfus.* 2016; 25: 1-8.
- 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: 1188-97.
- Ratkay-Traub I**, Hopp B, Bor Z, Dux L, Becker DL, Krenacs T. Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp Eye Res.* 2001; 73: 291-302.
- Reed GL**, Fitzgerald ML, Polgár J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood.* 2000; 96: 3334-42.
- Riestra AC**, Alonso-Herreros JM, Merayo-Llodes J. Platelet rich plasma in ocular surface. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2016; 6. pii: S0365-6691(16)00128-3.
- Rodeck U**, Jost M, Kari C, Shih DT, Lavker RM, Ewert DL, *et al.* EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci.* 1997; 110: 113-21.
- Rolando M**, Zierhut M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45 Supl 2: 203-10.
- Rosenthal P**, Cotter JM, Baum J. Treatment of persistent corneal epithelial defect with extended wear of a fluid-ventilated gas-permeable scleral contact lens. *Am J Ophthalmol.* 2000; 130: 33-41.
- Ross M**, Pawlina W. *Histología: Texto y atlas. Color con biología celular y molecular.* 6a ed. Madrid: Editorial médica panamericana. 2013.
- Rózsa AJ**, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain.* 1982; 14: 105-20.
- Sabatini DD**, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J Cell Biol.* 1963; 17: 19-58.
- Saghizadeh M**, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ, *et al.* Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res.* 2001; 73: 179-89.
- Saiki RK**, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988; 239: 487-91.

- Salman IA**, Gündoğdu C. Epithelial healing in experimental corneal alkali wounds with nondiluted autologous serum eye drops. *Cutan Ocul Toxicol*. 2010; 29: 116-21.
- Sánchez M**, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, *et al*. Plasma richin growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003; 35: 1648-52.
- Sánchez M**, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007; 35: 245-51.
- Sánchez M**, Fiz N, Azofra J, Usabiaga J, Aduriz Recalde E, Garcia Gutierrez A, *et al*. A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthroscopy*. 2012; 28: 1070-8.
- Sánchez M**, Yoshioka T, Ortega M, Delgado D, Anitua E. Ultrasound-guided platelet-rich plasma injections for the treatment of common peroneal nerve palsy associated with multiple ligament injuries of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2014; 22: 1084-9.
- Schechter J**, Wallace M, Carey J, Chang N, Trousdale M, Wood R. Corneal insult affects the production and distribution of FGF-2 within the lacrimal gland. *Exp Eye Res*. 2000; 70: 777-84.
- Schermer A**, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol*. 1986; 103: 49-62.
- Schlötzer-Schrehardt U**, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*. 2005; 81: 247-64.
- Schnabel LV**, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, *et al*. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res*. 2007; 25: 230-40.
- Scott RA**, Lauweryns B, Snead DM, Haynes RJ, Mahida Y, Dua HS. E-cadherin distribution and epithelial basement membrane characteristics of the normal human conjunctiva and cornea. *Eye*. 1997; 11: 607-12.
- Seijas R**, Ares O, Catala J, Alvarez-Diaz P, Cusco X, Cugat R. Magnetic resonance imaging evaluation of patellar tendon graft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction with or without platelet-rich plasma. *J Orthop Surg*. 2013; 21: 10-4.
- Seitz B**, Grüterich M, Cursiefen C, Kruse FE. Conservative and surgical treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmologe*. 2005; 102: 15-26.

- Shahriari HA**, Tokhmehchi F, Reza M, Hashemi NF. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea*. 2008; 27: 1148-50.
- Shen EP**, Hu FR, Lo SC, Chen YM, Sun YC, Lin CT, *et al*. Comparison of corneal epitheliotrophic capacity among different human blood-derived preparations. *Cornea*. 2011; 30: 208-14.
- Shurman DL**, Glazewski L, Gumpert A, Zieske JD, Richard G. In vivo and in vitro expression of connexins in the human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46: 1957-65.
- Slater M**, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res*. 1995; 13: 655-63.
- Soni NG**, Jeng BH. Blood-derived topical therapy for ocular surface diseases. *Br J Ophthalmol*. 2016; 100: 22-7.
- Soong HK**, Hassan T, Varani J, Huang SC, Brennan M. Fibronectin does not enhance epidermal growth factor-mediated acceleration of corneal epithelial wound closure. *Arch Ophthalmol*. 1989; 107: 1052-4.
- Spínola C**, Caro M. Hemoderivados como tratamiento de enfermedades mucosinequiantes. En: Montero J. Tratamiento actual de las queratoconjuntivitis mucosinequiantes. Madrid: Sociedad Española de oftalmología; 2015. p.129-35.
- Steed DL**. Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity ulcers. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117 Supl 7: 143-9.
- Stepp MA**, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993; 34: 1829-44.
- Stenwall PA**, Bergström M, Seiron P, Sellberg F, Olsson T, Knutson F, *et al*. Improving the anti-inflammatory effect of serum eye drops using allogeneic serum permissive for regulatory T cell induction. *Acta Ophthalmol*. 2015; 93: 654-7.
- Stramer BM**, Zieske JD, Jung JC, Austin JS, Fini ME. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44: 4237-46.
- Suzuki K**, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000; 41: 2495-500.
- 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: 664-9.
- Tervo T**, Tervo K, van Setten GB, Virtanen I, Tarkkanen A. Plasminogen activator and its inhibitor in the experimental corneal wound. *Exp Eye Res*. 1989; 48: 445-9.

- Tervo T**, Vesaluoma M, Bennett GL, Schwall R, Helena M, Liang Q, *et al*. Tear hepatocyte growth factor (HGF) availability increases markedly after excimer laser surface ablation. *Exp Eye Res*. 1997; 64: 501-4.
- Thomas KA**, Rios-Candelore M, Fitzpatrick S. Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984; 81: 357-61.
- Tischler M**. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J*. 2002; 68: 22-4.
- Trindade-Suedam IK**, Leite FR, de Moraes JA, Leite ER, Marcantonio EJ, Leite AA. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *J Oral Implantol*. 2007; 33: 334-9.
- Tripathi BJ**, Kwait PS, Tripathi RC. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea*. 1990; 9: 2-9.
- Trowell OA**, Willmer EN. Studies on the Growth of Tissues in vitro. *Journal of Experimental Biology*. 1939; 16: 60-70.
- Tseng SC**. Concept and application of limbal stem cells. *Eye*. 1989; 3: 141-57.
- Tseng SC**, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*. 1997; 124: 825-35.
- Tsubota K**, Satake Y, Shimazaki J. Treatment of severe dry eye. *Lancet*. 1996; 348: 123.
- Tsubota K**, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, *et al*. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83: 390-5 (a).
- Tsubota K**, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology*. 1999; 106: 1984-9 (b).
- Vajpayee RB**, Mukerji N, Tandon R, Sharma N, Pandey RM, Biswas NR, *et al*. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol*. 2003; 87: 1312-6.
- van Setten GB**, Viinikka L, Tervo T, Pesonen K, Tarkkanen A, Perheentupa J. Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1989; 227: 184-7.
- Vandesompele J**, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al*. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002; 3: research0034.1–research0034.11.
- Vaquerizo V**, Plasencia MÁ, Arribas I, Seijas R, Padilla S, Orive G, *et al*. Comparison of intra-articular injections of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus Durolane hyaluronic acid in the treatment of patients with symptomatic osteoarthritis: a randomized controlled trial. *Arthroscopy*. 2013; 29: 1635-43.

- Versura P**, Profazio V, Campos EC. Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic tests for dry eye diseases. *Curr Eye Res.* 2010; 35: 553-64.
- Vesaluoma M**, Teppo AM, Grönhagen-Riska C, Tervo T. Release of TGF-beta 1 and VEGF in tears following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res.* 1997; 16: 19-25.
- Wang C**, Mody M, Herst R, Sher G, Freedman J. Flow cytometric analysis of platelet function in stored platelet concentrates. *Transfus Sci.* 1999; 20: 129-39.
- Wang-Saegusa A**, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cuscó X, Garcia-Balletbó M. Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2011; 131: 311-7.
- Weibrich G**, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg.* 2002; 30: 97-102.
- Weibrich G**, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone.* 2004; 34: 665-71.
- Weibrich G**, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005; 20: 118-23.
- Weiss L.** *Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology.* 6a ed. Baltimore: Urban & Schwarzenberg; 1988.
- Whitman DH**, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 55: 1294-9.
- Wilson SE**, Lloyd SA, Kennedy RH. Basic fibroblast growth factor (FGFb) and epidermal growth factor (EGF) receptor messenger RNA production in human lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32: 2816-20 (a).
- Wilson SE**, Lloyd SA, Kennedy RH. Epidermal growth factor messenger RNA production in human lacrimal gland. *Cornea.* 1991; 10: 519-24 (b).
- Wilson SE**, He YG, Lloyd SA. EGF, EGF receptor, basic FGF, TGF beta-1, and IL-1 alpha mRNA in human corneal epithelial cells and stromal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 1756-65 (a).
- Wilson SE**, Lloyd SA, He YG. EGF, basic FGF, and TGF beta-1 messenger RNA production in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992; 33: 1987-95 (b).
- Wilson SE**, Walker JW, Chwang EL, He YG. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34: 2544-61.
- Wilson SE**, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40: 2185-90.

- Wilson SE**, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 2001; 20: 625-37.
- Witmer AN**, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22: 1-29.
- Wong ML**, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005; 39: 75-85.
- Yamada N**, Matsuda R, Morishige N, Yanai R, Chikama TI, Nishida T, *et al.* Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from substance P and insulin-like growth factor-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br J Ophthalmol.* 2008; 92: 896-900.
- Yao F**, Eriksson E. Gene therapy in wound repair and regeneration. *Wound Repair Regen.* 2000; 8: 443-51.
- Yoon KC**, You IC, Im SK, Jeong TS, Park YG, Choi J. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology.* 2007; 114: 1637-42.
- Yoshioka T**, Kanamori A, Washio T, Aoto K, Uemura K, Sakane M, *et al.* The effects of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) on healing of medial collateral ligament of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2013; 21: 1763-9.
- Yu FS**, Yin J, Xu K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull.* 2010; 81: 229-35.
- Zhai J**, Wang Q, Tao L. Connexin expression patterns in diseased human corneas. *Exp Ther Med.* 2014; 7: 791-8.
- Zhang Y**, Akhtar RA. Epidermal growth factor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase during wound closure in rabbit corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38: 1139-48.
- Zhou L**, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, Li XR, Beuerman RW. In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics.* 2012; 75: 3877-85.
- Zieske JD**. Perpetuation of stem cells in the eye. *Eye (Lond).* 1994; 8: 163-9. Review.
- Zieske JD**, Gipson IK. Agents that affect corneal wound healing: modulation of structure and function. In: Albert DM, Jakobiec FA, editors. *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences.* Philadelphia: WB Saunders; 1994. p. 1093-9.
- Zimmermann R**, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, *et al.* Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion.* 2001; 41: 1217-24.



**Anexo**





# In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells

Vanesa Freire,<sup>1</sup> Noelia Andollo,<sup>2</sup> Jaime Etxebarria,<sup>2,3</sup> Juan A. Durán,<sup>1,4</sup> and María-Celia Morales<sup>1</sup>

**PURPOSE.** We compared the effects of three blood derivatives, autologous serum (AS), platelet-rich plasma (PRP), and serum derived from plasma rich in growth factors (PRGF), on a human corneal epithelial (HCE) cell line to evaluate their potential as an effective treatment for corneal epithelial disorders.

**METHODS.** The concentrations of epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and fibronectin were quantified by ELISA. The proliferation and viability of HCE cells were measured by an 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay. Cell morphology was assessed by phase-contrast microscopy. The patterns of expression of several connexin, involucrin, and integrin  $\alpha 6$  genes were analyzed by real-time RT-PCR.

**RESULTS.** We found significantly higher levels of EGF in PRGF compared to AS and PRP. However, AS and PRGF induced robust proliferation of HCE cells. In addition, PRGF cultured cells grew as heterogeneous colonies, exhibiting differentiated and non-differentiated cell phenotypes, whereas AS- and PRP-treated cultures exhibited quite homogeneous colonies. Finally, PRGF upregulated the expression of several genes associated with communication and cell differentiation, in comparison to AS or PRP.

**CONCLUSIONS.** PRGF promotes biological processes required for corneal epithelialization, such as proliferation and differentiation. Since PRGF effects are similar to those associated with routinely used blood derivatives, the present findings warrant further research on PRGF as a novel alternative treatment for ocular surface diseases. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012; 53:5571–5578) DOI:10.1167/iovs.11-7340

From the <sup>1</sup>R&D&I Department, Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Bilbao, Spain; the <sup>2</sup>Cell Biology and Histology, and <sup>4</sup>Ophthalmology Departments, School of Medicine and Dentistry, Basque Country University, Leioa, Spain; and <sup>3</sup>Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain.

Supported by a fellowship from the Jesus de Gangoiti Barrera foundation and Torres-Quevedo Program (VF), by Grants UE07/10 and UE09/12 from the University of the Basque Country/Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Grant No. S-PE10UN60 from the Saiotek Program of the Basque Government, and Grant UF11/44 from the University of the Basque Country.

Submitted for publication February 7, 2011; revised July 21 and November 3, 2011, and March 24 and May 24, 2012; accepted July 2, 2012.

Disclosure: V. Freire, None; N. Andollo, None; J. Etxebarria, None; J.A. Durán, None; M.-C. Morales, None

Corresponding author: María-Celia Morales, ICQO. c/ Virgen de Begoña 34, E-48006 Bilbao, Vizcaya, Spain; celiamoralesgonzalez@gmail.com.

The cornea is considered to be the most sensitive part of the corporeal surface and its integrity is critical for normal visual function. Many corneal surface disorders involve tear film dysfunction, the consequences of which are mainly inflammatory, but they also may include epithelial metaplasia, glandular dysfunction, and neurotrophic damage.<sup>1,2</sup>

Conventional treatments for these disorders include pharmaceutical tear film substitutes, therapeutic contact lenses, anti-inflammatory agents, and oral antibiotics. However, to date, an ideal substitute for natural tear film has not been developed, essentially because natural tear is a dynamic and complex solution with specific antimicrobial, mechanical, and optical properties. In addition, natural tear contains many proteins, vitamins, and growth factors, which promote proliferation, migration, and differentiation.<sup>3</sup> It should not be forgotten that most artificial tears contain preservatives, which potentially make them toxic for the ocular surface.<sup>4,5</sup>

To obtain an alternative tear substitute, several trials have been performed using recombinant nerve growth factor (NGF),<sup>6,7</sup> epidermal growth factor (EGF),<sup>8</sup> or fibronectin<sup>9</sup> as topical treatments. However, although some preparations have yielded successful results, the stability of these preparations was low. The possibility of stimulating cell proliferation by different factors present in plasma also has been investigated.<sup>10</sup> These factors, acting together, could in principle lead to a more integrated response of the affected tissue. In this sense, the introduction of blood-derived products in the field of ophthalmology has been a breakthrough. The description of autologous serum (AS)<sup>11</sup> was the first revolution, because its pH, osmolality, and biochemical properties were similar to those of natural tear. In addition, it contains essential nutrients, such as growth factors, vitamins, and bacteriostatic components, such as IgG and lysozyme. Since then, AS has been used frequently for topical therapy in patients with ocular disorders, as it is associated with enhanced healing.<sup>12–17</sup>

Subsequently, platelets that are involved in tissue repair processes were identified as a major source of the growth factors present in plasma. This fact has motivated growing interest in the development of platelet-rich plasma (PRP) preparations, with the intention of increasing the concentration of these mediators and potentiating healing processes.<sup>18</sup> However, there presently is no consensus about the most adequate method to obtain AS and other blood derivatives.<sup>19</sup> Thus, different preparations have been reported by different research groups.<sup>15,17,20–24</sup> Furthermore, thrombin is used routinely to stimulate the release of growth factor content from platelets. However, this practice could lead to important adverse events, such as immune reaction and the appearance of coagulopathies.<sup>25</sup>

More recently, a novel blood derivative has been developed that is characterized by easy and fast processing, and the ability to stimulate the release of platelet content in the absence of thrombin and leucocytes. This plasma rich in growth factors (PRGF) was introduced in maxillofacial surgery and trauma

with excellent results.<sup>26,27</sup> Recently, our group successfully and, to our knowledge, for the first time used serum derived from PRGF for the treatment of persistent epithelial defects<sup>28</sup> and dry eye syndrome.<sup>29</sup>

In this study, we compared the in vitro effect on human corneal epithelial (HCE) cells of three blood derivatives (AS, PRP, and PRGF), which are used in the treatment of corneal disorders. To this end, we performed several assays to characterize the growth factor content of the three different preparations, and to determine their effects on the growth and differentiation of a well characterized HCE cell line.

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of Blood-Derived Products

Blood from 16 healthy volunteers was collected by venipuncture (age range 30–60 years) after patient consent had been signed, in accordance with the Declaration of Helsinki. All volunteers were healthy and not taking any medication. The blood sample from each volunteer was processed according to the following three methods to obtain the corresponding blood derivatives:

1. Autologous serum (AS): Spontaneous coagulation for 2 hours at room temperature followed by centrifugation at 1,000 g for 15 minutes. Collection of the complete supernatant fraction.<sup>17</sup>
2. Platelet-rich plasma (PRP): Centrifugation at 460 g for 8 minutes and collection of the complete supernatant fraction.<sup>24</sup>
3. Serum derived from plasma rich in growth factors (PRGF): Centrifugation at 460 g for 8 minutes, followed by collection of the complete supernatant fraction and induction of clot formation by adding calcium chloride at a final concentration of 22.8 mM (BTI Biotechnology Institute, S.L., Miñano, Álava, Spain), in the absence of red and white blood cells. After 2 hours at 36°C, the clot was retracted and the supernatant was collected.<sup>28,29</sup>

For blood collection, we use tubes with sodium citrate as anticoagulant for PRP and PRGF processing or without anticoagulant for AS processing. The complement factors of all blood derivatives were inactivated at 56°C for 30 minutes. Afterwards, we pooled samples from the different volunteers to obtain representative blood preparations that provided reproducible results and minimized inter-individual variability. These pools were stored at –20°C until its use for the in vitro assays.

### Quantification of Growth Factor Concentrations

The concentrations of epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), platelet-derived growth factor (PDGF), and fibronectin were measured from undiluted preparations using commercially available Quantikine colorimetric sandwich ELISA kits purchased from R&D (Minneapolis, MN), except for human fibronectin, which was acquired from Chemicon International Inc. (Temecula, CA). Results were expressed as mean  $\pm$  SD for each age group for the three different preparations.

### Cell Culture Model

SV-40 immortalized HCE cells were provided kindly by K. Araki-Sasaki.<sup>30</sup> Cells were cultured at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Ham's F12 (1:1 mix; Lonza, Verviers, Belgium) with 2 mM L-glutamine (Lonza) and 1% penicillin-streptomycin (Lonza), together with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza). We also added to the medium 10 ng/mL EGF (Sigma, St. Louis, MO), 5  $\mu$ g/mL insulin (Sigma), 0.1  $\mu$ g/mL cholera toxin (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium), and 0.5% dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma). From here onwards, we refer to EGF, insulin, cholera toxin, and DMSO as "supplements." Upon confluence, cells were

detached with 0.5% trypsin-0.2% EDTA (Sigma) and subcultivated 1:4–1:5 twice a week.

### Cell Proliferation Assays

The effect of the three blood derivatives on HCE cell proliferation was tested at several dilutions (10, 20, and 50%) and times (24, 48, and 72 hours). Proliferation was expressed as proliferation rate  $\pm$  SD of viable cells with respect to viable cells just before exposure to blood derivatives ( $t = 0$  hours).

Cell viability was assessed using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Sigma-Aldrich). MTT is reduced by mitochondrial and cytosolic dehydrogenases in living cells to a purple formazan dye, which is detectable spectrophotometrically and whose absorbance is known to be directly proportional to the number of viable cells.

HCE cells were seeded at 3000 cells/well in 96-well plates and left to attach to the plastic substrate. Subsequently, to synchronize cultures, we substituted the initial culture medium containing FBS and supplements for a medium with 1% bovine serum albumin (BSA), but without supplements, and incubation proceeded overnight. Then, at this starting time ( $t = 0$  hours), cells were exposed to medium containing supplements, and FBS, AS, PRP, or PRGF. After 24, 48, and 72 hours, cells were washed and incubated with 0.5 mg/mL MTT for three hours. Then the MTT solution was removed and 100  $\mu$ L/well DMSO was added. Optical densities were determined at 540 nm using a microplate reader (ELx800 Microplate Reader; BioTek Instruments, Winooski, VT). All experiments were performed in quadruplicate and repeated three times.

### Microscopy Assays

Phase-contrast microphotographs were taken to analyze culture morphology. Cells were incubated for 14 days with 10% FBS or with 20% of one of the three different blood preparations. Cultures were passed every three days. After washing with fresh culture medium, cell morphology was observed using a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TS 100; Nikon, Tokyo, Japan) and images were captured with ProgRes CapturePro 2.6 software (Jenoptik, Jena, Germany).

### Real-Time RT-PCR

To compare transcription levels of a panel of genes in the differently treated HCE cells, real-time RT-PCR was performed. Thus, HCE cells were grown for 14 days with 10% FBS or 20% AS, PRP, and PRGF, in the presence or absence of supplements. Total RNA was extracted according to the manufacturer's protocol (RNeasy minikit; Qiagen Inc., Valencia, CA), and treated with DNase for 30 minutes at 37°C and 10 minutes at 65°C (Promega, Madison, WI). Total RNA was quantified, tested on an agarose gel, and stored at –80°C until use.

For each sample, cDNA was synthesized from 0.5  $\mu$ g total RNA using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Real-time PCR assays were performed with an iCycler PCR platform (Bio-Rad). The reaction mixture contained 1  $\mu$ L cDNA from the RT reaction, together with forward and reverse specific primers (250 nM each) and iQSYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a final reaction volume of 20  $\mu$ L. Thermal cycling conditions were as follows: An initial polymerase activating step at 95°C for 3 minutes, followed by 60 cycles for 20–30 seconds each at 95°C (denaturation step), 20–30 seconds at the corresponding annealing temperature for each gene (Table 1), and 20–30 seconds at 72°C (extension step), during which data were collected. Each assay included a negative control consisting of the absence of cDNA. Expression data were generated from 4 amplification reactions with samples and controls run in triplicate, and performed on different cDNA samples reverse transcribed from RNA prepared from independent culture assays. Optical data obtained by real-time PCR were analyzed using the MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System Software, Version 1.0 (Bio-Rad). The dynamic range of detection for each gene was determined by preparing 5-fold serial dilutions of

TABLE 1. Primers and Conditions Used for Real Time RT-PCR

Gene	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicon Size (bp)	Annealing Temperature °C
<i>CX26</i>	GCTGCAAGAACGTGTGCTAC	TGGGTTTTGATCTCCTCGAT	196 bp	65°C
<i>CX30</i>	TGCTTAACGTGGCAGAGTTG	GGTTGGTATTGCCTTCTGGA	244 bp	60°C
<i>CX31.1</i>	CCTGAGTGGGGTCAACAAGT	GGGACACAGGGAAGAACTCA	191 bp	65°C
<i>CX43</i>	CCTTCTTGCTGATCCAGTGGTAC	ACCAAGGACACCACCAGCAT	154 bp	60°C
Integrin $\alpha 6$	ATGCACGCGGATCGAGTTT	TTCCTGCTTCGTATTAACATGCT	160 bp	60°C
Involucrin	TCCTCCAGTCAATACCCATCAG	GCAGTCATGTGCTTTTCCTCTTG	126 bp	60°C
<i>GAPDH</i>	CCTGTTTCGACAGTCAAGCCG	CGACCAAATCCGTTGACTCC	102 bp	56°C
$\beta$ -actin	AGATGACCCAGATCATGTTTGGAG	GTCACCGGAGTCCATCACG	119 bp	60°C
<i>RIG/S15</i>	TTCCGCAAGTTACACTACC	CGGGCCGGCCATGCTTTTACG	361 bp	60°C

control HCE cells (undiluted, 1:5, 1:25, 1:125, and 1:625). The reliability of real-time PCR was defined by regression analysis of average Ct versus the  $\log_{10}$  of the target copy number. PCR efficiency was around 93% with all primer pairs. Melt Curve analysis of each PCR assay and 1.5% agarose gel electrophoresis analysis of randomly selected samples were performed to confirm the specificity of the amplification products. The expression of three different housekeeping genes (*GAPDH*,  $\beta$ -actin, and *RIG/S15*) also was analyzed. They were chosen after verifying their suitability by geNorm software (version 3.5). They were used to normalize expression data obtained from the studied genes, using the Bio-Rad Gene Expression Macro Software Version 1.1 derived from the algorithms outlined by Vandesompele et al.<sup>31</sup> All primers were synthesized commercially (Isogen Life Sciences, Barcelona, Spain) and a BLAST search was performed to verify their specificity for their target DNA sequences. The sequences of the primer pairs, as well as the size of the corresponding amplified fragments are detailed in Table 1.

### Statistical Analysis

Means and SDs of all variables were calculated using Windows NT Excel software. To determinate the degree of statistical significance, we performed a paired 2-tailed Student's *t*-test.

## RESULTS

### Quantification of Growth Factors in the Blood-Preparations

Three different preparations (AS, PRP, and PRGF) were obtained from the blood of each volunteer ( $n = 16$ ). Then, we measured

by colorimetric assays the concentration of several growth factors in each blood preparation. We found that EGF levels were significantly higher in PRGF compared to the other two preparations (Table 2). Furthermore, in PRP, in which clotting had not occurred, the concentration of EGF was significantly lower than in the other two. Significant differences in FGF levels were not found among the different preparations, but the concentration of this factor was found to be age-dependent. Thus, the mean concentration of FGF in the younger volunteers ( $88.94 \pm 9.04$  pg/mL) was higher than that in the 40–49-year-old group ( $41.47 \pm 5.89$  pg/mL) and in the 50–59-year-old group ( $39.70 \pm 3.97$  pg/mL). Mean VEGF levels also were age-dependent, being highest in the group of oldest volunteers. In addition, VEGF levels were significantly lower in PRP preparation than in the other two preparations. We also observed higher levels of HGF in AS compared to PRP and PRGF, indicating that the method for obtaining AS increases the concentration of HGF. Finally, the concentrations of PDGF and fibronectin were not statistically different among the different preparations or with respect to age.

Quantification data showed important differences in the concentration of growth factors among volunteers. To avoid this variability in *in vitro* experiments, we used pools of the preparations for subsequent culture assays.

### Cell Proliferation

We measured the effect on HCE cell proliferation of exposure for 24, 48, and 72 hours to the different blood derivatives. Two of the three preparations (AS and PRGF) produced a clear dose-

TABLE 2. Concentration of Growth Factors in the Three Different Blood Derivatives

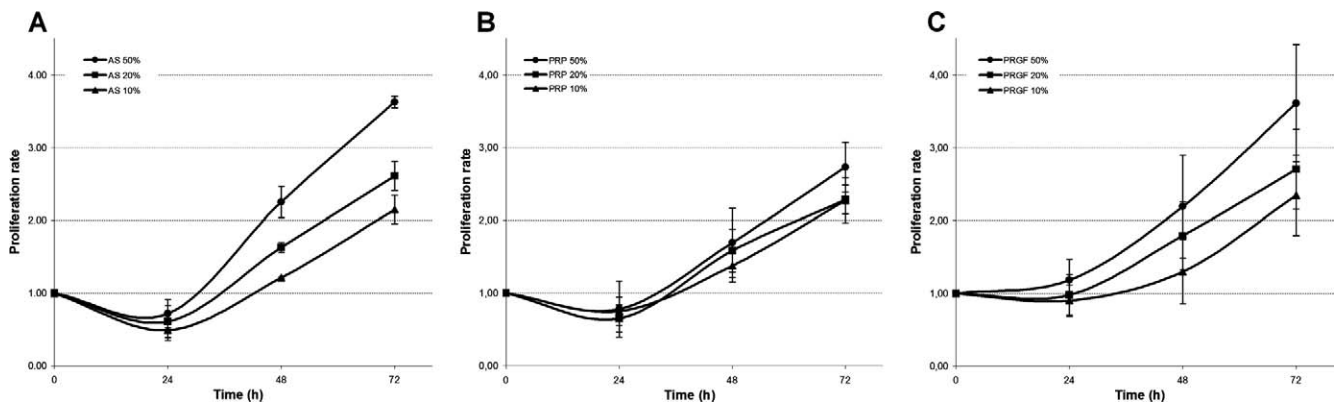
Blood Derivatives	Age (y)	EGF (pg/mL)	FGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	HGF (pg/mL)	PDGF (ng/mL)	Fibronectin ( $\mu$ g/mL)
AS	30–39	409.52 $\pm$ 69.04	102.50 $\pm$ 69.17	127.69 $\pm$ 100.84	282.47 $\pm$ 136.57	17.06 $\pm$ 4.24	30.83 $\pm$ 6.86
	40–49	460.39 $\pm$ 114.83	36.35 $\pm$ 20.42	143.68 $\pm$ 36.92	333.13 $\pm$ 62.59	16.71 $\pm$ 2.99	30.18 $\pm$ 9.86
	50–59	398.07 $\pm$ 76.16	36.73 $\pm$ 37.21	203.35 $\pm$ 97.65	222.90 $\pm$ 22.94	18.11 $\pm$ 4.15	32.34 $\pm$ 4.45
	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>417.94 <math>\pm</math> 82.62</b>	<b>58.55 <math>\pm</math> 54.64</b>	<b>160.06 <math>\pm</math> 89.90</b>	<b>275.83 <math>\pm</math> 101.65<math>\ddagger</math></b>	<b>17.36 <math>\pm</math> 3.73</b>	<b>31.11 <math>\pm</math> 6.76</b>
PRP	30–39	287.79 $\pm$ 70.88	81.87 $\pm$ 52.93	57.97 $\pm$ 43.59	93.13 $\pm$ 92.45	17.48 $\pm$ 5.44	28.65 $\pm$ 8.37
	40–49	277.79 $\pm$ 85.61	50.30 $\pm$ 35.86	47.59 $\pm$ 39.76	48.47 $\pm$ 17.71	15.80 $\pm$ 4.52	31.36 $\pm$ 2.56
	50–59	273.49 $\pm$ 93.73	36.71 $\pm$ 32.83	70.75 $\pm$ 48.20	98.90 $\pm$ 11.49	20.68 $\pm$ 8.36	31.99 $\pm$ 1.90
	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>279.83 <math>\pm</math> 78.18</b>	<b>57.04 <math>\pm</math> 44.44</b>	<b>60.31 <math>\pm</math> 42.50<math>\dagger</math></b>	<b>84.60 <math>\pm</math> 63.87</b>	<b>18.26 <math>\pm</math> 6.44</b>	<b>30.55 <math>\pm</math> 5.10</b>
PRGF	30–39	480.80 $\pm$ 94.88	82.45 $\pm$ 51.61	105.06 $\pm$ 80.33	117.32 $\pm$ 118.64	16.07 $\pm$ 5.01	32.05 $\pm$ 4.60
	40–49	522.64 $\pm$ 93.75	37.76 $\pm$ 19.33	81.49 $\pm$ 42.68	37.13 $\pm$ 42.88	14.49 $\pm$ 5.00	31.47 $\pm$ 3.02
	50–59	475.09 $\pm$ 109.06	45.66 $\pm$ 29.16	169.62 $\pm$ 84.88	79.07 $\pm$ 44.11	15.80 $\pm$ 4.83	31.98 $\pm$ 3.99
	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>489.12 <math>\pm</math> 95.48*</b>	<b>58.27 <math>\pm</math> 41.25</b>	<b>124.60 <math>\pm</math> 79.64</b>	<b>83.74 <math>\pm</math> 79.42</b>	<b>15.58 <math>\pm</math> 4.65</b>	<b>31.83 <math>\pm</math> 3.56</b>

\* Statistically significant differences between PRGF and PRP, and/or AS ( $P \leq 0.05$ ).

$\dagger$  Statistically significant differences between PRP and PRGF, and/or AS ( $P \leq 0.05$ ).

$\ddagger$  Statistically significant differences between AS and PRP, and/or PRGF ( $P \leq 0.05$ ).





**FIGURE 1.** Patterns of proliferation (measured by the MTT assay) of HCE cells exposed for 24, 48, and 72 hours to increasing concentrations of the three blood derivatives. (A) AS. (B) PRP. (C) PRGF. Results are expressed as proliferation rate  $\pm$  SD of viable cells with respect to viable cells at  $t = 0$  hours. In each case,  $n = 3$ .

response growth pattern in HCE cells (Figs. 1A, 1C). However, PRP induced a weaker response, which did not appear to be dose-dependent (Fig. 1B). We observed a tendency for cells incubated with AS and PRP to exhibit reduced viability following 24 hours of incubation with different concentrations of the three preparations (Figs. 1A, 1B).

When comparing cell viability in response to the three different preparations with that in response to FBS (Fig. 2), we found that PRGF exhibited the highest cell viability at 24 hours (Fig. 2A). However, the three blood derivatives showed similar cell viability at doses of 10 and 20% at 48 and 72 hours of treatment (Figs. 2B, 2C). In contrast, doses of 50% AS and PRGF after 48 and 72 hours showed similar cell viability, which was higher than that of PRP. In cultures with 50% PRGF, cell viability was not significantly different from that observed when cells were cultured with FBS (Figs. 2A–2C).

### Cell Morphology

Phase-contrast micrographs of HCE cells cultured with the three blood derivatives revealed substantial differences associated with the different treatments (Fig. 3). Thus, cells cultured with AS or PRP grew as quite homogeneous colonies of medium- and large-sized cells. In addition, PRP cultures showed a lower cell density, probably due to the weaker growth pattern of cells under this condition. In contrast, PRGF and FBS cultures grew in a similar manner, and both exhibited cell heterogeneity. Thus, two clearly distinguishable types of cell populations were observed, those with small cells that

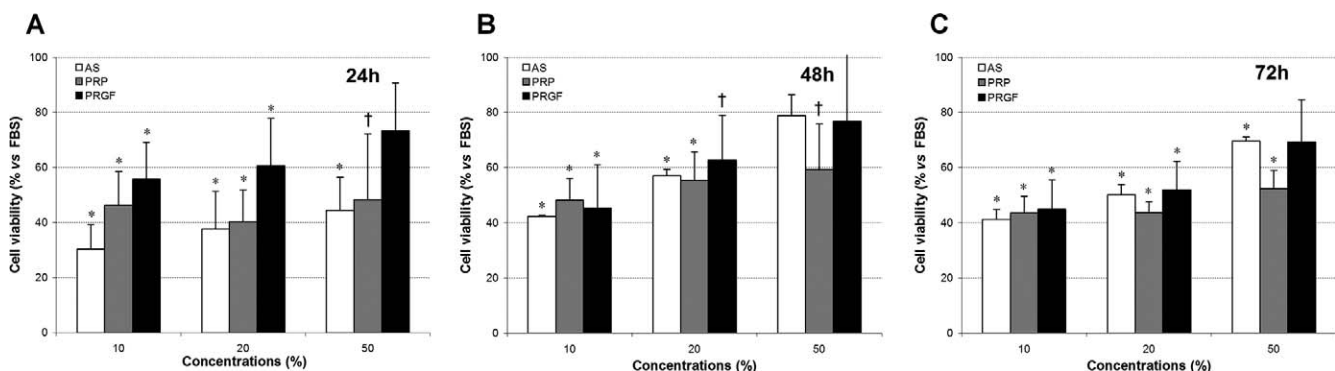
were grouped together, and those with larger and more flattened cells.

The absence of supplements from cultures was associated with a more differentiated phenotype in all cases. However, this was more evident in PRGF and FBS cultures, in which colonies of small-sized cells were observed rarely. Instead, medium- and large-sized cells coexisted in expanded colonies (Fig. 3).

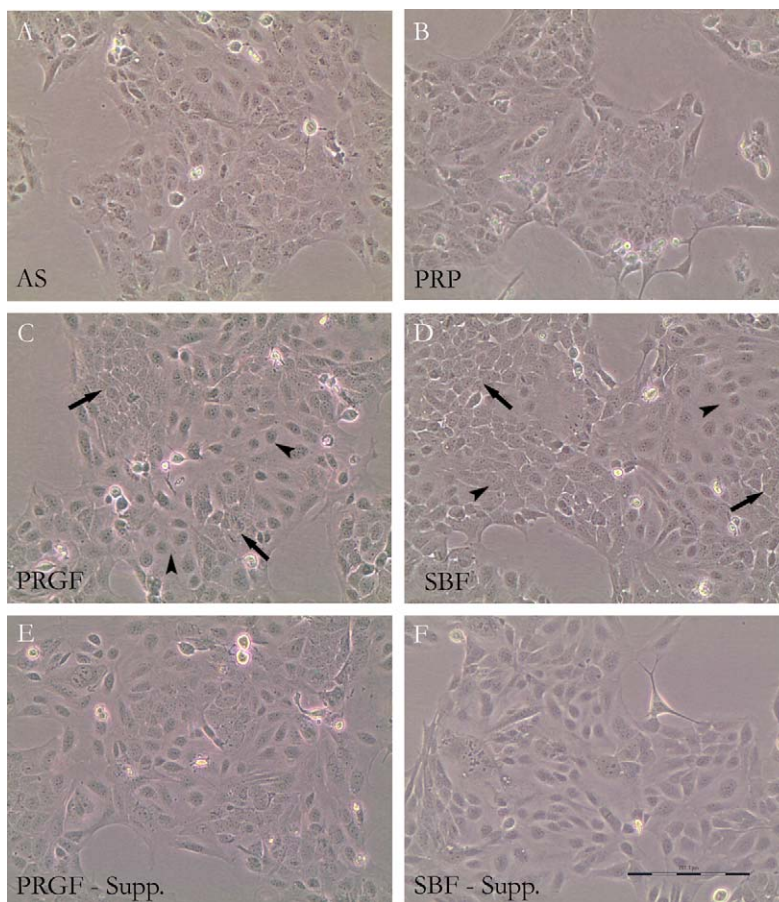
### Differentiation Analysis by Gene Expression Patterns

The passage of specific growth modulation signals through gap junctions may regulate the proliferation and differentiation of human epithelial cells. For this reason, we performed quantitative RT-PCR to study the expression level of several connexins, such as connexin 26 (*CX26*), connexin 30 (*CX30*), connexin 31.1 (*CX31.1*), and connexin 43 (*CX43*). These gap junction proteins are transmembrane proteins, which are differentially distributed along the corneal epithelium. In addition, we analyzed the expression of integrin  $\alpha 6$ , which is expressed mainly in the basal epithelial cell layer as a component of hemidesmosomes, and involucrin, which is expressed specifically in superficial epithelial cells in the human cornea. To this end, HCE cells were cultured for 14 days with 10% FBS, 20% AS, 20% PRP, or 20% PRGF, in the presence and absence of supplements.

Analysis of quantitative RT-PCR results revealed very distinct gene expression patterns in HCE cells cultured with PRGF in



**FIGURE 2.** Viability (MTT assay) of HCE cells exposed to different concentrations of blood derivatives. Viability was measured 24, 48, and 72 hours after treatment. Results are expressed as percentage mean  $\pm$  SD with respect to viability in FBS-treated cultures ( $n = 3$  for each case). Statistically significant differences with respect to the FBS cultures \* $P \leq 0.01$ . † $P \leq 0.05$ .



**FIGURE 3.** Phase-contrast microphotographs of HCE cell monolayers after 14 days of exposure to (A) AS, (B) PRP, (C) PRGF, (D) FBS, (E) PRGF without supplements (- Supp.), and (F) SBF - Supp. AS, PRP, and PRGF each at a dilution of 20%, and FBS at 10%. Morphologic differences among cultures are apparent. Compacted colonies of small and roundish cells (arrows), and bigger and more flattened cells (arrowheads) are indicated. In the absence of supplements, lower density colonies were seen, and big and flattened cells were predominant. Fields illustrated in these images are representative of the whole culture. Scale bar: 200  $\mu$ m.

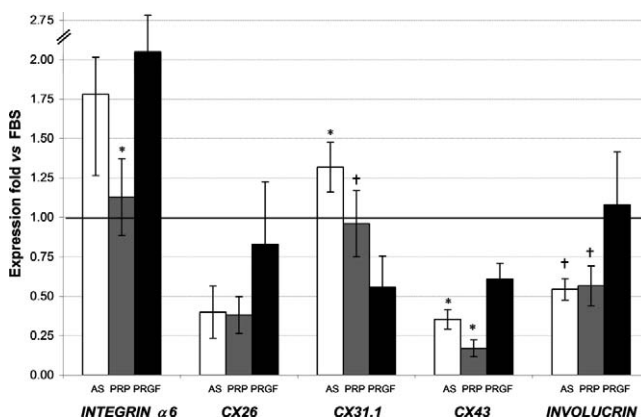
comparison to cells cultured with AS or PRP. PRGF treatment was found to induce higher expression of *CX26*, *CX43*, and involucrin, with differences being statistically significant in the case of the latter two genes (Fig. 4). In contrast, expression of *CX31.1* was found to be the most variable among preparations, being significantly down-regulated in PRGF-exposed cultures in comparison to PRP and AS cultures. In addition, integrin  $\alpha 6$  was more highly expressed in PRGF-cultured cells with respect to those cultured with AS or PRP, this difference being statistically significant for the latter case.

Finally, we also examined the effect of the absence or presence of supplements on the expression of these genes in HCE cells by real-time RT-PCR, since it is known that these factors are necessary to maintain the stable morphology of cultures. We observed that in the absence of supplements, the expression of involucrin and particularly *CX31.1* increased in all treatments (data not shown) in comparison to the corresponding treatment in the presence of supplements.

**DISCUSSION**

We investigated the effect of three blood derivatives on HCE cell line. Two of the preparations are being used currently as therapeutic agents for several ocular surface diseases,<sup>17,24</sup> while the third preparation (PRGF) recently has been introduced into the field of ophthalmology.<sup>28,29</sup>

It is known that platelets are a source of a variety of growth factors with important functions in wound healing.<sup>26,32-34</sup> The PRP preparation that we studied is a platelet concentrate in which platelets are neither activated nor removed. However,



**FIGURE 4.** Real-time RT-PCR of integrin  $\alpha 6$ , several connexin and involucrin gene expression in HCE cells after 14 days of exposure to the three blood derivatives in media including supplements. Results are expressed as fold gene expression  $\pm$  SD versus FBS cultures ( $n = 4$ ). Statistically significant differences with respect to PRGF cultures. \* $P \leq 0.01$ . † $P \leq 0.05$ .

platelet concentrates cannot be stored for more than a few days unless frozen. When PRP preparations are frozen, platelets break and their membranes produce a cloudy aspect in PRP after thawing. This debris is thought to induce apoptotic cell death.<sup>35</sup> As an alternative, our group has been using another blood derivative (serum derived from PRGF) in which the growth factors are released from platelets into the supernatant by their activation with calcium chloride, which is preferred over thrombin, because it enables a more sustained and physiologic release of platelet constituents, without immunologic reactions and the appearance of coagulopathies.<sup>25</sup> In addition, the release of growth factors occurs in the absence of leukocytes, thereby avoiding the pro-inflammatory effects of proteases and acid hydrolases contained in white blood cells.<sup>36,37</sup> Finally, we also used another frequently used blood derivative, AS. This preparation is obtained using extraction tubes that facilitate the subsequent coagulation process.

We examined the *in vitro* effects of each preparation on the growth, morphology, and cell-to-cell communication features of immortalized HCE cells, using concentrations of blood derivatives that are used commonly in clinical practice.

First, we determined the concentrations of several growth factors in these preparations to characterize their content. These factors can influence corneal healing and may explain the different effects of the blood derivatives. It has been demonstrated that EGF supports epithelial cell proliferation<sup>38,39</sup> and, as in all tissue repair, cell proliferation is a necessary step for corneal healing. Accordingly, we observed that EGF is critical for HCE cell proliferation because removal of EGF from the medium leads to almost 50% reduction in proliferation (data not shown). We found the highest concentrations of EGF in PRGF. Thus, the presence of high levels of EGF is likely to be one of the reasons for the robust proliferative activity of HCE cells in PRGF cultures. Consistent with this idea is the finding that in PRP, in which platelet activation has not occurred, EGF levels are lower than in other preparations and there is a weaker effect on corneal epithelial cell growth.

HGF has been shown to be implicated in the paracrine enhancement of angiogenesis by inducing VEGF expression. Thus, VEGF and HGF may be secreted or synthesized in the same local environment.<sup>40</sup> Accordingly, the significantly higher concentrations of HGF in AS could induce angiogenic effects. However, despite these levels of VEGF and HGF, we did not detect neovascularization in any of the patients treated with AS.<sup>28</sup> This absence of neovascularization may be due to an inhibitory effect or to the existence of a balance between pro-angiogenic (VEGF, HGF, and so forth) and anti-angiogenic (thrombospondin-1, platelet factor-4, endostatin) factors in the preparations.

The mitogenic activity of PDGF has been demonstrated recently.<sup>40,41</sup> However, this activity is inhibited only modestly by an anti-PDGF antibody,<sup>40</sup> suggesting that other proteins may contribute to the total cell proliferation. Consistently, our data showed similar levels of PDGF in all three blood derivatives, which nevertheless exhibited very different cell proliferation patterns.

We detected high concentrations of fibronectin in the three preparations. During wound healing, fibronectin/fibrinogen receptors are upregulated on epithelial cells, which migrate over the bare wound.<sup>42</sup> Therefore, the high concentrations of fibronectin found in blood derivatives could favor cell migration. Furthermore, high levels of EGF receptor have been reported to be expressed in the cells migrating over the wound.<sup>43</sup> Thus, the relatively high EGF levels in PRGF also may contribute to improved wound healing.

AS and PRGF were found to induce robust proliferation in HCE cells. However, cultures incubated in the presence of PRGF did not exhibit the tendency to reduced viability exhibited by cells 24

hours after incubation with AS and PRP. These findings raise the possibility that PRGF may be tolerated better initially by the corneal epithelium than the other two treatments.

MTT assays showed that the proliferative response of cells exposed to AS and PRGF (but not PRP) was dose-dependent. On the other hand, HCE cells cultured with similar preparations produced by others have been shown to exhibit substantially reduced viability after 24 hours.<sup>22</sup> However, we showed here that the viability of cultures exposed to these three preparations does not decrease with respect to FBS cultures, following 24–72 hours of incubation, supporting the potential safety of these derivatives in clinical applications.

We also found that the three blood derivatives induced different morphologies in cultured cells. AS and PRP appeared to induce cell growth in quite homogeneous colonies of medium- or large-sized cells. In contrast, HCE cells cultured with PRGF exhibited a more heterogeneous morphology; they included a subpopulation of small cells organized in compact colonies. These may represent phenotypically less differentiated cells that may be a cellular source for the renewal of the epithelium. These cultures also exhibited another subpopulation of large and flattened cells, which likely represent a more differentiated phenotype. In agreement with these data, it has been reported that the differentiation of corneal cultured cells results in cell flattening and the formation of large epithelial sheets with increased intercellular communication.<sup>44</sup>

Corneal epithelial cells communicate with each other through gap junctions.<sup>45–48</sup> These gap junctions, which are made up of connexins, may contribute to the regulation of corneal epithelial cell functions, such as cell growth, differentiation, adhesion, and migration.<sup>47,49</sup> A number of connexins are known to be expressed in HCE cells. *Cx26* is expressed in the basolateral plasma membranes of basal cells.<sup>44</sup> A suprabasal distribution has been found for *Cx30*. In contrast, *Cx43* localizes to the apical surface in the basal layer and is found in all plasma membranes throughout the suprabasal layers. Finally, *Cx31.1* has been localized to the apical cell surface of basal cells.<sup>44</sup> However, neither *CX26*, *30*, *31.1*, nor *43* are expressed in the upper and most differentiated cells of epithelia; cells in the latter intensely express the late differentiation marker involucrin,<sup>50</sup> which is a structural protein found in the cytosol.

In this study, we detected the expression of *CX26*, *31.1*, and *43*, but not *CX30*, in cultured HCE cells. An increase in connexins expression in corneal epithelial cells is indicative of cell differentiation,<sup>43,44,51</sup> and the formation of a well-structured and organized epithelium. We found that the expression of *CX26*, *CX43*, and even involucrin are upregulated in PRGF-treated cultures, in comparison to those treated with AS and PRP. Consistently, at a morphologic level, we observed a subpopulation of flattened and differentiated cells in PRGF-treated cultures.

In response to corneal epithelium debridement, a dynamic modulation of gap junction expression occurs, accompanied by epithelial proliferation and differentiation.<sup>52</sup> In addition, migrating epithelial cells show reduced expression of *Cx43*, together with a different cellular distribution of this protein.<sup>43,47,53,54</sup> Here, we found that treatment of HCE cells with any of the three blood derivatives is associated with a lower expression of *CX43* in comparison to that found in FBS-treated cultures. Down-regulated *CX43* expression may reflect active migration processes under these culture conditions.

On the other hand, integrin  $\alpha 6$  is an adhesion molecule that attaches cells to extracellular matrix proteins.<sup>55</sup> It is expressed mainly in less differentiated basal epithelial cells, as a component of hemidesmosomes. It also has been demonstrated that during regeneration of corneal epithelium, the hemidesmosomes relocate, allowing basal cells to migrate



towards denuded areas, and it probably is a prerequisite for the formation of new functional gap junctions.<sup>43,56</sup> In this context, we detected the highest levels of integrin  $\alpha 6$  expression in PRGF-treated cultures, in which compact colonies of small and roundish cells could be observed. Cells with this more undifferentiated aspect were detected predominantly in PRGF-treated cultures. These cells are likely to be those that underlie the proliferation capacity of HCE cultures treated with PRGF, and may be the *in vitro* homologs that are responsible for the renewal of the epithelium.

Enhanced expression of involucrin and *CX31.1* was detected when supplements were removed from culture media. Increased *CX31.1* expression usually is associated with epithelial cell differentiation.<sup>57,58</sup> Consistently, we also observed a more differentiated phenotype of HCE cells and reduced proliferation under these culture conditions (not shown). In this sense, we observed that the proliferation of cultures incubated with FBS in the absence of supplements was reduced by 70%. However, this decrease was almost unappreciated in PRGF-treated cultures, possibly due to the presence of the aforementioned undifferentiated cells, which do not appear in cultures treated with other blood derivatives.

In summary, AS and PRGF induce dose-dependent cellular proliferation to a similar degree. However, PRGF exhibits a higher concentration of EGF, and upregulates the expression of several genes involved in communication and cell differentiation, in comparison with the other blood derivatives studied in our report. In addition, PRGF-incubated HCE cells present a heterogeneous morphology, exhibiting differentiated and non-differentiated cell phenotypes, whereas AS- and PRP-incubated cells are more homogeneous. The clinical relevance of the present results resides in their support of the use of a novel serum derived from PRGF, which is produced in the absence of leucocytes, as a promising alternative treatment for ocular surface disorders. Although a well-characterized HCE cell line represents a very useful model to understand better and simulate *in vivo* situations, *in vivo* experiments will be necessary to confirm that our observations in culture correlate with biological outcomes.

## References

- Cavanagh HD, Colley AM. The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol Suppl.* 1989;192:115-134.
- Ladas JG, Mondino BJ. Systemic disorders associated with peripheral corneal ulceration. *Curr Opin Ophthalmol.* 2000; 11:468-471.
- Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Ocul Surf.* 2007;5:228-239.
- Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:948-956.
- Noecker R. Effects of common ophthalmic preservatives on ocular health. *Adv Ther.* 2001;18:205-215.
- Lambiase A, Centofanti M, Micera A, et al. Nerve growth factor (NGF) reduces and NGF antibody exacerbates retinal damage induced in rabbit by experimental ocular hypertension. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1997;35:780-785.
- Lambiase A, Coassin M, Sposato V, et al. NGF topical application in patients with corneal ulcer does not generate circulating NGF antibodies. *Pharmacol Res.* 2007;56:65-69.
- Dellaert MM, Casey TA, Wiffen S, et al. Influence of topical human epidermal growth factor on postkeratoplasty re-epithelialisation. *Br J Ophthalmol.* 1997;81:391-395.
- Gordon JE, Johnson P, Musch DC. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects of the corneal epithelium. Chiron Vision Fibronectin Study Group. *Am J Ophthalmol.* 1995;119:281-287.
- Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res.* 1995; 13:655-663.
- Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum.* 1984;27:459-461.
- Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:390-395.
- Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology.* 1999;106:1984-1989.
- Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea.* 2001;20:807-810.
- Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eye and epithelial defects: clinical and *in vitro* toxicity studies. *Br J Ophthalmol.* 2001; 85:1188-1197.
- Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology.* 2004;111:1115-1120.
- López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, et al. Use of autologous serum in ophthalmic practice. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2007;82:9-20.
- Hartwig D, Harloff S, Liu L, Schlenke P, Wedel T, Geerling G. Epitheliotropic 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;44:1724-1731.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmussen L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009;27:158-167.
- Vajpayee RB, Mukerji N, Tandon R, et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol.* 2003;87:1312-1316.
- Eppley BL, Woodell JE, Higgins J. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 2004;114:1502-1508.
- Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:2438-2444.
- Everts PA, Brown Mahoney C, Hoffmann JJ, et al. Platelet-rich plasma preparation using three devices: implications for platelet activation and platelet growth factor release. *Growth Factors.* 2006;24:165-171.
- Alio JL, Colecha JR, Pastor S, Rodriguez A, Artola A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* 2007;39:124-129.
- Lawson JH. The clinical use and immunologic impact of thrombin in surgery. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32(suppl 1):98-110.
- 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;14:529-535.
- Anitua E, Andía I, Sánchez M, et al. Autologous preparation rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthopaedic Res.* 2005;23:281-286.
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Etxebarria J, Durán JA. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea.* 2010;29:843-848.



29. López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Grau AE, Durán JA. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea*. 2011;30:1312-1317.
30. Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:614-621.
31. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3:RESEARCH0034.
32. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *J Trauma*. 1996;41:159-167.
33. Giannobile WV. Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*. 1996;19(suppl 1):23S-37S.
34. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*. 1997;55:1294-1299.
35. Dugrillon A, Eichler H, Kern S, Klüter H. Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002;31:615-619.
36. Trindade-Suedam IK, Leite FR, de Moraes JA, Leite ER, Marcantonio EJ, Leite AA. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *J Oral Implantol*. 2007;33:334-339.
37. Anitua A, Sanchez M, Zalduendo MM, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif*. 2009;42:162-170.
38. Kitazawa T, Kinoshita S, Fujita K, et al. The mechanism of accelerated corneal epithelial healing by human epidermal growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1990;31:1773-1778.
39. Rodeck U, Jost M, Kari C, et al. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci*. 1997;110 (Pt 2):113-121.
40. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, et al. Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg*. 2007;119:950-959.
41. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*. 2003;33:381-394.
42. Stepp MA, Spurr-Michaud S, Gipson IK. Integrins in the wounded and unwounded stratified squamous epithelium of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993;34:1829-1844.
43. Ratkay-Traub I, Hopp B, Bor Z, Dux L, Becker DL, Krenacs T. Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp Eye Res*. 2001;73:291-302.
44. Shurman DL, Glazewski L, Gumpert A, Zieske JD, Richard G. In vivo and in vitro expression of connexins in the human corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:1957-1965.
45. Gipson IK. Adhesive mechanisms of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmol Suppl*. 1992;202:13-17.
46. Scott RA, Lauweryns B, Snead DM, Haynes RJ, Mahida Y, Dua HS. E-cadherin distribution and epithelial basement membrane characteristics of the normal human conjunctiva and cornea. *Eye*. 1997;11 (Pt 5):607-612.
47. Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, Nishida T. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2495-2500.
48. Ban Y, Dota A, Cooper LJ, et al. Tight junction-related protein expression and distribution in human corneal epithelium. *Exp Eye Res*. 2003;76:663-669.
49. Kimura K, Teranishi S, Nishida T. Establishment of human corneal epithelial cells stably expressing human connexin43. *Exp Eye Res*. 2010;90:4-9.
50. Chen Z, de Paiva CS, Luo L, Kretzer FL, Pflugfelder SC, Li DQ. Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia. *Stem Cells*. 2004;22:355-366.
51. Micallef L, Belaubre F, Pinon A, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2009;18:143-151.
52. Gibson DE, Bikle DD, Harris J, Goldberg GS. The expression of the gap junctional protein Cx43 is restricted to proliferating and non differentiated normal and transformed keratinocytes. *Exp Dermatol*. 1997;6:167-174.
53. Matic M, Petrov IN, Rosenfeld T, Wolosin JM. Alterations in connexin expression and cell communication in healing corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38:600-609.
54. Nakano Y, Oyamada M, Dai P, Nakagami T, Kinoshita S, Takamatsu T. Connexin43 knockdown accelerates wound healing but inhibits mesenchymal transition after corneal endothelial injury in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:93-104.
55. Schlötzer-Schrehardt U, Kruse FE. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp Eye Res*. 2005;81:247-264.
56. Gipson IK, Spurr-Michaud S, Tisdale A, Elwell J, Stepp MA. Redistribution of the hemidesmosome components alpha 6 beta 4 integrin and bullous pemphigoid antigens during epithelial wound healing. *Exp Cell Res*. 1993;207:86-98.
57. Laux-Fenton WT, Donaldson PJ, Kistler J, Green CR. Connexin expression patterns in the rat cornea: molecular evidence for communication compartments. *Cornea*. 2003;22:457-464.
58. Brissette JL, Kumar NM, Gilula NB, Hall JE, Dotto GP. Switch in gap junction protein expression is associated with selective changes in junctional permeability during keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:6453-6457.

# Corneal Wound Healing Promoted by 3 Blood Derivatives: An In Vitro and In Vivo Comparative Study

Vanesa Freire,\*† Noelia Andollo, PhD,\* Jaime Etxebarria, MD,‡ Raquel Hernández-Moya,\*  
Juan A. Durán, PhD,†§ and María-Celia Morales, PhD‡

**Purpose:** The aim of this study was to compare the effect on corneal wound healing of 3 differently manufactured blood derivatives [autologous serum (AS), platelet-rich plasma, and serum derived from plasma rich in growth factors (s-PRGF)].

**Methods:** Scratch wound-healing assays were performed on rabbit primary corneal epithelial cultures and human corneal epithelial cells. Additionally, mechanical debridement of rabbit corneal epithelium was performed. Wound-healing progression was assessed by measuring the denuded areas remaining over time after treatment with each of the 3 blood derivatives or a control treatment.

**Results:** In vitro data show statistically significant differences in the healing process with all the derivatives compared with the control, but 2 of them (AS and s-PRGF) induced markedly faster wound healing. In contrast, although the mean time required to complete in vivo reepithelization was similar to that of AS and s-PRGF treatment, only wounds treated with s-PRGF were significantly smaller in size from 2.5 days onward with respect to the control treatment.

**Conclusions:** All 3 blood derivatives studied are promoters of corneal reepithelization. However, the corneal wound-healing progresses differently with each derivative, being faster in vitro under AS and s-PRGF treatment and producing in vivo the greatest decrease in wound size under s-PRGF treatment. These findings highlight that the manufacturing process of the blood derivatives may modulate the efficacy of the final product.

**Key Words:** wound healing, reepithelization, blood derivatives, cell migration

(*Cornea* 2014;0:1–7)

Corneal epithelial integrity is a critical requirement for normal visual function. After an injury, ocular surface health is altered and corneal epithelial disorders can appear.<sup>1</sup> Corneal epithelial wound healing is a complex mechanism that involves cell proliferation, migration, reattachment of the epithelium to its extracellular matrix, and cell differentiation.<sup>2</sup> These processes are sustained by glucose, vitamins, and growth factors.<sup>3</sup> In the cornea, because of its avascular nature, these requirements are provided by tear film, aqueous humor, and limbal blood vessels.<sup>4,5</sup> It has been observed that natural tears and serum have similar pH, osmolarity, and biomechanical properties,<sup>6</sup> as well as adhesion proteins, proteases, antimicrobial proteins, cytokines, lipids, vitamins, and growth factors.<sup>7</sup> In fact, alpha granules of platelets have been identified as a major source of these growth factors,<sup>8</sup> which have significant potential to repair and regenerate damaged tissue.<sup>9</sup> All these common features between serum and tear film have consolidated the role of serum derivatives as tear film substitutes and promoters of corneal wound healing.

Several different blood derivatives have been used for the treatment of various corneal ophthalmological disorders.<sup>7–16</sup> Our group originally adapted a plasma preparation, which was first used in maxillofacial surgery and trauma,<sup>17</sup> to produce serum derived from plasma rich in growth factors (s-PRGF). Then, we applied s-PRGF eye drops as a novel treatment of persistent epithelial defects<sup>15</sup> and dry eye syndrome.<sup>16</sup> More recently, we have adapted the methodology to obtain s-PRGF to be used for the first time in a rabbit animal model<sup>18</sup> as a step toward translation of the technology from research to clinical practice.

There is no standardized protocol for the clinical use of blood-derived preparations. In addition, there have been very few in vivo studies comparing their efficacy.<sup>19</sup> Thus, the aim of this study was to explore whether the formulation of blood derivatives influences their efficacy as treatment of corneal wounds. To that end, we have compared the effects of s-PRGF preparation with other previously used blood derivatives, autologous serum (AS) and platelet-rich plasma (PRP), in cultures of rabbit and human corneal epithelial (HCE) cells and, as a further step, in an in vivo model of rabbit corneal epithelial wound healing.

Received for publication November 10, 2013; revision received February 8, 2014; accepted February 9, 2014.

From the \*Department of Cell Biology and Histology, School of Medicine and Dentistry, BioCruces Health Research Institute, University of the Basque Country, Leioa, Spain; †Department of R&D, Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Bilbao, Spain; ‡BioCruces Health Research Institute, Cruces University Hospital, Barakaldo, Spain; and §Department of Ophthalmology, School of Medicine and Dentistry, BioCruces Health Research Institute, University of the Basque Country, Leioa, Spain.

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Supported by grants from the University of the Basque Country/Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología (UE09/12), from the Saiotek Program of the Basque Government (S-PE10UN60), and from the University of the Basque Country (UFI11/44). V. Freire was supported by a fellowship from Torres-Quevedo Program.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site ([www.corneajrnl.com](http://www.corneajrnl.com)).

Reprints: María-Celia Morales, BioCruces Health Research Institute, Cruces University Hospital, 48903 Barakaldo, Vizcaya, Spain (e-mail: [celiamoralesgonzalez@gmail.com](mailto:celiamoralesgonzalez@gmail.com)).

Copyright © 2014 by Lippincott Williams & Wilkins

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of Blood Derivatives

Informed consent was obtained from all human volunteers, in accordance with the Declaration of Helsinki. All rabbits were cared for in accordance with the procedures and experimental designs approved by the animal experimentation ethics committee of the University of the Basque Country (UPV/EHU). Blood samples were collected from human volunteers and New Zealand white rabbits. A blood sample from each individual was divided and processed by 3 previously described methods<sup>18,20</sup> to obtain the blood derivatives AS, PRP, and s-PRGF.

For *in vitro* assays, we pooled samples from several individuals. For *in vivo* assays, we used autologous preparations. All preparations were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### Isolation and Expansion of Rabbit Primary Corneal Epithelial Cultures

To obtain rabbit primary corneal epithelial (RPCE) cultures, the central cornea button from 3 New Zealand rabbit eyes was removed, keeping the limbal zone intact. The rings of tissue obtained were digested with 25 IU/mL dispase II (BD Biosciences—Discovery Labware, Bedford, MA) in HBSS (Sigma, St Louis, MO) for 16 hours at  $4^{\circ}\text{C}$ . The epithelial cell sheets were collected, centrifuged, and incubated with 0.5% trypsin–0.2% ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma) for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  to obtain single-cell suspensions. Finally, the cells obtained were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  in DMEM:Ham's F12 (1:1 mix) (Lonza, Verviers, Belgium) with 2 mM L-glutamine (Lonza) and 1% penicillin-streptomycin (Lonza), together with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza). This culture medium was also supplemented with: 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF) (Sigma), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin (Sigma), and 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cholera toxin (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium).

### Human Corneal Epithelial Cell Line Culture

SV-40 immortalized HCE cells were kindly provided by Araki-Sasaki et al.<sup>21</sup> These cells were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  in DMEM:Ham's F12 with 2 mM L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin, together with 10% FBS, 10 ng/mL EGF, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  cholera toxin, and 0.5% DMSO (Sigma).

### In Vitro Scratch Wound Healing Assays

These assays were performed on RPCE and HCE cultures. Cells were seeded at 20,000 cells per well in 96-well plates and left to form monolayers. After that, overnight, the culture medium containing FBS was replaced by a medium with 1% bovine serum albumin. Then, a rounded area in the cell monolayer of each well was scraped off with a pipette tip, and cultures were maintained with culture medium without FBS but containing 50% of one of the blood derivatives (AS, PRP, or s-PRGF) or 1% bovine serum albumin as control. Areas from which cells had been scraped

away were photographed every 12 hours with a phase contrast microscope (Nikon Eclipse TS 100; Nikon, Tokyo, Japan), and images were acquired with the ProgRes CapturePro 2.6 software. The size of the denuded areas was quantified using ImageJ software (developed by Wayne Rasband at the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). The closure rate was described in terms of the mean remaining denuded area  $\pm$  SD in square millimeters. All experiments were performed at least in sextuplicate (6 wells) and repeated in 3 different HCE or RPCE cultures.

### Rabbit Corneal Reepithelization Assays

Sixteen female New Zealand white rabbits were included in the study. Initially, each rabbit underwent surgery in its right eye, and the left eye was operated on 2 to 3 weeks after the right eye had recovered. The surgery was performed under general anesthesia (1 mL/kg of Ketolar 50 mg/mL; Pfizer, Madrid, Spain, and 0.3 mL/kg of Xilagesic 20 mg/mL; Laboratorios Calier SA, Barcelona, Spain). The epithelium inside a 9-mm corneal trephine circular mark was scraped off with an ophthalmic blade.

Postoperatively, until the epithelial closure was complete (maximum of a week), every rabbit was treated with a topical dexamethasone and chloramphenicol ointment (Deicol ophthalmic ointment; Alcon laboratories, Barcelona, Spain) and diclofenac drops (Voltaren drops; Allergan Inc, Irvine, CA), twice a day. In addition, the rabbit eyes were treated topically 4 times a day with one of the treatments under study. For this, rabbits were randomized for each surgical intervention into 1 of the following 4 groups: group (1) 100% AS drops ( $n = 8$ ), group (2) 100% PRP drops ( $n = 8$ ), group (3) 100% s-PRGF drops ( $n = 8$ ), and group (4) artificial tears (Oculotect; Alcon) as the control group ( $n = 8$ ).

Rabbit eyes were photographed with and without fluorescein twice a day. The wounded areas were measured using ImageJ software, and the results were expressed as mean wound area  $\pm$  SD in square millimeters.

### Histochemical Analysis

After both eyes of each animal had been operated on and followed up, the corneas were removed and processed for hematoxylin and eosin staining. Stained sections were observed with a phase contrast microscope (Nikon Eclipse TS 100), and images were acquired with the ProgRes CapturePro 2.6 software. We evaluated the structural integrity and histological characteristics of the cornea, as well as the regeneration of the epithelium and cell infiltration.

### Statistical Analysis

IBM SPSS Statistics 18 software (SPSS, Chicago, IL) was used to calculate mean and SDs and to assess the statistical significance of differences between treatments with the Mann–Whitney  $U$  and  $\chi^2$  tests, as well as a time-dependently multiple comparison with the generalize linear model method.

**TABLE 1.** Closure Over Time of Remaining Denuded Areas in RPCE Cultures Incubated With 50% of Each of the 3 Blood Derivatives

Treatment	Time, h			
	0	12	24	36
AS*	0.63 ± 0.13	0.06† ± 0.07	0.01† ± 0.03	Completely closed†
PRP	0.63 ± 0.13	0.20 ± 0.12	0.10 ± 0.11	0.03† ± 0.08
s-PRGF*	0.63 ± 0.15	0.09† ± 0.13	0.02† ± 0.04	Completely closed†
Control	0.63 ± 0.14	0.32 ± 0.14	0.14 ± 0.12	0.13 ± 0.06

The results are expressed as mean remaining denuded area ± SD in square millimeter.

\*Statistically significant differences with respect to control ( $P \leq 0.01$ ) (time-dependently multiple comparison, generalize linear model method).

†Statistically significant differences with respect to control ( $P \leq 0.05$ ) (Mann–Whitney  $U$  test).

## RESULTS

### In Vitro Scratch Wound-Healing Assays

The wound-healing assays were performed on RPCE and HCE cultures to test the ability of the 3 blood-derived preparations to promote in vitro migration and reepithelization. We found that 2 of the 3 preparations (AS and s-PRGF) notably accelerated the recovery of the monolayer in both RPCE and HCE cultures with respect to that in controls (see Figure, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/ICO/A215>).

When analyzing the closure rate in RPCE cultures, cells treated with AS and s-PRGF covered the denuded areas faster than those receiving the control treatment, with statistically significant differences at all time points (Table 1). In contrast, the closure rate in cultures treated with PRP was relatively similar to that in control cultures. Specifically, the mean remaining denuded area (in square millimeters) in cultures treated with AS and s-PRGF was already very small after 12 hours ( $0.06 \pm 0.09$  and  $0.09 \pm 0.13$  mm<sup>2</sup>, respectively) though the cells did not completely cover the denuded area in the monolayer until 36 hours (Table 1).

As for the percentage of wells in which the defect in the monolayer had completely resolved at 36 hours, this was much higher with AS and s-PRGF (almost 100%) than PRP (60%) or control (20%) treatments (Fig. 1A). However, by

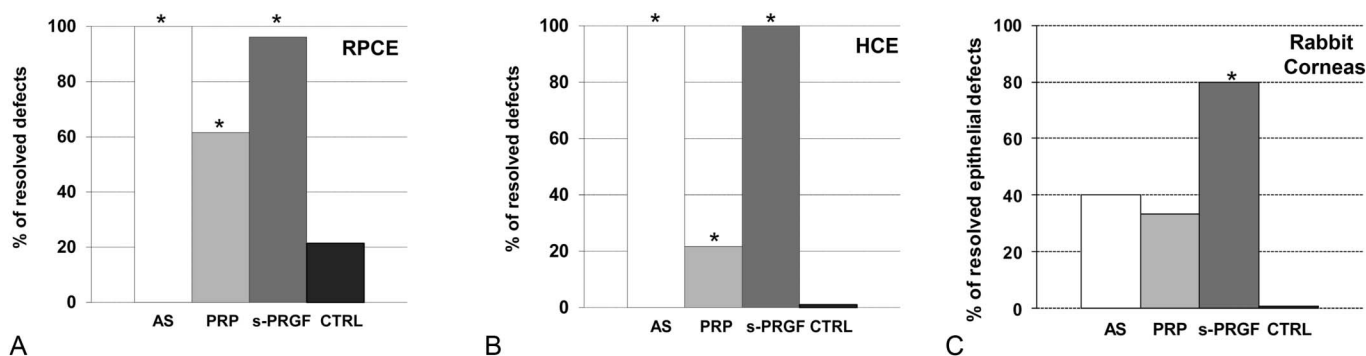
this time point (36 hours), all 3 blood derivatives produced statistically significant differences in the number of wells in which the denuded area had been completely covered compared with the control treatment.

The pattern of the reepithelization process in the HCE cell line was very similar to that in RPCE cultures, but somewhat slower. That is, AS and s-PRGF promoted faster resolution of the defect in the monolayer, but the denuded areas were not all covered until 48 hours (Table 2). Furthermore, in the HCE cultures, we also found statistically significant differences in the mean remaining denuded area (in square millimeters) between cells treated with AS or s-PRGF and control cells. Nevertheless, these differences between treatments were not as marked in the HCE as in RPCE cultures, especially at 12 hours.

With respect to resolution of defects in the HCE cultures by 48 hours, 100% of defects had resolved with AS and s-PRGF treatments and only 20% with PRP, whereas none of the denuded areas had completely closed in control cultures (Fig. 1B).

### In Vivo Corneal Reepithelization Assay in a Rabbit Animal Model

Assays performed on surgically induced epithelial defects confirmed that AS and s-PRGF promoted faster corneal



**FIGURE 1.** Percentage of wells in which the defect in the monolayer had completely resolved in RPCE cultures at 36 hours (A) and HCE cultures at 48 hours (B). By the end of these periods, almost all cell monolayers treated with AS or s-PRGF had recovered. Percentage of resolved epithelial defects in rabbit corneas by 3.5 days after surgery (C). Treatment with s-PRGF resulted in the highest rate of healing of the corneal epithelial defects. \*Statistically significant differences with respect to the control treatment ( $P \leq 0.05$ ) ( $\chi^2$  test).

**TABLE 2.** Closure Over Time of Remaining Denuded Areas in HCE Cultures Incubated With 50% of Each of the 3 Blood Derivatives

Treatment	Time, h				
	0	12	24	36	48
AS*	0.72 ± 0.19	0.43† ± 0.14	0.10† ± 0.11	0.02† ± 0.04	Completely closed†
PRP	0.76 ± 0.23	0.53 ± 0.15	0.34† ± 0.13	0.21† ± 0.12	0.11† ± 0.11
s-PRGF*	0.75 ± 0.22	0.38† ± 0.15	0.10† ± 0.09	0.01† ± 0.03	Completely closed†
Control	0.72 ± 0.12	0.48 ± 0.09	0.39 ± 0.06	0.30 ± 0.07	0.22 ± 0.10

The results are expressed as mean remaining denuded area ± SD in square millimeter.

\*Statistically significant differences with respect to control ( $P \leq 0.01$ ) (time-dependently multiple comparison, generalize linear model method).

†Statistically significant differences with respect to control ( $P \leq 0.05$ ) (Mann–Whitney  $U$  test).

wound healing than PRP and control treatments (Fig. 2; Table 3). Specifically, the mean time to complete closure of the epithelial defect in control and PRP groups was  $4.75 \pm 0.76$  and  $4.42 \pm 0.97$  days, respectively, whereas it was shorter for eyes treated with AS or s-PRGF,  $3.80 \pm 0.27$  and  $3.50 \pm 0.35$  days, respectively.

Analyzing the wound-healing progression, the results showed that all treatments produce a similar initial phase of wound healing, with no statistically significant differences being detected. From the second day onward, however, the wound-healing process was accelerated by AS and s-PRGF compared with PRP and control treatments. Furthermore, although the length of time to complete wound healing was almost the same in AS and s-PRGF treatments, the smallest epithelial defect sizes were measured for s-PRGF at all time points (Table 3). In addition, s-PRGF was the only treatment that produced statistically significant differences in erosion sizes with respect to the control treatment from 2.5 days onward.

Focusing on 3.5 days after surgery, most of the corneal defects under s-PRGF treatment had already reepithelialized, whereas only 35% to 40% of them had healed in the AS and PRP groups (Fig. 1C) and in the control group, none of the

defects had closed by this time. Furthermore, at this time point (3.5 days), s-PRGF was the only treatment with which the percentage of resolved corneal defects was significantly higher than with the control treatment.

No adverse events, such as corneal inflammation or neovascularization, were observed in any eyes in any of the study groups, either during the healing process or after resolution of the epithelial defects (Fig. 2).

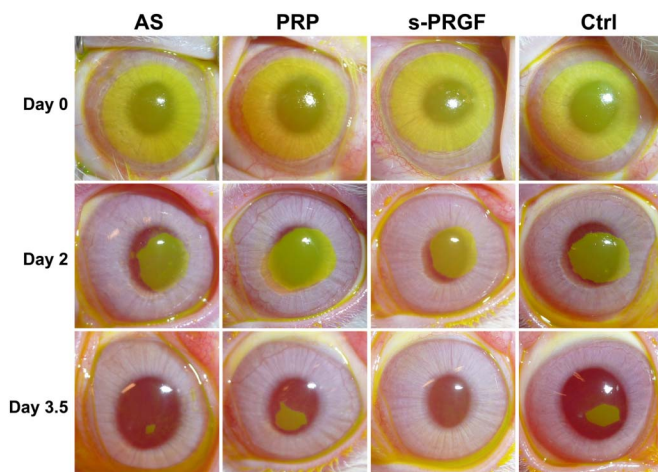
### Histopathology Analysis

By the end of the study, the corneal epithelium had successfully healed in all rabbit eyes. Epithelial regeneration was normal with a multi-stratified, non-keratinized, and well-organized epithelium, with no notable differences between the 4 study groups (see Figure, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/ICO/A216>). Nevertheless, histological sections revealed focal hyperplasia of one or two more layers of epithelial cells in all reepithelialized corneas, regardless of the treatment used compared with the histological sections of a healthy cornea (data not shown).

### DISCUSSION

Corneal epithelial healing involves migration of epithelial cells to cover the denuded wound area, as well as cell proliferation and differentiation.<sup>2</sup> An important determinant of the healing potential of tissues is their ability to increase blood supply through physiological angiogenesis.<sup>2</sup> In the case of corneal injury, topical treatment with blood derivatives is used to compensate for the lack of physiological angiogenesis of this avascular tissue. Blood-derived preparations contain growth factors, cytokines, and other signaling molecules, that are essential for cell turnover in epithelial and stromal tissue in corneal wound healing.<sup>5</sup> Furthermore, these molecules may suppress inflammation in the case of impairment of epithelialization and also have antimicrobial effects.<sup>22</sup>

In this context, this study sets out to determine, both in vitro and in vivo, the influence of the manufacturing of 3 blood derivatives on their efficacy to promote corneal epithelial healing. The main differences in the production of these preparations include the activation of the coagulation process and the presence or absence of leukocytes during coagulation. In the case of AS and s-PRGF, coagulation involves the activation of platelets, which release large



**FIGURE 2.** Evolution of the epithelial defect monitored with fluorescein staining in rabbit eyes treated with each of the 3 blood derivatives or artificial tears. The images illustrate that treatment with s-PRGF resulted in the fastest complete corneal reepithelialization.

**TABLE 3.** Wound Healing Progression in Rabbit Eyes Treated With 100% of Each of the 3 Blood Derivatives or Artificial Tears

Treatment	Time, d					
	0	2	2.5	3	3.5	4
AS	73.65 ± 4.08	16.87 ± 2.89	9.07 ± 3.74	2.26* ± 1.36	0.45 ± 0.49	Completely closed*
PRP	73.33 ± 3.31	17.89 ± 6.49	11.89 ± 5.24	4.25 ± 3.31	2.59 ± 2.17	1.24 ± 0.80
s-PRGF†	73.58 ± 2.33	17.02 ± 1.82	7.78* ± 2.39	0.82* ± 1.02	0.03* ± 0.08	Completely closed*
Control	73.50 ± 2.36	18.23 ± 3.86	11.04 ± 2.77	6.09 ± 3.66	3.05 ± 2.38	1.76 ± 2.52

The results are expressed as mean wound area ± SD in square millimeter.

\*Statistically significant differences with respect to control ( $P \leq 0.05$ ) (Mann–Whitney  $U$  test).

†Statistically significant differences with respect to control ( $P \leq 0.05$ ) (time-dependently multiple comparison, generalize linear model method).

amounts of growth factors. However, the coagulation process in AS occurs spontaneously and in the presence of leukocytes; whereas in s-PRGF, coagulation is induced after the elimination of leukocytes and red cells. This is a controversial topic,<sup>23,24</sup> with some authors asserting that the presence of leukocytes can be highly beneficial because of their antimicrobial properties<sup>25,26</sup>; whereas others suggest that leukocytes should be avoided to prevent proinflammatory effects.<sup>27–29</sup> Unlike in AS and s-PRGF, coagulation does not occur in the production of PRP. Platelets are neither activated nor removed. Some authors claim that the coagulation process in PRP is activated in the site of application, which results in a slower release of growth factors.<sup>22</sup>

In wound healing, epithelial cells distal to the wound area are stimulated to migrate toward the wound to restore corneal epithelial function.<sup>30</sup> In vitro scratch wound-healing assays are usually used to determine the migration ability of cultured cells under given treatments.<sup>31–33</sup> Our analysis using rabbit primary cultures and a human cell line indicates that all of the 3 blood derivatives studied significantly improve the migratory ability of cells compared with that in controls. However, AS and s-PRGF induce markedly faster wound healing. The capability of blood derivatives to improve cell migration has been associated with their high content of fibronectin.<sup>34,35</sup> In a previous study,<sup>20</sup> we quantified higher concentrations of fibronectin in these 3 blood derivatives (see Table, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/ICO/A217>) in comparison with preparations used by other authors.<sup>12</sup> Furthermore, some authors suggest that in the presence of fibronectin, platelet-derived growth factor stimulates the migration of corneal epithelial cells in corneal wound healing.<sup>5</sup> Another factor that can affect cell migration involves connexin 43 (Cx-43), a component of gap junctions. Lower expression of Cx-43 has been related to a greater ability of cells to migrate.<sup>36</sup> Consistent with this, we observed in a previous study<sup>20</sup> a lower level of expression of Cx-43 in cells treated with any of the 3 blood derivatives with respect to those under the control treatment, and furthermore, in this study, a greater ability to migrate in cells under those same treatments.

Because a high content of fibronectin and platelet-derived growth factor and lower Cx-43 expression are detected with all the 3 blood derivatives, these factors do not seem to be responsible for the greater migratory ability of cells treated with AS or s-PRGF with respect to those given

PRP or the control treatment. This discrepant behavior could be explained by other biochemical differences between the blood derivatives, such as EGF content. It has been described that EGF has an important role in epithelial cell proliferation and enhances migration by promoting actin filament rearrangement.<sup>37</sup> Furthermore, high levels of the EGF receptor have been found to be expressed in cells migrating over wounds.<sup>38</sup> Thus, previously quantified concentrations of EGF (see Table, Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/ICO/A217>) being higher in AS and s-PRGF than in PRP could explain not only the faster proliferation rate in HCE cells<sup>20</sup> but also the greater migratory ability of cells in RPCE and HCE cultures. Furthermore, the lowest concentrations of EGF and weakest effect on corneal epithelial cell growth and migration were observed with PRP, in which platelet activation has not occurred. These results agree with data previously published.<sup>31</sup>

Although in vitro culture systems are useful tools to simulate in vivo situations, they are simplified environments, which cannot reproduce the complex physiological and molecular interactions between tear film and the ocular surface.<sup>37</sup> Probably for this reason, we found that though AS and s-PRGF behave similarly in vitro, there are differences in their effect in vivo. In rabbit corneas, although the mean time to complete reepithelization was similar with AS and s-PRGF treatments, most of the rabbit defects (80%) in the s-PRGF group were already reepithelialized by 3.5 days after surgery, whereas only less than half (40%) were in the AS group. In addition, s-PRGF formulation is the only treatment with which from 2.5 days onward, the wound size was significantly smaller than in eyes receiving only the unpreserved tear substitute. It should be underlined that a decrease in the size of epithelial defects is usually associated with reductions in the risk of infection, as well as in patient pain and discomfort. Furthermore, it has been suggested that prolonged episodes of corneal deepithelization may lead to increased production of collagenases in the corneal stroma, and in turn to corneal perforation.<sup>39</sup>

The concentrations and frequency of administration of blood derivatives may influence the wound-healing process.<sup>37</sup> Several studies have reported the effectiveness of undiluted concentrations of blood derivatives in the epithelial healing process of mechanical corneal wounds<sup>2,18,40</sup> and corneal alkali burns,<sup>41</sup> whereas other studies have shown no significant effects when using 20% dilutions.<sup>18,42</sup> For this reason, we



used undiluted concentrations of blood derivatives in our *in vivo* experiments, which were applied 4 times a day. Unfortunately, there have been few *in vivo* trials comparing the dosage and efficacy of different blood derivatives, which makes this an interesting area for further investigation.

To sum up, we have seen that all 3 blood derivatives studied (AS, PRP, and s-PRGF) are promoters of corneal epithelization. However, some of our previous<sup>20</sup> and present results taken together support the view that the manufacturing process of blood derivatives leads to variations in the concentrations of certain molecules and, therefore, strongly influences the efficacy of these preparations in corneal wound healing. Notably, both AS and s-PRGF promote faster wound healing *in vitro*. However, the latter, the derivative with the highest content in EGF, induces considerably earlier reepithelization of *in vivo* corneal wounds, and hence it could even be effective in diminishing the risk of infection and increasing patient comfort. We believe that it would be interesting to confirm the outcomes of this study in a clinical trial comparing the effect of different blood derivatives.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank SGIker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, and ESF) for providing technical support.

## REFERENCES

- Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*. 1997;124:825–835.
- Akyol-Salman I. Effects of autologous serum eye drops on corneal wound healing after superficial keratectomy in rabbits. *Cornea*. 2006;25:1178–1181.
- Wilson SE, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF, and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2185–2190.
- Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. Philadelphia, PA: Elsevier Mosby; 2005:3–26.
- Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. *Ocul Surf*. 2007;5:228–239.
- Fox RI, Chan R, Michelson JB, et al. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum*. 1984;27:459–461.
- Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol*. 1999;83:390–395.
- Hartwig D, Harloff S, Liu L, et al. Epitheliotropic 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;44:1724–1731.
- Geremicca W, Fonte C, Vecchio S. Blood components for topical use in tissue regeneration: evaluation of corneal lesions treated with platelet lysate and considerations on repair mechanisms. *Blood Transfus*. 2010;8:107–112.
- Chen YM, Hu FR, Huang JY, et al. The effect of topical autologous serum on graft re-epithelialization after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol*. 2010;150:352–359.e2.
- López-García JS, Rivas L, García-Lozano I, et al. Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy. *Ophthalmology*. 2008;115:262–267.
- Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2438–2444.
- Yoon KC, Choi W, You IC, et al. Application of umbilical cord serum eyedrops for recurrent corneal erosions. *Cornea*. 2011;30:744–748.
- Alio JL, Abad M, Artola A, et al. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology*. 2007;114:1286–1293.e1.
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, et al. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 2010;29:843–848.
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, et al. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea*. 2011;30:1312–1317.
- Anitua E, Tejero R, Alkhraisat MH, et al. Platelet-rich plasma to improve the bio-functionality of biomaterials. *BioDrugs*. 2013;27:97–111.
- Etxebarria J, Hernández-Moya R, Freire V, et al. Behaviour of serum derived from PRGF in corneal wound healing in the rabbit model. In press.
- Yoon KC, Heo H, Im SK, et al. Comparison of autologous serum and umbilical cord serum eye drops for dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol*. 2007;144:86–92.
- Freire V, Andollo N, Etxebarria J, et al. *In vitro* effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:5571–5578.
- Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36:614–621.
- Alio JL, Amalich-Montiel F, Rodríguez AE. The role of “eye platelet rich plasma” (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1257–1265.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27:158–167.
- Dohan Ehrenfest DM. Shedding light in the controversial terminology for platelet-rich products: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), platelet-leukocyte gel (PLG), preparation rich in growth factors (PRGF), classification and commercialism. *J Biomed Mater Res A*. 2010;95:1280–1282. doi: 10.1002/jbm.a.32894.
- Cieslik-Bielecka A, Gazdzik TS, Bielecki TM, et al. Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:303–305; author reply 305–306.
- Moojen DJ, Everts PA, Schure RM, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res*. 2008;26:404–410.
- Trindade-Suedam IK, Leite FR, de Moraes JA, et al. Avoiding leukocyte contamination and early platelet activation in platelet-rich plasma. *J Oral Implantol*. 2007;33:334–339.
- Anitua E, Alonso R, Girbau C, et al. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoreg®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37:652–657.
- Anitua E, Zalduendo MM, Alkhraisat MH, et al. Release kinetics of platelet-derived and plasma-derived growth factors from autologous plasma rich in growth factors. *Ann Anat*. 2013;195:461–466. doi: 10.1016/j.aanat.2013.04.004.
- Zieske JD, Gipson IK. Agents that affect corneal wound healing: modulation of structure and function. In: Albert DM, Jakobiec FA, eds. *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 1994:1093–1099.
- Burmeister SL, Hartwig D, Limb GA, et al. Effect of various platelet preparations on retinal muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:4881–4886.
- Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc*. 2007;2:329–333.
- Movahedan A, Majidi M, Afsharkhamseh N, et al. Notch inhibition during corneal epithelial wound healing promotes migration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7476–7483.
- Fukuda M, Fullard RJ, Willcox MD, et al. Fibronectin in the tear film. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:459–467.
- Nishida T. Translational research in corneal epithelial wound healing. *Eye Contact Lens*. 2010;36:300–304.
- Suzuki K, Tanaka T, Enoki M, et al. Coordinated reassembly of the basement membrane and junctional proteins during corneal epithelial wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41:2495–2500.
- Shen EP, Hu FR, Lo SC, et al. Comparison of corneal epitheliotropic capacity among different human blood-derived preparations. *Cornea*. 2011;30:208–214.

38. Ratkay-Traub I, Hopp B, Bor Z, et al. Regeneration of rabbit cornea following excimer laser photorefractive keratectomy: a study on gap junctions, epithelial junctions and epidermal growth factor receptor expression in correlation with cell proliferation. *Exp Eye Res.* 2001;73:291–302.
39. Marquez De Aracena Del Cid R, Montero De Espinosa Escoriaza I. Subconjunctival application of regenerative factor-rich plasma for the treatment of ocular alkali burns. *Eur J Ophthalmol.* 2009;19:909–915.
40. Tanidir ST, Yuksel N, Altintas O, et al. The effect of subconjunctival platelet-rich plasma on corneal epithelial wound healing. *Cornea.* 2010;29:664–669.
41. Salman IA, Gündoğdu C. Epithelial healing in experimental corneal alkali wounds with nondiluted autologous serum eye drops. *Cutan Ocul Toxicol.* 2010;29:116–121.
42. Shahriari HA, Tokhmehchi F, Reza M, et al. Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea.* 2008;27:1148–1150.