

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO – FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR**

**EL PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO COMO
ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN EL OJO SECO Y DEFECTOS
EPITELIALES PERSISTENTES**

Trabajo de investigación presentado por **SILVIA LÓPEZ-PLANDOLIT ANTOLÍN** en la Facultad de Medicina de la Universidad del País Vasco, para la obtención del **GRADO DE DOCTOR** en Medicina y Cirugía.

Bilbao, 2015

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero dar las gracias a toda mi familia, especialmente a mi marido y a mi padre. A Juan, mi marido, por su comprensión con todo el tiempo que he dedicado a esta Tesis. A mi padre, por su gran ayuda y motivación durante todo el procesamiento informático de los datos.

Por supuesto, a mis directores de Tesis: Juan y Celia. Gracias por vuestra dedicación y generosidad y por contagiarme vuestro carácter crítico y perfeccionista, que espero haya quedado reflejado a lo largo del trabajo.

A Jose Ignacio Pijoan, por su inestimable colaboración con el análisis estadístico de los datos obtenidos.

A todo el personal del Instituto Clínico Quirúrgico Oftalmológico: Vanesa y Ainhoa (Laboratorio e I+D), ópticos, enfermeras y demás compañeros.

En definitiva, gracias a los que de una forma u otra me habéis permitido llevar a cabo este proyecto.

FINANCIACIÓN

Trabajo de investigación realizado con el apoyo económico de:

- Fundación Jesús Gangoiti Barrera, a través de 2 becas concedidas en 2006 y 2008 (prolongación de la inicial) para el estudio de “Aplicación del tratamiento con plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) en los defectos epiteliales persistentes” con Silvia López-Plandolit, Juan A. Durán y Celia Morales como autores.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	1
1.1	JUSTIFICACIÓN	3
1.2	HIPÓTESIS	5
1.3	OBJETIVOS	5
1.3.1	Objetivos principales	5
1.3.2	Objetivos secundarios	5
2.	INTRODUCCIÓN	7
2.1	PRGF: CONCEPTO Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS	9
2.1.1	Antecedentes históricos de los preparados ricos en plaquetas	9
2.1.2	La plaqueta	10
2.1.2.1	Estructura	11
2.1.2.2	Activación	14
2.1.2.3	Funciones	14
2.2	PROPIEDADES Y EFECTOS BIOLÓGICOS DEL PRGF	18
2.2.1	Propiedades del PRGF.	18
2.2.1.1	Liberación sostenida de factores de crecimiento.	18
2.2.1.2	Ausencia de leucocitos.	19
2.2.1.3	Propiedades antiinflamatorias y bacteriostáticas.	19
2.2.2	Efectos biológicos del PRGF.	19
2.2.2.1	Eficacia in vitro.	19
2.2.2.2	Eficacia in vivo.	22
2.3	DIFERENCIAS ENTRE EL PRGF Y OTROS PREPARADOS RICOS EN PLAQUETAS	24
2.4	DIFERENCIAS ENTRE EL PRGF Y OTROS DERIVADOS HEMATOLÓGICOS EMPLEADOS EN OFTALMOLOGÍA.	29
2.4.1	Suero autólogo.	29
2.4.2	Suero de cordón umbilical.	31
2.5	EMPLEO DEL PRGF EN MEDICINA	32
2.5.1	Odontología y cirugía maxilofacial	32
2.5.2	Traumatología, Ortopedia y Medicina del deporte.	32
2.5.3	Dermatología.	32

2.5.4	Cirugía Estética.	32
2.5.5	Oftalmología.	32
2.6	UTILIZACIÓN DEL PRGF EN OFTALMOLOGÍA	33
2.6.1	Anatomía y propiedades de la córnea.	33
2.6.2	Mecanismos de reparación y regeneración corneales: papel de los factores de crecimiento.	37
2.6.3	Relevancia de la lágrima en la homeostasis y reparación de la superficie ocular.	45
2.6.4	Posibles indicaciones oftalmológicas del PRGF: los defectos epiteliales persistentes y el ojo seco.	47
2.6.4.1	Defecto epitelial persistente (DEP).	47
2.6.4.2	Síndrome de ojo seco.	49
3.	MATERIAL Y MÉTODOS	61
3.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	63
3.2	SELECCIÓN DE PACIENTES	64
3.2.1	Selección de pacientes con ojo seco	64
3.2.2	Selección de pacientes con defectos epiteliales persistentes (DEP)	68
3.3	PARÁMETROS DE EVALUACIÓN CLÍNICA.	71
3.3.1	Grupo de ojo seco	71
3.3.1.1	Síntomas.	71
3.3.1.2	Tinción verde lisamina	73
3.3.1.3	Test de Schirmer	74
3.3.1.4	Citología de impresión.	74
3.3.1.5	Parámetros relacionados con la dispensación del PRGF	77
3.3.2	Grupo de defectos epiteliales persistentes	77
3.3.2.1	Tiempo hasta la cicatrización.	77
3.3.2.2	Sensibilidad corneal.	77
3.3.2.3	Necesidad de tratamientos asociados.	77
3.3.2.4	Parámetros relacionados con la dispensación del PRGF.	77
3.4	PROTOCOLO PARA LA ELABORACIÓN DEL PRGF	78
3.4.1	Preparación del paciente	78
3.4.2	Material requerido	78
3.4.3	Recogida de la muestra y centrifugación	79
3.4.4	Fraccionamiento del plasma	81
3.4.5	Activación del plasma	82

3.4.6	Adaptación de la tecnología PRGF al ámbito oftalmológico	83
3.4.7	Concentración	84
3.4.8	Posología	85
3.5	CARACTERIZACIÓN DEL PRGF	86
3.5.1	PH	86
3.5.2	Osmolaridad	86
3.5.3	Factores de crecimiento y albúmina.	86
3.6	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	88
4.	RESULTADOS	89
4.1	GRUPO OJO SECO	91
4.1.1	Síntomas.	91
4.1.2	Tinción verde lisamina.	92
4.1.3	Test de Schirmer con anestesia.	92
4.1.4	Citología de impresión.	93
4.1.5	Factores relacionados con el tratamiento.	93
4.1.6	Relación entre síntomas y diagnóstico.	94
4.1.7	Relación entre síntomas y edad.	95
4.1.8	Relación entre síntomas y sexo.	96
4.1.9	Relación entre síntomas y tinción verde lisamina.	97
4.1.10	Relación entre síntomas y test de Schirmer con anestesia.	98
4.1.11	Relación entre síntomas y citología de impresión.	98
4.1.12	Relación entre la mejoría y concentración del PRGF.	101
4.2	GRUPO DEFECTOS EPITELIALES PERSISTENTES (DEP)	102
4.2.1	Tasa y tiempo de cicatrización.	102
4.2.2	Tratamientos asociados.	103
4.2.3	Sensibilidad corneal.	105
4.2.4	Factores relacionados con el tratamiento.	105
4.2.5	Relación tiempo de cicatrización y diagnóstico.	106
4.2.6	Relación tiempo de cicatrización y pauta de tratamiento.	107
4.2.7	Relación entre factores de crecimiento y tasa y tiempo de cicatrización.	108
4.3	CARACTERIZACIÓN DEL PRGF	111
4.3.1	pH.	111

4.3.2	Osmolaridad.	113
4.3.3	Factores de crecimiento y albúmina.	115
4.4	ANEXO: Imágenes	121
5.	DISCUSIÓN	133
5.1	DISEÑO DEL ESTUDIO	135
5.2	CARACTERIZACIÓN DEL PRGF	137
5.3	EFICACIA DEL PRGF EN EL OJO SECO	141
5.4	EFICACIA DEL PRGF EN LOS DEP	147
5.5	SEGURIDAD Y TOLERANCIA	151
5.6	APLICABILIDAD CLÍNICA Y PERSPECTIVAS FUTURAS	152
6.	CONCLUSIONES	155
7.	DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	159
8.	BIBLIOGRAFÍA	175

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Contenido de los gránulos α de las plaquetas.	13
Tabla 2	Acciones de algunos de los principales GF de los gránulos α .	17
Tabla 3	Distintos protocolos PRP descritos y su comparación con el protocolo PRGF.	25
Tabla 4	Principales componentes del suero autólogo.	30
Tabla 5	Principales GF implicados en la cicatrización corneal.	45
Tabla 6	Composición físico-química de la lágrima.	46
Tabla 7	Criterios para la clasificación del síndrome de Sjögren.	51
Tabla 8	Clasificación del OSAD no SS en los distintos subgrupos de los que se compone.	52
Tabla 9	Escala de la gravedad del síndrome de ojo seco.	58
Tabla 10	Características del grupo de ojo seco: edad, sexo, diagnóstico y tratamientos previos recibidos.	68
Tabla 11	Características del grupo DEP: edad, sexo, diagnóstico y tratamientos previos recibidos.	71
Tabla 12	Cuestionario SIDEQ modificado.	72
Tabla 13	Graduación de la metaplasia escamosa de la superficie ocular junto con los cambios en las células epiteliales conjuntivales correspondientes. (Oroza 2000)	76
Tabla 14	Relación porcentual de la evolución sintomática de los pacientes según el subgrupo diagnóstico de ojo seco.	94
Tabla 15	Relación porcentual de la evolución sintomática de los pacientes según su edad (grupo ≤ 50 y grupo >50).	95
Tabla 16	Relación porcentual entre el grado de mejoría de síntomas y el sexo.	97
Tabla 17	Relación porcentual entre la evolución sintomática y la mejoría en la tinción verde lisamina.	97
Tabla 18	Relación porcentual entre la evolución sintomática y la mejoría en el test de Schirmer con anestesia (test de Jones).	98
Tabla 19	Puntuaciones individuales del cuestionario y citología de impresión previos y posteriores al tratamiento.	99
Tabla 20	Relación porcentual entre la evolución sintomática y la mejoría en el grado de metaplasia escamosa.	100
Tabla 21	Tabla resumen de la pauta (concentración) de PRGF empleada, la eficacia (cierre del DEP) y los tratamientos empleados en cada caso.	105
Tabla 22	Mediciones de pH del preparado de colirio de PRGF a distintas concentraciones.	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Componentes estructurales de la plaqueta.	12
Figura 2 Histología de la córnea.	35
Figura 3 Esquema y cronología de las fases de cicatrización corneal epitelial y estromal.	40
Figura 4 Modulación de la cicatrización corneal. Papel y origen de algunos de los principales GF, citocinas y proteasas.	41
Figura 5 Fisiopatología del síndrome de ojo seco.	54
Figura 6 Esquema de los tratamientos recomendados por el taller internacional de ojo seco para cada uno de los niveles de severidad del ojo seco.	59
Figura 7 Distribución porcentual de la muestra según la etiopatogenia del ojo seco.	65
Figura 8 Distribución porcentual de la muestra según la etiopatogenia del defecto epitelial persistente.	69
Figura 9 Escala de Van Bijsterveld para la graduación de la tinción de la superficie ocular con verde lisamina/Rosa de bengala.	74
Figura 10 Kit monouso Traumatológico.	79
Figura 11 Separación de la muestra sanguínea en sus tres componentes.	80
Figura 12 Tubos con coloración amarillenta traslúcida típica (a la izquierda) y tubos rojos	81
Figura 13 Procedimiento de aspiración de la F2 del plasma correspondiente a dos tubos (tubos 1 y 2) y disposición de la misma en un único tubo de fragmentación.	82
Figura 14 Imágenes correspondientes al coágulo del PRGF activado.	83
Figura 15 Proceso de elaboración del colirio de PRGF.	85
Figura 16 Evolución sintomática de los pacientes tras el tratamiento con colirio de PRGF.	91
Figura 17 Promedio de la puntuación en el cuestionario SiDEQ previa y	92
Figura 18 Promedio de la puntuación en la tinción verde lisamina (escala de van Bijsterveld) previa y posterior al tratamiento.	92
Figura 19 Promedio de la puntuación en el test de Schirmer con anestesia previa y posterior al tratamiento.	93
Figura 20 Promedio del grado de metaplasia escamosa pre y postratamiento.	93
Figura 21 Distribución del grado de respuesta en términos subjetivos de los pacientes en función de su edad.	96
Figura 22 Gráfico que muestra la relación entre la severidad de los síntomas y el grado de metaplasia escamosa en la citología de impresión previos al tratamiento con PRGF	99
Figura 23 Gráfico que muestra la relación entre la mejoría de los síntomas y la mejoría en la citología de impresión.	100
Figura 24 Cambio en el test de Jones tras tratamiento con PRGF al 20% y 100%.	102
Figura 25 Promedio de duración (semanas) de los DEPs pre y post-tratamiento con PRGF.	103
Figura 26 Distribución porcentual de la asociación o no del PRGF a otros tratamientos.	103

Figura 27 Relación entre el tiempo de cierre del DEP y el diagnóstico etiopatogénico.	106
Figura 28 Relación entre la concentración de PRGF y el tiempo de cierre del DEP.	108
Figura 29 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el EGF.	109
Figura 30 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el FGF.	109
Figura 31 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el HGF.	110
Figura 32 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el NGF.	110
Figura 33 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el PDGF.	111
Figura 34 Medición del pH en las muestras de colirio de PRGF al 20%.	112
Figura 35 Medición de pH en las muestras de colirio de PRGF al 50%.	112
Figura 36 Medición de pH en las muestras de colirio de PRGF al 100%.	113
Figura 37 Osmolaridad del colirio de PRGF al 20%.	114
Figura 38 Osmolaridad del colirio de PRGF al 20%.	114
Figura 39 Osmolaridad del colirio de PRGF al 100%.	115
Figura 40 Concentración de EGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	116
Figura 41 Concentración de FGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	116
Figura 42 Concentración de HGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	117
Figura 43 Concentración de NGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	118
Figura 44 Concentración de PDGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	118
Figura 45 Concentración de VEGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	119
Figura 46 Concentración de TGF- β 1 (pg/ml) en el PRGF sin diluir.	119
Figura 47 Concentración de albúmina (g/dl) en el PRGF sin diluir.	120

ABREVIATURAS

ACAID:	desvío inmunitario asociada a la cámara anterior.
ATB:	antibiótico.
CEC:	células epiteliales corneales.
CTGF:	factor de crecimiento de tejido conectivo.
C:	corticoides.
Cp:	ciclopléjico.
Cs:	ciclosporina.
Cx:	cirugía.
DEP:	defecto epitelial persistente.
DEWS:	dry eye workshop (taller sobre ojo seco).
DGM:	disfunción de glándulas de Meibomio.
EGF:	factor de crecimiento epidérmico.
F1:	fracción 1 del plasma rico en factores de crecimiento.
F2:	fracción 2 del plasma rico en factores de crecimiento.
F3:	fracción 3 del plasma rico en factores de crecimiento.
FGF:	factor de crecimiento fibroblástico.
GF:	factor de crecimiento.
HB-EGF:	Factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina.
HGF:	factor de crecimiento hepatocítico.
IGF:	factor de crecimiento insulínico.
IL:	interleucina.
KGF:	factor de crecimiento queratinocítico.
LA:	lágrimas artificiales.
LC:	lente de contacto.
MB:	membrana basal.
MEC:	matriz extracelular.
MMP:	metaloproteasas de matriz.
NGF:	factor de crecimiento nervioso.
oATB:	antibiótico oral.
oAV:	antivírico oral.
OSAD:	síndrome de ojo seco acuodeficiente.
OSAD no SS:	síndrome de ojo seco acuodeficiente no asociado al síndrome de Sjögren.

OSAD SS:	síndrome de ojo seco acuodeficiente asociado al síndrome de Sjögren.
OSE:	Síndrome de ojo seco evaporativo.
OSDI:	Ocular Surface Disease Index (índice de la enfermedad de la superficie ocular).
PAF:	factor activador de las plaquetas.
PCCS:	platelet concentrate collection system (sistema de recolección del concentrado plaquetario).
PDGF:	factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
PF4:	factor plaquetario 4.
PLG:	gel rico en plaquetas y leucocitos.
PRF:	fibrina rica en plaquetas
PRGF:	plasma rico en factores de crecimiento.
PPP:	platelet poor plasma.
PRP:	plasma rico en plaquetas.
PTD:	plasma transfer device (dispositivo para la transferencia del plasma).
SA:	suero autólogo.
SCA:	sistema canalicular abierto.
SiDEQ:	Single-Item Score Dry Eye Questionnaire.
SIgA:	Inmunoglobulina A secretada.
SS:	síndrome de Sjögren.
STD:	sistema tubular denso.
oAV:	antivírico oral.
tAV:	antivírico tópico.
TG-β:	β- tromboglobulina.
TGF-β:	factor de crecimiento transformante β.
TNF-α:	factor de necrosis tumoral α.
TMA:	transplante de membrana amniótica.
VEGF:	factor de crecimiento vascular endotelial.
VL:	verde lisamina.
vWF:	factor de von Willebrand.
WP:	whole plasma.

1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.1 JUSTIFICACIÓN

Recientemente numerosas investigaciones han puesto de manifiesto la relevancia de las plaquetas en los procesos de mantenimiento y regeneración de los tejidos.^{1 2 3 4 5}

Las plaquetas y, más concretamente, sus gránulos α , son consideradas actualmente los reservorios fisiológicos de gran número de mediadores biológicos, entre los que se encuentran factores de crecimiento, proteínas adhesivas, inhibidores de proteasas, factores fibrinolíticos, etc. Su activación en respuesta a la lesión vascular provoca la liberación escalonada de dichos mediadores durante el proceso de formación del coágulo, dotando a las plaquetas, además de una función hemostática, de la función de actuar como sustrato tanto físico como químico para la regeneración del área dañada.^{6 7 8}

Dicho conocimiento ha originado un interés creciente por parte de la comunidad científica por intentar explotar su potencial terapéutico, surgiendo así en la última década distintos preparados hemoderivados ricos en plaquetas, como el plasma rico en plaquetas (PRP), la fibrina rica en plaquetas (PRF), el gel rico en plaquetas y leucocitos (PLG) y, por supuesto el plasma rico en plaquetas (PRGF).^{1 9 10 11 12}

La amplia gama de términos empleados para la denominación de los productos ricos en plaquetas es el reflejo de la diversidad de los protocolos empleados para su elaboración y activación. En consecuencia, cabe esperar, como ya apuntan publicaciones recientes, que el producto final obtenido en cada caso y por tanto, sus efectos biológicos varíen de unos a otros.^{13 14 15}

El PRGF, con un proceso de elaboración minuciosamente estandarizado, posee una serie de características que lo diferencian y, a priori, destacan del resto de productos hemoderivados^{16 17 18} y cuenta, además, con varios años de experiencia clínica satisfactoria en distintas áreas de la medicina, como la cirugía maxilofacial, dermatología y traumatología^{19 20 21 22 23}.

Las propiedades del PRGF, sumadas a su origen autólogo y ausencia en su composición de conservantes y estabilizadores, hacen que dicho preparado plaquetario pueda tener una amplia aplicabilidad también en el campo de la oftalmología.

En este sentido, cabría destacar su potencial utilidad en el tratamiento de aquellas patologías de la superficie ocular en las que existe un incremento en la demanda de factores de crecimiento, como por ejemplo, los defectos epiteliales persistentes (DEP) de diverso origen.

Asimismo, podría ser notablemente beneficioso en el síndrome de ojo seco, en el que la alteración de la película lagrimal, vehículo natural de numerosos mediadores biológicos, produce una situación de desprotección de la superficie ocular y, dependiendo de su intensidad, pondrá en compromiso, en mayor o menor medida, el mantenimiento y regeneración corneo-conjuntival.

La frecuente mala respuesta a los tratamientos disponibles en la práctica clínica es común a ambos grupos de patologías oculares y conlleva un importante despliegue de recursos socio-sanitarios: un incremento en la frecuencia de las consultas, la asociación de procedimientos quirúrgicos e incluso, en ocasiones, un apoyo psicológico y/o social, por la repercusión de todo el proceso en la calidad de vida del paciente.

En definitiva, nuestro estudio surge de la necesidad de encontrar una alternativa terapéutica eficaz en los DEPs y en el síndrome seco no respondedor a los tratamientos convencionales.

Mediante este trabajo pretendemos realizar una primera aproximación a la evaluación de la eficacia, tolerancia y seguridad de la aplicación del PRGF en ambas patologías.

1.2 HIPÓTESIS

“El Plasma Rico en Factores de Crecimiento derivados de las plaquetas (PRGF) es eficaz en el tratamiento de los defectos epiteliales persistentes”.

“El PRGF es eficaz en el alivio sintomático del síndrome de ojo seco y, por lo tanto, tiene un impacto positivo en la calidad de vida de los pacientes afectados del mismo”.

“El PRGF es eficaz en el tratamiento de los signos clínicos derivados del síndrome de ojo seco”.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos principales

1. Evaluar la eficacia del PRGF aplicado como colirio en el tratamiento de un grupo de pacientes con defectos epiteliales persistentes de diversa etiopatogenia.
2. Evaluar la eficacia del PRGF aplicado como colirio en el tratamiento de un grupo de pacientes con ojo seco resistente a tratamientos previos, ya sea por su carácter moderado-severo y/o por ser muy sintomático.

1.3.2 Objetivos secundarios

1. Evaluar la seguridad y tolerancia del PRGF en ambos grupos de pacientes.
2. Caracterizar el PRGF evaluando su osmolaridad y pH y cuantificando la presencia en el mismo de albúmina y de algunos de los principales factores de crecimiento implicados en la homeostasis y regeneración de la superficie ocular.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 PRGF: CONCEPTO Y ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) puede ser definido como un concentrado plaquetario 100% autólogo obtenido a partir de un escaso volumen de sangre por medio de un protocolo de estandarizado en el que destaca la necesidad de un único proceso de centrifugación.

Fue descrito en 1999 por el Dr. Anitua y cols ¹⁰ a través del Instituto de Biotecnología BTI (Vitoria, España) con el objetivo inicial de poder aprovechar al máximo el potencial de las plaquetas para la regeneración ósea en cirugía oral, y en concreto, en la regeneración de los alveolos dentales postextracción. Aunque en sus inicios primaba el interés por crear un vehículo rico en factores plaquetarios que fuera de fácil manejo en el ámbito de la consulta de Implantología dental, con posterioridad se han ido modificando y diversificando sus formulaciones.

Existe por tanto, la posibilidad de aplicar el PRGF en cuatro presentaciones: líquido activado, coágulo, membrana de fibrina y sobrenadante.

A su vez, teniendo en cuenta que existe un gradiente de concentración plaquetaria descendente desde la fracción inferior o F3 hacia la superior o F1, según la o las fracciones que empleemos, la formulación de PRGF resultante será más o menos rica en factores de crecimiento, siendo, de este modo, más adecuada para unos usos u otros.

2.1.1 Antecedentes históricos de los preparados ricos en plaquetas

Las primeras publicaciones de los preparados ricos en plaquetas datan de finales de los años 90 y tienen un antecedente inmediato en el adhesivo de fibrina autógena descrito por Mandel en 1992 ²⁴ y Tayapongsak²⁵ en 1994.

Mandel y cols utilizan un adhesivo de fibrina autólogo para realizar blefaroplastias con una técnica de mínima sutura, y refieren una menor incidencia de complicaciones que con las técnicas de sutura estándar.

Dos años después, Tayapongsak y cols emplean también un adhesivo de fibrina autólogo pero lo hacen asociado a un injerto óseo autógeno para la reconstrucción de los defectos óseos mandibulares en una serie de 33 casos.

A pesar de que inicialmente buscaban con ello obtener beneficios en cuanto a la hemostasia y adhesividad, observaron además una aceleración en el proceso de remodelación y consolidación óseas. Comprobaron así, radiográficamente que la integración del injerto y la regeneración mandibular se reducía de 8 semanas a tan sólo 4.

A raíz de estos hallazgos, surgió un enorme interés en la comunidad científica por explotar las propiedades regenerativas asociadas al adhesivo de fibrina autóloga.

Asistidos por la identificación en el coágulo de la presencia de factores de crecimiento y por la cada vez más detallada comprensión del

almacenamiento y secreción de los mismos por los gránulos α de las plaquetas^{26 27}, distintos grupos de investigadores comienzan a desarrollar los primeros preparados autólogos con concentraciones crecientes en plaquetas y decrecientes en fibrinógeno.

Así, en 1997, Whitman y cols¹¹ describen la preparación de un gel rico en plaquetas y su aplicación en la cirugía reconstructiva maxilofacial, empleándolo asociado a injertos cortico-esponjosos tras técnicas ablativas de los huesos maxilar y mandibular, en perforaciones orales con y sin comunicación nasal y en la elevación sinusal. Obtienen una adecuada consolidación de los injertos al utilizar PRP y refieren además que el gel ofrece ventajas en cuanto a la manipulación de los tejidos blandos durante la cirugía y consigue evitar que estos causen un desplazamiento del injerto.

En 1998, Marx y cols¹ publican un estudio de tipo casos y controles con 88 pacientes, en los que a la mitad les hacían una reconstrucción mandibular con injertos óseos añadiendo PRP y a la otra mitad, sin PRP. Encontraron que los injertos en el grupo de casos presentaban un índice de maduración 1,62 a 2,16 veces superior al del grupo control. El estudio histomorfométrico demostró una mayor densidad ósea en el grupo de casos (74%±11%) que en de controles (55% ±8%).

Observaron además la presencia de PDGF y TGF- β 1 en los concentrados de plaquetas utilizados, y también la presencia de receptores para estos factores en las células esponjosas.

En 1999, Anitua y cols¹⁰ describen un nuevo método para la obtención del plasma rico en plaquetas, denominándolo PRGF y lo emplean en una muestra de 20 pacientes con el objetivo de preparar el lecho para el emplazamiento de implantes dentales postextracción. En el grupo de casos, en el que hacen el tratamiento alveolar en asociación con PRGF, hallan una mayor anchura ósea bucolingual y bucopalatina, una mayor densidad ósea y una mayor cobertura tisular que en los controles.

2.1.2 La plaqueta

El descubrimiento de las plaquetas es atribuido de una forma bastante generalizada en la literatura médica al anatomista alemán Max Schulze en 1865²⁸.

Sin embargo, lo cierto es que éstas ya habían sido observadas dos décadas antes por dos autores: el francés Alfred Donné, quien en 1842 las incluye en su "Atlas de Microscopía"²⁹ y el médico inglés George Gulliver quien, en unas notas fechadas en 1841, las describe como unas "esférulas diminutas de la sangre posiblemente precursoras de la fibrina"³⁰.

Posteriormente y a lo largo del siglo XIX son mencionadas constantemente por distintos autores, así William Addison se refiere a ellas como "moléculas o gránulos diminutos de la sangre", Gustav Zimmermann como "cuerpos elementales incoloros", etc.

No obstante, siguieron siendo consideradas partículas prácticamente inertes hasta que, en 1882, Giulio Bizzozero probó con sus trabajos en

sangre de anfibios el papel de las plaquetas en la hemostasia y las bautizó con el nombre de “piastrines” (plaquitas).³⁰

La invención del microscopio electrónico a mediados del siglo pasado así como el hallazgo y aislamiento de los factores de crecimiento supusieron una profundización en el conocimiento ultraestructural y funcional de las plaquetas^{31 32}, dando pie a numerosas investigaciones al respecto.

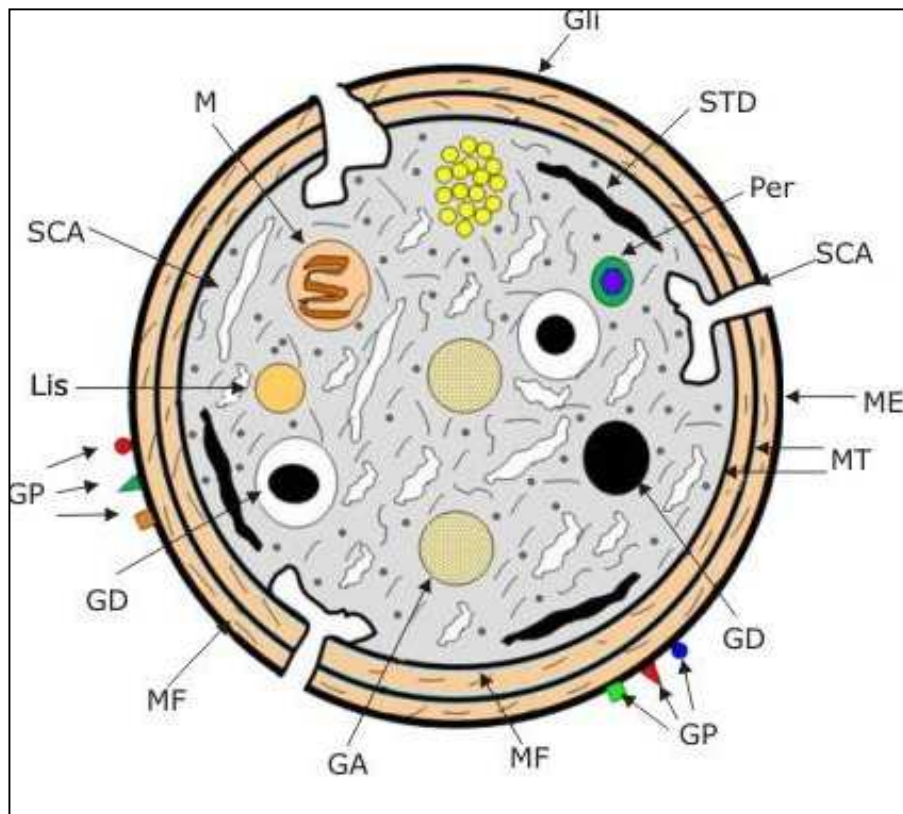
Así, hoy en día definimos a las plaquetas como fragmentos anucleados procedentes del citoplasma del megacariocito que en estado fisiológico presentan una forma discoide biconvexa y un diámetro aproximado de 3µm. Su tasa en sangre es variable oscilando entre 150.000 y 400.000 por µl.

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 médula 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 circulatorio³³.

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

2.1.2.1 Estructura

Las plaquetas se componen de los siguientes elementos: una membrana plasmática con su glicocálix, el citoesqueleto, un sistema canalicular abierto, un sistema tubular denso, diversas organelas (mitocondrias, peroxisomas, aparato de Golgi) y gránulos de almacenamiento específicos: los gránulos densos y los gránulos α ³³.



Adaptado de Fernández-Delgado N (2012)

Figura 1 Componentes estructurales de la plaqueta.

GA: gránulo alfa; **GD:** gránulo denso; **GLI:** glicocálix; **GLU:** glucógeno; **GP:** glicoproteínas; **Lis:** lisosomas; **M:** mitocondria; **MF:** microfilamento; **MT:** microtúbulos; **ME:** membrana externa; **Per:** peroxisomas; **SCA:** sistema canalicular abierto; **STD:** sistema tubular denso.

La **membrana plasmática** es una bicapa compuesta por fosfolípidos (entre los que abunda el ácido araquidónico) y una cubierta externa de glicoproteínas, el glicocálix, con multitud de receptores para los agonistas fisiológicos de las plaquetas.

La composición exacta de la membrana tiene un carácter dinámico, estando sujeta al estado de activación de la plaqueta. Así, sólo durante su activación, se expresarán en su superficie algunos derivados fosfolipídicos proagregantes (pej, el PAF o factor activador de las plaquetas) o procoagulantes (pej, el factor plaquetario 3). La activación plaquetaria inducirá igualmente un incremento en la expresión de receptores presentes en condiciones de reposo, como por ejemplo, el GPIIb/IIIb y el GP Ia/Ia, glicoproteínas de gran importancia en la agregación y adhesión, respectivamente.

El **sistema canalicular abierto (SCA)** es un red de vesículas y canales, interconectados, que se ramifican a través de todo el citoplasma y están comunicados con la membrana plasmática, con la que comparten una misma estructura, puesto que en realidad son invaginaciones de la misma.

Este sistema constituye una vía de acceso de diversas sustancias sanguíneas al interior de la célula y funciona además como conductor al exterior de sustancias liberadas a partir de los gránulos.

El **sistema tubular denso** (STD) consta de una red de tubos apretados y cortos, especialmente abundantes en el citoplasma periférico.

El STD desarrolla un papel fundamental en la regulación de la concentración del calcio citoplasmático libre, y por tanto, en el paso de la plaqueta del reposo al estado activo y viceversa ya que es el principal lugar de almacenamiento del calcio intraplaquetario.

El **citoesqueleto** está formado por los microtúbulos y los filamentos actina y la miosina.

La disposición de los microtúbulos, a modo de un único haz enrollado en espiral bajo la membrana plasmática es responsable de la forma discoide de las plaquetas en reposo.

Durante la activación plaquetaria, este haz se deforma y se dispone más centralmente. Al mismo tiempo, se produce una reorganización de la actina y miosina en una red tridimensional periférica, originando los pseudópodos.

La contracción de los filamentos periféricos hace que los gránulos dispersos en el citoplasma se dirijan hacia el centro y liberen sus contenidos vía SCA.

Los **gránulos α** suponen el 85% del contenido granular de las plaquetas. Acumulan en su interior una gran cantidad de proteínas, algunas de las cuales son específicas de la plaqueta, como el factor plaquetario 4 (PF4), el PDGF y la β - tromboglobulina (TG- β). Otras, como el fibrinógeno y el HGF son endocitadas desde el torrente sanguíneo ³⁴.

En la siguiente tabla podemos ver los distintos mediadores biológicos en ellos contenidos.

Moléculas de adhesión	Citocinas	Factores y cofactores de la coagulación	Factores de crecimiento y angiogénesis	Mediadores inmunológicos	Otros
P-Selectina	PF4	Factor V	FGF	Globulina β 1H	Albúmina
vWF	B-TG	Factor VIII	EGF	Factor D	α 1-antitripsina
Trombospondina	MIP-1 α	Multimerina	HGF	Cl-Inh	Quinógeno
Fibrinógeno	CCCL5 y 7	Proteína S	IGF1	IgG	Oseonectina proteasa
GP IIa/IIIb	CXCL1 y 5	Pa11	TGF β		GP rica en histidina
Fibronectina	IL-8		VEGF-A y C		
GP Iva/IIIb	Proteína básica plaquetaria		PDGF		

Tabla 1 Contenido de los gránulos α de las plaquetas.

Los **gránulos densos** contienen calcio, serotonina, ADP, ATP y pirofosfato y pueden incorporar dopamina del medio externo.

Los **lisosomas** son ricos en enzimas hidrolíticas, especialmente hidrolasas ácidas.

2.1.2.2 Activación

La activación de las plaquetas se produce cuando éstas entran en contacto con sus distintos agonistas fisiológicos, entre los que se incluyen macromoléculas de la matriz subendotelial (colágeno y vWF), hormonas circulantes (adrenalina y vasopresina), sustancias generadas en la lesión (trombina) y factores procedentes de otras plaquetas activadas (tromboxano A₂, ADP, serotonina) entre otros.

Ello provocará cambios en el nivel de los nucleótidos cíclicos, la hidrólisis de fosfolípidos de la cara interna de la membrana, el influjo de calcio y la fosforilación de determinadas proteínas intracelulares.

En último término y como denominador común a la estimulación de las plaquetas por los distintos agonistas, tendrá lugar un aumento de la concentración del calcio libre citoplasmático, que resultará no sólo de la difusión del calcio extracelular hacia el interior de la plaqueta sino también de la redistribución del calcio almacenado en su interior (STD y gránulos densos).

El incremento del calcio citoplasmático desencadenará una serie de reacciones sucesivas, cada una de las cuales precisa para su ejecución de una concentración mayor de calcio. Así, se producirán, por este orden, el cambio en la morfología de la plaqueta (de discoide a esférica y pseudopolipoidea), la agregación plaquetaria, la secreción de los gránulos densos, la secreción de los gránulos α , la liberación del ácido araquidónico y la secreción de los lisosomas.

El fenómeno de activación no finaliza en la plaqueta en cuestión sino que se perpetúa, transmitiéndose a las plaquetas adyacentes y mediante el reclutamiento no ya sólo de nuevas plaquetas, sino también de otras células como fibroblastos, macrófagos, polimorfonucleares, etc.

2.1.2.3 Funciones

Hemostasia

La función principal de las plaquetas es su contribución en la hemostasia, en la que están implicadas mediante diversos mecanismos (adhesión, agregación, secreción y fibrinólisis).

El proceso comienza con la adhesión de las plaquetas al lecho vascular endotelial dañado a través de un mecanismo pasivo que sólo precisa de la exposición de diversos componentes de la matriz subendotelial como el colágeno, laminina y vitronectina, entre otros, para los que existen receptores específicos en la membrana de las plaquetas. Entre ellos el GP Ia/IIa ocupa un lugar destacado. La interacción entre el factor de Von Willebrand (vWF) y otras

glicoproteínas plaquetarias, contribuirá a la estabilización de esta, inicialmente lábil, unión plaqueta-matriz subendotelial.

La activación de las plaquetas y su subsiguiente aplanamiento y emisión de pseudópodos, permitirán la extensión de éstas sobre la superficie lesionada, formándose así una primera placa, que servirá de sustrato para la agregación de nuevas plaquetas y que se conoce como trombo o tapón hemostático primario.

La agregación plaquetaria se hace efectiva vía unión de los receptores GPIIa/IIIb de distintas plaquetas al fibrinógeno y es promovida por distintos factores, como el tromboxano A₂ (TXA₂), producto de la hidrólisis del ácido araquidónico de la membrana por fosfolipasas.

El TXA₂ también contribuirá al taponamiento vascular mediante la inducción de vasoconstricción.

A continuación, el coágulo comenzará a retraerse como consecuencia de la contracción del complejo actina-miosina del citoesqueleto plaquetario, y ello irá seguido por la secreción del contenido de los gránulos densos, α y lisosomas de las plaquetas activadas. Serán vertidas así, en el interior del coágulo y sus inmediaciones, una gran variedad de sustancias proagregantes, enzimas, iones y factores procoagulantes que, por un lado estimularán una mayor agregación y activación plaquetarias y por otro lado, pondrán en marcha la cascada de la coagulación, iniciándose la hemostasia secundaria.

La cascada de la coagulación finaliza con la activación del factor X, imprescindible para el paso de la protrombina a trombina.

La trombina, además de ser un potente agonista plaquetario, catalizará a su vez, la transformación de parte del fibrinógeno circulante a fibrina y promoverá su polimerización, resultando todo ello en la formación de una malla de fibrina que dará consistencia y estabilidad al trombo hemostático primario.

La retracción del coágulo se completará gracias a la trasmisión de la fuerza contráctil del complejo actina-miosina plaquetario a la red de fibrina del trombo por medio de los receptores de membrana GPIIb/IIIa, a los que ambos se encuentran unidos.

La fibrinólisis del coágulo, inicialmente inhibida por enzimas antifibrinolíticas secretadas por las propias plaquetas, como la antiplasmina, comenzará inmediatamente tras la formación del trombo hemostático definitivo y será también regulada por mediadores de origen plaquetario, en concreto, por el plasminógeno convertido en plasmina gracias al activador tisular del plasminógeno.

Reparación y regeneración tisular

El comienzo de los mecanismos de cicatrización y regeneración del vaso lesionado es coincidente en el tiempo con la fibrinólisis.

El coágulo hemostásico definitivo, cuyo objetivo era el taponamiento vascular inicial y la constitución de una matriz provisional en el espacio dejado por el tejido lisado, será invadido entonces por los neutrófilos y macrófagos, formándose un primer tejido degranulación.

Este tejido, altamente vascularizado y friable, será posteriormente sustituido por un tejido cicatricial más resistente en lo que se conoce como proceso de reparación y éste, a su vez, será remodelado paulatinamente hasta adquirir, en condiciones ideales, las características del tejido original (proceso de regeneración).

Las plaquetas juegan un papel de gran relevancia en los procesos de reparación y regeneración, y lo hacen especialmente a través de los factores de crecimiento, citocinas y quimocinas contenidas en sus gránulos α .

La secreción de los gránulos α comienza al cabo de 10 minutos de formarse el coágulo, coincidiendo con el inicio de la retracción del mismo y habiendo sido vertido al exterior, en el plazo aproximado de 1 hora, el 95% de su contenido.

Se trata de un proceso activo y que requiere de la integridad de la membrana plaquetaria para su correcta consecución puesto que muchos de los factores (ej, el PDGF, el TGF β , EGF, etc) 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^{35,36}.

Las funciones de cada factor son complejas y difíciles de aislar de las de los demás y tienen como diana células de estirpes muy variadas (células epidérmicas, mesenquimales, endoteliales, osteoblastos, etc).

Algunos son fundamentalmente mitogénicos como el EGF, IGF y PDGF. Otros son fundamentalmente inductores de fibrosis como el TGF- β 1. Otros son angiogénicos, como el VEGF y algunos tienen, además, un efecto regulador sobre otros GF, como el PDGF y el TGF- β .

En la siguiente tabla podemos ver las acciones de los principales GF contenidos en los gránulos α ³⁷.

GF	ACCIÓN
TGF-β	Quimiotáctico y estimulador de la diferenciación de fibroblastos. Estimulador de la formación de matriz extracelular (fibrosis). Inhibidor de colagenasas. Antimitogénico de células epiteliales. Quimiotáctico de PMN y macrófagos. Efecto regulador sobre otros GF
PDGF	Quimiotáctico y mitogénico para células mesenquimales y epiteliales. Angiogénico. Inductor de diferenciación de fibroblastos. Efecto regulador sobre otros GF.
IGF	Quimiotáctico para células endoteliales. Osteogénico
VEGF	Angiogénico (quimiotaxis y proliferación de células endoteliales)
EGF	Mitogénico, quimiotáctico y estimulador de la diferenciación de células epiteliales y fibroblastos. Aumenta la síntesis de fibronectina. Efecto antiapoptótico.
FGF	Mitogénico y estimulador de la diferenciación de fibroblastos y otras células mesenquimales. Angiogénico.
HGF	Mitogénico y estimulador de la diferenciación de células epiteliales

Tabla 2 Acciones de algunos de los principales GF de los gránulos α.

Inmunológica

Las plaquetas pueden ser activadas por múltiples mediadores inmunológicos, como las inmunoglobulinas, factores del complemento y demás así como por los propios gérmenes.

Una vez activadas, ejercerán su función defensiva mediante la acción directa sobre los patógenos e indirectamente, mediante la estimulación de la inflamación y la interacción con células del sistema inmune.

Entre sus acciones antimicrobianas directas están la fagocitosis y lisis a cargo de enzimas lisosómicos de determinados patógenos así como la liberación de agentes bactericidas, como la β-lisina.

Las plaquetas son también potentes estimuladoras de la inflamación. Por un lado, en estado de activación segregan numerosas sustancias vasoactivas como la prostaglandina E2, la serotonina y la histamina y por otro lado, estimulan la degranulación de los mastocitos, que a su vez liberarán más histamina y mediadores quimiotácticos. Producto de ello, se producirá un incremento en la permeabilidad vascular y un reclutamiento de células defensivas.

Otros factores de origen plaquetario, como el PAF y el PF4, son quimiotácticos y proagregantes para los neutrófilos y monocitos, y determinan la producción por parte de estos de anión superóxido, leucotrienos, citotoxinas, etc

Por último, la adhesión membrana plaquetaria-membrana leucocitaria, mediada por la P-selectina, facilita el intercambio bioquímico entre ambos con el consecuente incremento de su potencial citotóxico.

Destoxificante

Las plaquetas ejercen de destoxificantes del plasma mediante la captación y transporte de diversa sustancias a sus lugares de degradación metabólica, como es el caso de la serotonina.

Otras

Además de estas funciones fisiológicas, las plaquetas intervienen en determinados procesos patológicos como la aterosclerosis y trombosis y el cáncer.

Existen estudios recientes que implican a las plaquetas en la estimulación de la expansión in situ de determinados tumores así como en el favorecimiento de su capacidad de producir metástasis a distancia³⁸.

2.2 PROPIEDADES Y EFECTOS BIOLÓGICOS DEL PRGF

2.2.1 Propiedades del PRGF.

El PRGF es un producto autólogo, y en consecuencia, biocompatible. Posee además un carácter versátil, pudiendo ser aplicado, mediante pequeñas variaciones en su protocolo de elaboración, en forma líquida o de coágulo, y con distintos grados de enriquecimiento y activación plaquetaria, según el uso que se le vaya a dar.

La propiedad principal del PRGF y responsable de la mayoría de sus efectos biológicos es la liberación sostenida de factores de crecimiento aunque también son importantes la ausencia de leucocitos en su composición y su actividad antibacteriana y antiinflamatoria.

2.2.1.1 Liberación sostenida de factores de crecimiento.

La activación del PRGF mediante cloruro cálcico activa la trombina autóloga y ésta a su vez activa al fibrinógeno, que convertido en fibrina comienza a formar una matriz tridimensional de alta estabilidad.

Al mismo tiempo se produce la activación de las plaquetas y la liberación del contenido de sus gránulos α y densos.

Se estima que la mayor parte del contenido de los gránulos es segregado en el plazo de una hora³⁵.

Inicialmente todas estas moléculas bioactivas quedan atrapadas en el coágulo de fibrina, y van siendo liberadas de forma gradual, a medida que se produce la retracción del coágulo, que es máxima a las 2-3 horas³⁹.

2.2.1.2 Ausencia de leucocitos.

El PRGF carece de leucocitos en su formulación, lo que puede ser considerado ventajoso, si tenemos en cuenta que los leucocitos contienen un gran número de citocinas proinflamatorias y actúan como potentes quimiotácticos para otras células del sistema inmune, lo que a su vez incrementa aún más la inflamación^{18 16}.

Si bien la inflamación es una etapa más de los procesos de regeneración tisular, niveles incrementados de los productos asociados a la misma, como enzimas metaloproteasas y radicales libres de oxígeno, tienen repercusiones negativas sobre la regeneración y pueden además dañar el tejido sano circundante.

Asimismo, la composición acelular de la fibrina de PRGF, le otorga una gran estabilidad y viscoelasticidad, características de enorme utilidad para su aplicación tisular.

2.2.1.3 Propiedades antiinflamatorias y bacteriostáticas.

El PRGF posee una capacidad antibacteriana frente a dos de las especies más virulentas de estafilococos y que con más frecuencia se asocian a infecciones secundarias de las lesiones en medicina: el estafilococo aureus y el estafilococo epidermidis.

Concretamente ha mostrado un poder bacteriostático, especialmente durante las primeras 4 horas tras su aplicación⁴⁰.

Las propiedades antibacterianas del PRGF parecen estar relacionadas con la presencia en el mismo de algunas moléculas de origen plaquetario, como la quimiocina RANTES (regulated upon activation normal T-cell Expressed and secreted), el factor plaquetario 4 (PF-4) y la proteína básica plaquetaria.

Diversos grupos de investigación han observado que los preparados ricos en plaquetas tienen un efecto antiinflamatorio, bien mediante la inducción en el tejido diana de un aumento de los niveles de lipoxina 4 o bien mediante la acción directa de algunas moléculas en él contenidas, como el HGF³⁹.

2.2.2 Efectos biológicos del PRGF.

Los efectos biológicos derivados del PRGF han sido analizados a través de diversos estudios, entre los que se encuentran aquellos realizados in vitro, empleando cultivos celulares primarios, así como los realizados in vivo, tanto en animales como humanos.

2.2.2.1 Eficacia in vitro.

El grupo de Anitua publicó en 2005 un primer estudio analizando la eficacia in vitro del PRGF en cultivos celulares primarios de tenocitos. En dicho estudio se observó que el PRGF poseía un efecto mitogénico sobre las células de tendón así como un efecto inductor de la síntesis de algunos GF, como el VEGF y el HGF, por parte de las mismas. Estos efectos eran mayores con las fracciones inferiores del PRGF (F2+F3), que con la F1, que de modo aislado puede ser considerado un plasma pobre

en plaquetas, puesto que presenta concentraciones de plaquetas similares a las del plasma⁴¹.

Posteriormente, el mismo grupo publicó un trabajo en el que analizaba los efectos del PDGF-AB y el TGF- β 1, dos de los GF más abundantes en las plaquetas, sobre los tenocitos. Para ello compararon el PRGF con un PRGF modificado mediante la adición de anticuerpos específicos contra el PDGF-AB y TGF- β 1, bloqueándose así las acciones de ambos GF. El PDGF mostró estimular la proliferación celular mientras que el TGF- β 1 actuaba como inhibidor de la misma y promotor de la síntesis de colágeno de tipo I, principal componente de la matriz extracelular (MEC) tenoniana. El TGF- β 1, a su vez provocaba un aumento de la síntesis tenocitaria de VEGF y un descenso de la de HGF, apoyando el papel regulador del mismo sobre la angiogénesis y la fibrosis⁴².

El cultivo de tenocitos sobre coágulos de PRGF, simulando las condiciones "in vivo" mostró que los coágulos de PRGF obtenidos a partir de la suma de la F2 y F3, aceleraba la proliferación de los fibroblastos de tendón, induciendo tanto la síntesis de colágeno tipo I como la neovascularización²².

En otro estudio, se investigó la secreción de HGF y ácido hialurónico (potente lubricante y protector del cartílago articular) por células sinoviales a las que se añadió sobrenadante obtenido a partir de las fracciones inferiores de PRGF⁴³.

Las células sinoviales procedían de 10 pacientes con artrosis avanzada, y a la mitad de los cultivos se les añadió IL-1 β (citocina implicada en la degeneración articular), para simular una situación de mayor inflamación. Se observó que el PRGF provocaba un aumento significativo de los niveles de ácido hialurónico en los dos tipos de cultivo y de HGF sólo en los carentes de IL- β 1.

En 2009, Anitua et al publican un trabajo con un doble objetivo: en primer lugar, analizar si la respuesta al PRGF podía estar condicionada por el origen anatómico de las células y, en segundo lugar, valorar si dicha respuesta variaba en función de la concentración plaquetaria del PRGF⁴⁴. Para ello emplearon 16 cultivos primarios de fibroblastos procedentes de piel, membrana sinovial y tendón y se les añadieron 3 formulaciones de sobrenadante de PRGF: una obtenida a partir de la F1, otra de las fracciones inferiores y una última, de un PRGF preparado especialmente para el estudio con una concentración plaquetaria entre 4-5 veces la de la sangre periférica, y se cuantificaron los niveles de dos factores de crecimiento (HGF y VEGF) y una molécula estructural (ácido hialurónico).

Los resultados mostraron que las tres preparaciones de PRGF inducían un aumento significativo de la proliferación de las tres estirpes celulares, aunque con algunas diferencias según cual fuera su tejido original. Así, mientras que los tenocitos respondían principalmente a las formulaciones más ricas de PRGF, las células cutáneas respondían de un modo similar a los tres preparados. A raíz de ello, concluyeron que el efecto mitogénico de las células de la piel podía deberse tanto a los factores plasmáticos como a los derivados de las plaquetas, mientras que el de las células

derivadas del tendón, tejido avascular, era más dependiente de los plaquetarios.

En los tres tipos de cultivo se observó un aumento de la secreción de VEGF y HGF y ácido hialurónico no proporcional a la concentración plaquetaria del PRGF. Particularmente, el HGF alcanzaba sus mayores niveles con la fracción F2 y F3 combinadas.

La falta de diferencias significativas en cuanto a la proliferación entre el PRGF estándar y el concentrado sumado al efecto similar e incluso contraproducente del más concentrado sobre la secreción de GF/ácido hialurónico, llevó a concluir que la concentración óptima para la regeneración tisular era la concentración moderada presente en la suma de las dos fracciones inferiores del PRGF.

La migración celular fue objeto de un trabajo publicado en 2012⁴⁵ sobre cultivos primarios de tenocitos y membrana sinovial, en el que se simulaba una lesión mediante la retirada de varios insertos que habían sido dispuestos en las placas previamente a la siembra celular.

La capacidad de migración de las células sobre la discontinuidad creada fue significativamente mayor para la suma de la F2 y F3 que para la F1 y la combinación del sobrenadante con ácido hialurónico permitía aumentar el número de células migratorias.

El efecto del PRGF sobre cultivos primarios de fibroblastos corneoconjuntivales ha sido objeto de una reciente investigación¹¹⁷. Se establecieron para ello 3 grupos de cultivos de queratocitos (fibroblastos corneales) y de fibroblastos conjuntivales: un primer grupo fue tratado con la fracción completa de PRGF (WP) al 20%, otro con la F3 de PRGF al 20% y un último grupo control, no estimulado.

La proliferación celular fue analizada a las 48h, detectándose un incremento de la misma para ambos subtipos fibroblásticos con las dos preparaciones de PRGF con respecto al grupo control. El ascenso de la proliferación fue de 3,1 veces y 3,4 veces en el caso de los fibroblastos conjuntivales para el WP y la F3, respectivamente y de 2,8 veces y 2,7 veces en el caso de los queratocitos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos pero sí entre éstos y el grupo control.

Lo mismo sucedía con la migración, que aumentaba 1,8 y 1,7 veces respectivamente para los fibroblastos y 2,3 y 1,8 veces para los queratocitos con el WP y la F3 ($p > 0,05$ entre ambos y $p < 0,05$ entre éstos y el grupo control).

Se estudió asimismo la capacidad de miodiferenciación de las dos líneas celulares mediante la adición pasados los dos primeros días de TGF- β 1 a los tres cultivos: en un caso, sin PRGF y en los otros dos, asociado a WP y F3, observándose una diferencia en cuanto a la diferenciación a miofibroblastos del 16% de los fibroblastos y del 14% de los queratocitos en los controles, mientras que en los grupos PRGF ésta los valores medios eran de 0,2% y 0,1%.

Los resultados mostraron que dicha diferenciación era reversible, al producirse una regresión de la misma del 7% y 8% tras la adición del WP y del 11% y 12% tras la adición de la F3 para los cultivos de fibroblastos y queratocitos, lo que llevó a la conclusión de que el ambas preparaciones de PRGF provocaban un aumento de la proliferación y migración de las células fibroblásticas corneales y conjuntivales sin inducir e incluso revirtiendo su diferenciación a miofibroblastos, fenotipo implicado en la opacificación y contracción de las cicatrices corneo-conjuntivales.

2.2.2.2 Eficacia in vivo.

El primer trabajo experimental, publicado por el grupo de Anitua en 2001^{46,16} tuvo como objetivo la comprobación de la capacidad del PRGF para acelerar la regeneración ósea en alveolos. Se crearon para ello 24 alveolos artificiales en la tibia de cabras sanas de los cuales la mitad fueron rellenados con un coágulo recién activado de la F3 de PRGF y la otra mitad (grupo control) fueron rellenados con sangre. Las biopsias obtenidas al cabo de 4 semanas mostraban un tejido denso y compacto formado por trabéculas con osteocitos y cavidades medulares sin fibrosis asociada en el primer grupo, mientras que en el grupo control se observó la presencia de una matriz fibrosa con pequeñas áreas de espículas incipientes y en algún caso, tejido adiposo.

Fruto de los anteriores resultados preclínicos, el PRGF fue aplicado en un grupo de 8 pacientes¹⁰, a los que se les efectuó la colocación de un implante a las 14-16 semanas postextracción dental. En todos ellos el alveolo fue rellenado con un coágulo de PRGF (F3) en el momento de la extracción de la pieza, sellándolo inmediatamente después con un coágulo de fibrina (F1). Los defectos epitelizaron en el 100% de los casos en 1-2 semanas. Al cabo de 14-16 semanas, se procedió al análisis de densitometría ósea vía TAC, revelando valores densitométricos elevados en los defectos regenerados (densitometría media de 567 Hounsfield). Los implantes fueron entonces realizados, previa impregnación con PRGF, mostrando en todos los casos una gran estabilidad primaria (torque entre 45 y 70 NW).

La aceleración de la regeneración del tejido blando y óseo han sido confirmados por estudios posteriores de otros grupos.^{47, 48}

En otro estudio publicado por Anitua en 2006⁴⁹, se realizaron 4 inyecciones de 2 ml de dos formulaciones diferentes de PRGF (la F1 aislada y la suma de las fracciones F2+F3) y de suero fisiológico en el tendón de Aquiles de 6 ovejas de la raza Latxa, dejando como control los tendones no sometidos a ningún tipo de inyección. Los animales fueron sacrificados a la 5ª semana. El análisis histológico del tejido tenoniano mostró la ausencia de reacciones secundarias relacionadas con las infiltraciones, así como un aumento de la celularidad y vascularización, claves para la regeneración tisular, en los grupos PRGF.

El grupo de Kajikawa et al, presentó hallazgos similares en cuanto a la eficacia de los preparados ricos en plaquetas en la regeneración del tendón⁵⁰.

En otro trabajo llevado a cabo por Sánchez et al³⁹ se valoró la eficacia y bioseguridad del empleo de PRGF en las plastias de tendón rotuliano de 16 ovejas, la mitad de las cuales se emplearon como control y la otra mitad como grupo de tratamiento con PRGF. En éstas se inyectó la plastia con la suma de las fracciones F2 y F3 de PRGF, y una vez colocada, se dispusieron sobre la misma dos membranas de fibrina de PRGF (realizadas con la F1), completando el tratamiento con una última inyección de la F1 alrededor del tendón.

En el estudio histológico llevado a cabo transcurridos plazos postquirúrgicos de 1, 3, 6, 12 y 16 semanas se constató que durante la primera semana se producía una primera fase de la remodelación similar a la fisiológica, con inflamación, neovascularización y repoblación celular del área intervenida. Dicha inflamación regresaba a niveles basales entre la 3ª y la 6ª semanas mientras que la densidad celular tenocitaria seguía presentando niveles elevados, con una recuperación de los niveles normales de los mismos y de la vascularización hacia las 12-16 semanas, momento en el que las fibras de colágeno producidas por los tenocitos adquirían las características del tejido sano (diámetros mayores y orientación paralela). No se observaron efectos secundarios asociados al tratamiento con PRGF.

Dichos hallazgos fueron trasladados a humanos y confirmados, como queda recogido en un estudio llevado a cabo en 37 pacientes intervenidos de lesiones del ligamento cruzado anterior⁵¹. De éstos, 15 fueron sometidos a la cirugía convencional y 22, a la cirugía asistida con PRGF. Se evaluó la progresión de la cicatrización del ligamento mediante una escala que puntuaba la celularidad, la vascularidad y las propiedades del colágeno neoformado, siendo el 4 el valor máximo y considerado excelente.

La evaluación macroscópica de los injertos vía artroscopia mostró que las puntuaciones del grupo PRGF eran superiores a las de los controles, aunque sin llegar a la significación estadística ($p=0,051$). Concretamente el grupo tratado con PRGF mostró puntuaciones excelentes en el 57,1% de las rodillas y buenas (puntuación 2-3) en el 42,9% restante frente a un 33,3% y 46,7% respectivamente para el grupo control.

Sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,024$) en el análisis histológico comparativo de ambos grupos, detectándose un tejido ligamentoso más maduro en el grupo PRGF, con tejido conectivo neoformado envolviendo al injerto en un 77,3% de los casos versus 40% de los controles.

En un nuevo estudio realizado por este mismo grupo se valoró la eficacia del tratamiento de rodillas artrósicas empleando como modelo ovejas a las que previamente se les había practicado una resección bilateral del ligamento cruzado anterior.

Las 9 ovejas incluidas comenzaron a ser tratadas 3 semanas después de la resección con 6 inyecciones intraarticulares guiadas por ecografía cada dos semanas; en una de las rodillas, las inyecciones eran de PRGF mientras que en la otra, de salino.

Las ovejas fueron seguidas radiológicamente, siendo sacrificadas cuando se evidenciaban signos de osteoartritis, lo que ocurrió entre 36-38 semanas postcirugía y 16-18 semanas tras finalizar el tratamiento. En el examen macroscópico de todas las articulaciones diseccionadas se constató la presencia de osteofitos y la degeneración de la superficie articular, validando la fiabilidad del modelo de rodilla artrósica previamente descrito. En las evaluaciones histológicas, las rodillas tratadas con PRGF obtuvieron mejores resultados a nivel del cóndilo interno que los controles ($p < 0,05$) y menor fibrilación rotuliana (4,3% de media versus 10,1% de media, respectivamente ($p = 0,053$)⁵².

Los efectos del PRGF en la osteoartritis y lesiones degenerativas del cartílago articular han sido evaluados en el ser humano por otros grupos, como el de Filardo et al¹⁵. Reclutaron para ello 144 pacientes con osteoartritis dividiéndolos en dos grupos simétricos según recibieran infiltraciones de PRP o de PRGF. En ambos, el número de inyecciones fue de 3. Ambos grupos mejoraron en las puntuaciones obtenidas en las escalas IKDC, EQ-VAS y Tegner, sin encontrarse diferencias entre los dos tratamientos. Sí se hallaron sin embargo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la inflamación ($p = 0,03$) y dolor ($p = 0,0005$), a favor del PRGF.

2.3 DIFERENCIAS ENTRE EL PRGF Y OTROS PREPARADOS RICOS EN PLAQUETAS

Debido a la gran variedad de derivados plasmáticos ricos en plaquetas descritos, nos centraremos en la comparación entre el PRGF y el PRP, al tratarse este último del preparado que acumula mayor número de citaciones en la literatura médica reciente. El grupo PRP engloba actualmente también al gel rico en plaquetas.

El primer y principal factor diferencial entre ambos es que, así como para la elaboración del PRGF existe un protocolo minuciosamente estandarizado, para la preparación del PRP se han descrito y se siguen describiendo numerosas variantes del protocolo inicialmente desarrollado por Marx¹.

Las variaciones en el método de obtención del PRP van desde el anticoagulante empleado (citrato dextrosa, citrato sódico, EDTA) a los parámetros y ciclos de centrifugación empleados (distintos equipos, velocidades y proceso único o doble), así como a los activadores plaquetarios utilizados y que incluyen trombina bovina, cloruro cálcico o ambos combinados e incluso ciclos de congelación/descongelación.^{53 54 55}
56 57

En la siguiente tabla podemos ver un resumen de algunos de los protocolos PRP descritos y su comparación con el PRGF.

Autor	Anticoagulante	Centrifugación	Activación
Anitua et al	Citrato sódico al 3.8%	460 g 8 min	22.8mm /ml CaCl ₂
Marx et al	Citrato sódico al 3.8%	1º 5600 rpm 8 -9 min 2º 2400 rpm 8-9 min	Trombina+ CaCl ₂ 10%/ml
Gruber et al	Citrato dextrosa 1:10	1400g 10 min	Trombina
Chiang et al	Citrato dextrosa 1:10	1º 3650 rpm 6 min 2º 3000 rpm 6 min	Trombina+ CaCl ₂ 10%/ml
Gandhi et al	EDTA	1º 1800 rpm 10 min 2º 3600 rpm 10 min	Trombina+ CaCl ₂ 10%/ml
Efeoglu et al	ACD-a	1º 300g 10 min 2º 5000g 5 min	CaCl ₂ 10%/ml
Kawasumi et al	Nd	1º 1100g 10 min 2º 1100g 10 min	Nd
Sanchez et al	Citrato sódico 3.8%	640 g 8 min	CaCl ₂ 10%/ml
Alió et al	Citrato sódico al 3.2%	1400 rpm 10 min	Congelación/descongelación

Tabla 3 Distintos protocolos PRP descritos y su comparación con el protocolo PRGF.

Podemos apreciar la variedad de procedimientos para la obtención del PRP en los principales pasos de su secuencia de elaboración. El EDTA (edetato sódico) no se emplea en la actualidad por su toxicidad para las membranas plaquetarias ⁵⁴. (ACD-a: ácido cítrico + dextrosa+ citrato sódico, Nd: no dice, CaCl₂: cloruro cálcico, rpm: revoluciones por minuto).

Como vemos, las combinaciones entre las variaciones de cada uno de los pasos del “método PRP” son múltiples así como diversos serán los productos resultantes de su ejecución.

Englobar bajo un único término a un grupo tan heterogéneo en composición como el PRP, sólo puede llevar a la confusión, limitando la comparación de los resultados de distintos grupos de investigación así como el traslado de las conclusiones a partir de ellos extraídas a la población general.

A pesar de ello, podemos decir que, en líneas generales, el PRGF® y el grupo PRP se distinguen fundamentalmente por los siguientes aspectos: la equipación y volúmenes de sangre necesarios para su elaboración; la concentración plaquetaria final, con valores tendentes a ser más altos en el grupo PRP que en el PRGF; la presencia o no de leucocitos en su composición (el PRGF carece de ellos) y, por último, por el modo de activar las plaquetas, y por tanto, lograr la secreción de los factores de crecimiento en ellas contenidos.

Veamos uno por uno estos cuatro puntos:

1. Equipación y volúmenes de sangre necesarios.

El método PRGF® precisa (como podemos ver en detalle en el apartado 2.2.2) de una equipación específica cuyo pilar es la microcentrífuga BTI PRGF system®. Dicha tecnología es idónea para su utilización en consulta, tanto por su tamaño como por los

bajos volúmenes de sangre que maneja, normalmente de entre 30 y 60 ml.

Se han desarrollado distintos sistemas equiparables al sistema PRGF® para la elaboración de PRP, como el sistema Curasán (Curasan, Kleinostheim, Germany), el Platelet Concentrate Collection System (PCCS kit®, Biomet 3i, Florida, USA), el SmartPrep®2 (Harvest Technologies Corp, Plymouth, Great Britain), etc.

Algunos autores, sin embargo, utilizan equipos no específicos, y de uso habitual en el ámbito hospitalario, como Marx et al, que emplea un separador celular de gradiente de densidad Electro Medics 500® (Medtronics, Minneapolis, USA) o Alió et al^{58,59}, que no especifican el tipo de centrífuga empleada.

Los volúmenes de sangre manejados también son muy variables entre los distintos PRPs. El protocolo descrito por Marx, por ejemplo precisa de la extracción de 400-500ml de sangre lo que sumado a las características del equipo Electro Medics 500®, conlleva que necesariamente haya de ser llevado a cabo en un quirófano.

2. Concentración de plaquetas.

La mayoría de los investigadores que han participado en el desarrollo de los hemoderivados ricos en plaquetas se han regido por la premisa de que a mayor concentración plaquetaria, mayor concentración de factores de crecimiento y, por tanto, mayor potencial regenerativo del plasma.

Ello ha llevado a que la mayoría de los autores propusieran para la obtención del PRP un proceso de doble centrifugado. De este modo, con un primer ciclo de centrifugación se produce la separación de la sangre completa en una franja roja inferior de hematíes y una superior amarillenta con los leucocitos y las plaquetas, conocida como plasma pobre en plaquetas (PPP) y con el segundo ciclo, realizado sobre el PPP, se consigue un enriquecimiento en plaquetas del mismo al dividirlo nuevamente en dos franjas, la inferior de las cuales, de color rojizo, sería la correspondiente al PRP.

Posteriormente, algunos autores han utilizado un sistema de única centrifugación para el PRP, aunque muchos otros, entre ellos Marx, se oponen a que el resultado de ello sea denominado PRP, puesto que lo consideran un PPP.

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. En esta línea, Choin y cols observan que el PRP en concentraciones superiores al 5% tiene un efecto inhibitor sobre la regeneración de injertos autólogos in vitro, y que dicho efecto aumenta progresivamente a mayor concentración del PRP. Diversos autores han cifrado entre 500.000 y

1.000.000 el recuento plaquetario ideal de los concentrados ricos en plaquetas^{11,1,12}, lo que supone un enriquecimiento de 3 a 6 veces el recuento basal.

La concentración plaquetaria tiende a ser más alta en el grupo PRP, que en el PRGF®, mostrando oscilaciones notables de las mismas entre una media de 3,38 veces (rango entre 2,10 y 5,36) respecto al recuento basal del PRP de Marx y de 9 veces del PRP de Kawasumi

55

El método PRGF®, por su parte, consigue una concentración plaquetaria constante de entre 2-5 veces la basal, cifra moderada y óptima para la estimulación de la proliferación y diferenciación celular.

Otro de los aspectos de la centrifugación que tiene una gran relevancia en la concentración de plaquetas final es la velocidad de la misma. Dichas velocidades son desconocidas para algunos de los PRP descritos, bien por no estar referidas o bien por estar anotados en rpm, lo que carece de valor si desconocemos el diámetro del rotor de la centrifuga utilizada, debido a que la fuerza centrífuga, medida en g, se calcula a partir de la velocidad y el radio del rotor.

Algunos PRP, como mostrábamos en la tabla 3, son el resultado de centrifugados rápidos (ej 5000g durante 5 min en el PRP de Efeoglu y cols), lo que podría, como apuntan distintos estudios, afectar a la integridad de la membrana plaquetaria, provocando una liberación inmediata de los GF.

Los parámetros de centrifugación del sistema PRGF® son constantes y lentos, de 460g durante 8 min, lo que asegura la conservación de la estructura de las plaquetas.

Recientemente, Weibrich y cols han publicado dos trabajos comparando dos sistemas de centrifugación doble comercializados para la elaboración de PRP y el sistema PRGF®.

En el primero de ellos, compara dos sistemas de centrifugación doble PRP: el PCCS kit® y el sistema Curasan®, encontrando diferencias significativas en el recuento plaquetario a favor del PCCS® (2.209.000/μl vs 1.075.000/μl) y en el recuento leucocitario a favor del Curasan®⁶⁰.

En el segundo, en el que compara el PCCS® con el PRGF®, encuentra diferencias estadísticamente significativas a favor del PCCS en cuanto a recuento plaquetario (1.641.800±426.8/μl vs 513.600±139,4/μl) y leucocitario (14.153±7.57/μl vs 65±108/μl). Observaron diferencias estadísticamente significativas también a favor del PCCS® en el nivel de dos factores de crecimiento: el PDGF-AB y el TGF-β1¹⁸.

En estudios llevados a cabo por nuestro grupo^{61 17} sobre la cuantificación comparativa de varios factores de crecimiento (EGF, FGF, VEGF, HGF y PDGF) y fibronectina en tres hemoderivados, concretamente el suero autólogo (SA), el PRGF® (WP) y el PRP del

grupo de Alió, encontramos diferencias estadísticamente significativas en las determinaciones del EGF, a favor del PRGF® y de HGF y VEGF, a favor del S.A. El análisis de la capacidad de inducción de proliferación y diferenciación de células corneales epiteliales in vitro de los tres preparados reveló que las células cultivadas en presencia de PRGF y SA eran las que mayor proliferación presentaban, en detrimento de las cultivadas en PRP. El PRGF además superaba al SA en cuanto a la capacidad de estimular la diferenciación de las células, produciendo colonias más heterogéneas.

3. Leucocitos.

El sistema PRGF® desecha la serie blanca o buffy coat, por lo que, en condiciones normales carece de leucocitos en su composición final o al menos presenta valores muy bajos de los mismos.

El grupo PRP, por el contrario, recoge la serie leucocitaria en su formulación buscando con ello lograr una mayor cantidad de GF, al sumar a los plaquetarios algunos también presentes en los leucocitos, como el PDGF y el TGFβ1. Así mismo, aunque de forma secundaria, pretenden conseguir cierto efecto antimicrobiano.

Sin embargo, el beneficio de la incorporación de la serie blanca al concentrado plaquetario es un tema controvertido en la actualidad, puesto que se ha observado que los preparados más ricos en leucocitos, ocasionan una mayor inflamación en el lugar de aplicación⁶².

Partiendo de dicha observación, Filardo y cols¹⁵ han llevado a cabo un estudio en el que comparan la eficacia y seguridad de las inyecciones intrarticulares de PRGF® y PRP para el tratamiento de osteoartritis y lesiones degenerativas de rodilla en una muestra de 144 pacientes. Pese a que no hallan diferencias significativas en cuanto a eficacia, sí que las hallan en cuanto a seguridad y tolerancia. Así, encuentran que tras las inyecciones de PRGF® la inflamación y el dolor eran inferiores que tras las de PRP ($p=0,03$ y $p=0,0005$, respectivamente).

4. Activación plaquetaria.

Otro factor determinante en la presencia y acciones de los GF del plasma rico en plaquetas es el modo de activación de las mismas.

Mientras que el PRGF emplea de forma constante cloruro cálcico para su activación, en el grupo PRP se emplean además de éste, otros métodos, como la adición de trombina, ya sea de forma exclusiva o combinada con cloruro cálcico o los ciclos de congelación descongelación.

La trombina y el sistema de congelación/descongelación producen una liberación inmediata de los GF. El cloruro cálcico, por el contrario, consigue remedar más fielmente la secreción fisiológica del contenido de los gránulos α , que al contacto con el calcio, se producirá de forma paulatina, permitiendo así que las interacciones

entre los distintos GF y el tejido diana sean lo más similares posible a las reales.

La trombina bovina, que es la habitualmente empleada, conlleva el riesgo de transmisión de determinados patógenos que escapan a la detección por los controles habituales y la posibilidad de desencadenar reacciones de inmunidad por parte del huésped. Su empleo se ha asociado así mismo, con el riesgo de coagulopatías al detectarse en su composición la presencia conjunta de los factores V y IIX de la coagulación. Recientemente se ha descrito la trombina recombinante, lo que permitiría eliminar dichos riesgos.

La activación mediante congelación/descongelación, presenta la desventaja a su vez de provocar la lisis plaquetaria, y de incorporar en su forma de presentación líquida, restos de sus membranas, de los que el PRGF en forma líquida, carece. Ello puede suponer una ventaja en la tolerancia y efectos del PRGF® respecto al PRP® líquido, por el carácter proapoptótico que se atribuye a estos restos¹²⁶.

Finalmente, una vez vistas las diferencias en cuanto a composición y preparación del PRGF y el grupo PRP, cabe preguntarse si ello se traduce a su vez en diferencias en cuanto a su eficacia biológica.

Aún con las limitaciones que supone la comparación entre el PRGF® y el heterogéneo grupo PRP como si se tratase de una unidad, y pese a la escasez en la literatura de trabajos al respecto, las primeras publicaciones in vitro apuntan a una mayor capacidad de proliferación y diferenciación del PRGF® con respecto al PRP sobre algunas estirpes celulares¹⁷. Estudios in vivo parecen indicar una eficacia biológica similar, aun con un perfil de seguridad y tolerancia mayores para el PRGF¹⁵.

2.4 DIFERENCIAS ENTRE EL PRGF Y OTROS DERIVADOS HEMATOLÓGICOS EMPLEADOS EN OFTALMOLOGÍA.

2.4.1 Suero autólogo.

El colirio de suero autólogo (SA) es un tratamiento consolidado en multitud de patologías de la superficie ocular. Inicialmente descrito por Fox et al⁶³ en 1984, no fue hasta 1999, a raíz de los trabajos de Tsubota^{64, 80} cuando se extendió su utilización para el tratamiento del ojo seco severo y los defectos epiteliales persistentes.

El colirio de suero autólogo se obtiene a partir de muestras sanguíneas recogidas en un tubo sin anticoagulante, primera diferencia con el PRGF y el resto de preparados ricos en plaquetas. Al igual que el PRGF, requiere de un único proceso de centrifugación, sin embargo, a diferencia del mismo, tras la centrifugación del SA, todos los elementos formes de la sangre, incluidas las plaquetas, quedan depositados en la parte inferior del tubo y por tanto, excluidos del producto.

El proceso de elaboración del suero autólogo no persigue como objetivo la máxima liberación del contenido granular plaquetario, aunque parte del

mismo es liberado al sobrenadante o SA de forma secundaria durante la coagulación de la muestra en el tubo de extracción.

En la composición del SA podemos encontrar de este modo proteínas séricas así como diversos factores plaquetarios. En la siguiente tabla podemos ver los principales componentes del SA.

Principales sustancias presentes en el SA
GF (EGF, TGF- β , PDGF, IGF-1, FGF, Sustancia P, NGF)
Vitamina A
Fibronectina
Albúmina
α -2 macroglobulina
Inmunoglobulinas
Lisozima
Factores del complemento

Tabla 4 Principales componentes del suero autólogo.

La composición del suero autólogo presenta similitudes importantes con la de la lágrima natural^{63,69}, como podemos ver en la tabla número 6, lo que se corresponde con su buena tolerancia y eficacia en el tratamiento de distintas patologías de la superficie ocular^{64, 65,80, 81,82,66}.

Del mismo modo que sucedía con el PRP, en la actualidad el SA debe ser considerado un grupo más que un único producto, puesto que el protocolo inicialmente descrito por Tsubota para su obtención ha sido sometido posteriormente a múltiples variaciones por parte de los distintos autores. Es conocido el impacto de parámetros como el tiempo de coagulación, así como la velocidad y tiempo de centrifugación sobre la calidad del SA final^{67,68}, por lo que dichos parámetros están siendo objeto de revisión por parte de algunos grupos en la actualidad⁶⁸.

A modo general, no obstante, todos ellos respetan la tendencia a emplear velocidades y tiempos de centrifugación más altos que el PRGF. Concretamente las velocidades de centrifugación del grupo del SA se distribuyen en un rango entre los 300g (\approx 1500 rpm) y 4000g (\approx 5000rpm)⁶⁹, frente a los 460g del PRGF y los tiempos de centrifugación, entre los 5 min y los 20 min, frente a los 8 min del PRGF.

Mientras que el PRGF es utilizado a concentraciones del 100% para su aplicación en las distintas áreas de la medicina en las que se dispone de experiencia con su uso, el colirio de suero autólogo se administra habitualmente a concentraciones del 20%, logradas tras la mezcla con una solución salina. La dilución del SA fue propuesta por Tsubota como consecuencia de la detección de niveles desproporcionadamente altos del factor de crecimiento TGF- β en el SA desarrollado según su protocolo (1500 rpm durante 5 min), a fin de evitar unos efectos exagerados del mismo sobre la inhibición de la proliferación de las células epiteliales corneales y la estimulación de la fibrosis corneal⁶⁴. Dicha concentración ha sido adoptada por los distintos grupos de científicos. No obstante,

investigaciones posteriores a cerca de las cuantificaciones de GF realizadas en el SA obtenido mediante otros protocolos, no han corroborado dicho hallazgo⁶⁹. Los valores de TGF- β parecen ser incluso más elevados en el PRGF que en el SA descrito por Tsubota (63 ng/ml y 33ng/ml respectivamente), aunque en estudios in vitro, el PRGF ha mostrado inhibir y revertir la diferenciación de los queratocitos corneales a miofibroblastos¹¹⁷.

Los derivados plasmáticos enriquecidos en plaquetas incorporan una gran concentración de las mismas y en consecuencia, una teóricamente mayor concentración de los factores contenidos en ellas que el suero autólogo, como apuntan algunos trabajos⁴¹. No obstante, existen escasos estudios aún que comparen el PRGF y el SA, aunque, como adelantábamos en el punto anterior, en estudios realizados por nuestro grupo comparando la cuantificación de varios GF en un SA elaborado a 1000g durante 15 min y el PRGF, hallamos una concentración estadísticamente significativa de EGF a favor del PRGF, mientras que los niveles de HGF y VEGF eran significativamente más altos en el SA. No se encontraron diferencias significativas en cuanto a los valores de FGF, PDGF y fibronectina.

Los primeros estudios comparativos entre el SA y los preparados ricos en plaquetas establecen que estos últimos tienen una mayor eficacia in vitro sobre la capacidad de proliferación y migración de las células epiteliales corneales, y menor en cuanto a su diferenciación^{70,117}. Sin embargo, en estudios que comparan exclusivamente el PRGF y el SA, se ha observado una capacidad similar entre ambos¹⁷ o superior para el PRGF¹¹⁷ en cuanto a capacidad proliferativa y migracional, con una mayor estimulación de la diferenciación celular corneal por parte del PRGF.

En cuanto a la eficacia in vivo de los hemoderivados ricos en plaquetas, incluido el PRGF, parece ser similar o superior a la del grupo del SA, con perfiles de seguridad y tolerancia equiparables entre ambos grupos aunque con las limitaciones de comparar grupos tan heterogéneos.^{58,59,71,72}. No existen hasta la fecha estudios clínicos comparativos entre el PRGF y el SA.

2.4.2 Suero de cordón umbilical.

El suero de cordón umbilical procede de la sangre extraída del cordón una vez clampado al finalizar el parto. El suero de cordón umbilical comparte, por su procedencia hemática, propiedades con el SA y los preparados ricos en plaquetas, aunque con la ventaja añadida de la presencia de abundantes células madre en su composición⁷³.

Otra ventaja es la posibilidad de obtener una cantidad mucho mayor de colirio por cada extracción, en comparación con los otros dos hemoderivados.

Como desventaja, sin embargo, está su origen heterólogo, lo cual pudiera limitar su tolerancia y ocasionar la transmisión de microorganismos.

La experiencia con el suero de cordón umbilical es aún reducida, aunque algunos trabajos comparativos entre el SA y el de cordón umbilical

apuntan a una tasa de curación epitelial corneal mayor y más rápida a favor del segundo⁹⁵.

2.5 EMPLEO DEL PRGF EN MEDICINA

El PRGF ha sido utilizado con buenos resultados en Odontología y cirugía maxilofacial, en Traumatología, Ortopedia y Medicina del deporte, en Dermatología, en Cirugía Estética y recientemente, en Oftalmología.

2.5.1 Odontología y cirugía maxilofacial

La aplicación del coágulo de PRGF obtenido a partir de la F3 revestido con una membrana de fibrina (F1) en el alveolo postextracción de la pieza dental dañada, constituye la primera utilización clínica del PRGF¹⁰. Desde entonces, se han extendido sus usos a las recesiones gingivales, la humectación de los implantes dentales para favorecer su osteointegración, reconstrucciones del hueso maxilar atróficos^{16,19,39}, etc.

2.5.2 Traumatología, Ortopedia y Medicina del deporte.

En esta área el PRGF ha sido empleado en las lesiones de tendón de Aquiles y del manguito de los rotadores, tanto a través de inyecciones percutáneas³⁹ como a modo de coágulo durante la reparación quirúrgica de roturas agudas o tendinosis^{22, 21}.

Las rupturas del ligamento cruzado anterior, asociadas o no a lesiones del menisco⁵¹ así como los desgarros musculares²¹ y lesiones osteocondrales traumáticas, degenerativas o necróticas²² también han sido tratadas con buenos resultados.

2.5.3 Dermatología.

La indicación fundamental del PRGF en dermatología es la aplicación del coágulo de las fracciones inferiores de PRGF sobre úlceras cutáneas de evolución tórpida, como las úlceras necrotizantes o postcirugía habituales de los pacientes diabéticos^{20,55}.

2.5.4 Cirugía Estética.

Recientemente se ha descrito el empleo de inyecciones de PRGF para la regeneración cutánea de la piel envejecida, mostrando porcentajes de incremento de la hidratación basal en los pacientes tratados con PRGF, a los tres y seis meses de la aplicación del tratamiento, significativamente superiores a los obtenidos con el ácido hialurónico⁷⁴.

2.5.5 Oftalmología.

Nuestro grupo publicó en 2007, un primer caso de aplicación oftalmológica del PRGF en la necrosis del flap post- LASIK de un paciente secundaria a la afectación del nervio trigémino por un accidente cerebrovascular⁷¹. Posteriormente, aportamos la experiencia del tratamiento con PRGF en dos series de casos: una de defectos epiteliales persistentes (DEP)⁷⁵ y otra de síndrome de ojo seco resistente a los

tratamientos convencionales⁷², obteniendo, en ambos casos resultados esperanzadores y con un perfil de seguridad y tolerancia elevados.

2.6 UTILIZACIÓN DEL PRGF EN OFTALMOLOGÍA

El PRGF es un producto rico en una gran cantidad de los factores de crecimiento, citocinas y proteínas de adhesión implicadas en los mecanismos de reparación y regeneración corneal.

A priori, ello lo convierte en un potencial inductor de la cicatrización corneal y por lo tanto, en un atractivo tratamiento para los DEPs, en los que es prioritario un cierre epitelial rápido con el fin de minimizar o, en el mejor de los casos evitar las correspondientes secuelas permanentes sobre el mantenimiento de la estructura corneal y en consecuencia, sobre la función visual.

Estas propiedades pueden ser igualmente útiles en el síndrome de ojo seco, donde el PRGF actuaría previniendo el daño epitelial corneoconjuntival secundario al déficit lagrimal, al favorecer el mantenimiento y renovación de sus células.

Su origen a partir de la propia sangre del paciente, teniendo en cuenta la similitud en composición entre ésta y la lágrima, no ya sólo en cuanto a componentes esenciales y características físico-químicas, lo convertirían en un apropiado sustituto biológico de la lágrima natural.

EL PRGF podría resultar igualmente beneficioso como adyuvante en procedimientos de reconstrucción de la superficie ocular así como en una amplia gama de patologías que alteran la integridad epitelial superficial, como las distrofias, las erosiones corneales recurrentes postraumáticas, la queratoconjuntivitis límbica superior, etc.

Ahora bien, la córnea presenta una serie de características anatómicas y funcionales que la diferencian de la mayoría de los tejidos, y que es necesario conocer como paso previo a la aplicación del PRGF.

Repasaremos a continuación brevemente la anatomía de la córnea y sus mecanismos de mantenimiento y regeneración haciendo hincapié en el papel de la lágrima en estos procesos.

Posteriormente repasaremos las dos patologías oculares en las que el PRGF podría resultar de especial interés: los DEP y el ojo seco.

2.6.1 Anatomía y propiedades de la córnea.

La córnea, presenta unas características y propiedades únicas respecto a otros tejidos del cuerpo.

Se trata de un tejido transparente, avascular y con una alto grado de regularidad y diferenciación. La córnea puede ser considerada, además, una estructura prácticamente acelular, debido a que las tres líneas celulares en ella presentes, esto es, las células epiteliales, los queratocitos y las células endoteliales, ocupan un porcentaje extremadamente bajo en relación a su masa total.

Se encuentra separada de la esclera adyacente por el limbo, una estructura altamente vascularizada, que constituye el reservorio de las células madre pluripotenciales corneales y que, en condiciones normales, actúa como un obstáculo insalvable para el crecimiento de los vasos sanguíneos y epitelio conjuntivales hacia la córnea.

La avascularidad corneal obliga a un metabolismo prácticamente anaerobio y dependiente para su consecución de la vehiculización de los nutrientes y demás factores esenciales a través de un sistema exclusivo: la película lagrimal, desde su cara anterior y el humor acuoso, desde su cara posterior.

La córnea presenta una de las densidades más altas de terminaciones nerviosas de todo el organismo, lo que la dota de una sensibilidad extrema, que resulta ser unas 300-400 veces superior a la de la piel y unas 100 veces superior a la de la conjuntiva adyacente.

Posee una morfología convexa y esférica, motivada por la distinta curvatura de sus superficies anterior y posterior. El radio de curvatura corneal no es constante, siendo mayor en su centro y adquiriendo un aplanamiento progresivo hacia la periferia. Esto mismo puede ser aplicado a su grosor, que varía desde unas 530 μm en su zona central a unas 700 μm en su periferia.

Tiene un índice de refracción de 1,3375 y un poder dióptrico aproximado de 43,25 dioptrías, lo que supone un 75% de la potencia óptica total de un ojo humano sano. Constituye, por tanto, la principal lente del sistema óptico ocular.

La córnea está compuesta por un epitelio escamoso no queratinizado con su membrana basal, una zona acelular colágena conocida como membrana de Bowman, un estroma de tejido conectivo y una capa de células endoteliales, con su membrana basal, conocida como membrana de Descemet.

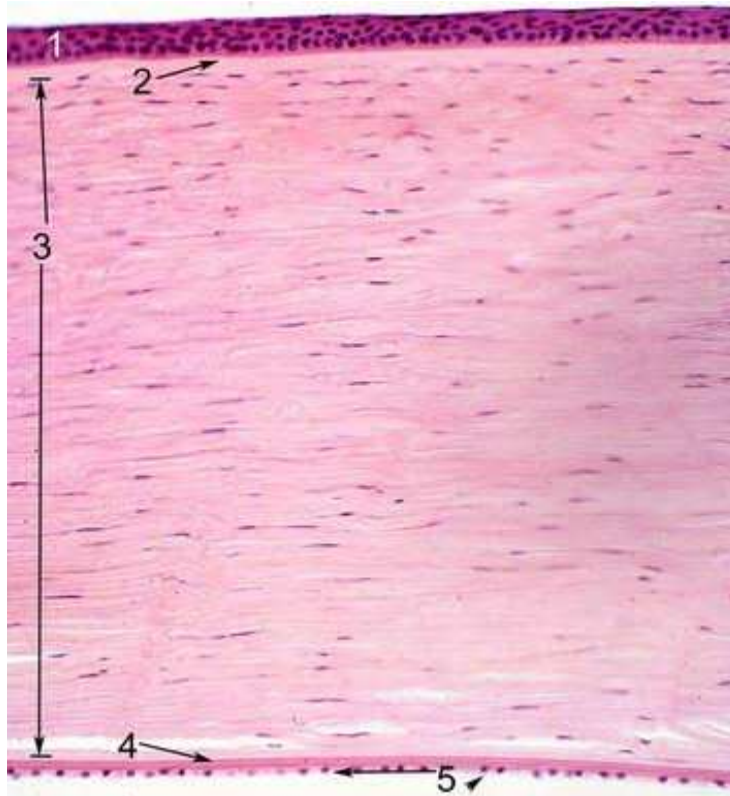


Figura 2 Histología de la córnea.

1: Epitelio. 2: Membrana de Bowman. 3: Estroma. 4: Membrana de Descemet. 5: Endotelio.

El **epitelio** tiene un grosor de en torno a unas $50\mu\text{m}$ y está compuesto por entre 5-7 capas de células epiteliales, de las cuales la más inferior es una monocapa de células epiteliales basales, seguida de unas 2-3 capas intermedias de células epiteliales aladas y otras 2-3 capas de células epiteliales superficiales o células escamosas.

Las uniones estrechas entre las células epiteliales superficiales, junto con las interdigitaciones de sus membranas convierten al epitelio en una barrera mecánica efectiva frente a la penetración hacia el estroma de líquido desde la lágrima así como de microorganismos y tóxicos.

Las células epiteliales segregan una membrana basal (MB) principalmente compuesta por colágeno de tipo IV y laminina, aunque también forman parte de ella la fibronectina, el colágeno tipo VII, el heparán sulfato y la fibrina.

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

La unión entre las CEC y la membrana basal se lleva a cabo por medio de unos complejos de anclaje, constituidos por la fijación de los hemidesmosomas de las células epiteliales basales a fibras de colágeno tipo VII que atraviesan la membrana basal y penetran intraestromalmente.

El epitelio sufre una renovación constante, cada 7-14 días, a cargo de la proliferación de las células germinales, situadas en el limbo inmediatamente por encima de la membrana basal, en lo que se conoce como empalizadas de Vogt.

La migración centrípeta y superficial de las células madres limbares se acompaña 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

Una vez completado el proceso de maduración, se producirá la descamación epitelial hacia la lágrima.

El **estroma** representa el 90% del grosor corneal. Está constituido en su gran mayoría por fibras de colágeno de tipo I, y en menor medida, de los tipos III, V y VI, ordenadas, según su orientación, que alterna entre vertical y horizontal, en unas 200-250 láminas paralelas a su superficie.

El componente celular del estroma, que representa menos del 5% de su peso, está representado por los queratocitos (fibroblastos del estroma). Estos se hallan intercalados entre las fibras y embebidos en una matriz extracelular compuesta por los proteoglucanos (fundamentalmente queratán sulfato asociado a decorina) y colágeno que ellos mismos sintetizan.

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 al 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 la 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.

El **endotelio** está formado por una única capa de células de morfología hexagonal dispuestas a modo de mosaico. Su densidad celular en adultos jóvenes es de aproximadamente 3.500 c/mm^2 . Puesto que las células endoteliales carecen de capacidad de replicación, a medida que su población celular va disminuyendo, las células irán elongándose y diseminándose para tapizar por completo la superficie posterior de la córnea.

La transparencia corneal depende en gran medida del correcto funcionamiento de la bomba Na/K ATP-asa presente en las células endoteliales. El bombeo de iones al humor acuoso por parte de ésta,

permite contrarrestar la presión oncótica positiva de los proteoglucanos estromales, lo que mantiene a la córnea en un estado justo de hidratación (de entorno al 78%).

La **inervación corneal** deriva de los nervios ciliares posteriores largos, ramificaciones de la división oftálmica del nervio trigémino (V par craneal). Las fibras nerviosas forman un anillo alrededor del limbo y desde allí penetran radialmente en la córnea a nivel del estroma profundo periférico, cursando anteriormente y anastomosándose a nivel subepitelial. Tras ello atraviesan la capa de Bowman y siguen una trayectoria anterior que finaliza a nivel de las células aladas.

Los neuropéptidos liberados por estas terminaciones nerviosas, como por ejemplo la sustancia P, tienen una notable transcendencia en la fisiología del epitelio corneal.

En suma, el mantenimiento de estas particularidades estructurales corneales, garantizará la transparencia, potencia óptica, integridad y grado de resistencia adecuadas para que la córnea pueda contribuir correctamente a la función visual así como al aislamiento y protección de las estructuras internas del globo ocular del medio externo y sus potenciales estímulos lesivos.

2.6.2 Mecanismos de reparación y regeneración corneales: papel de los factores de crecimiento.

A pesar de las peculiaridades estructurales anteriormente descritas, los procesos de reparación puestos en marcha tras la agresión corneal son muy similares a los de los demás tejidos.

Así, tras sufrir un estímulo lesivo a nivel corneal, se sucederán, al igual que en otras partes de la economía corporal, una primera fase de estabilización de la herida, seguida de una fase reparativa, en la que primarán la proliferación celular y producción de matriz extracelular, y por último, de una fase remodeladora o regenerativa en la que tendrá lugar una diferenciación y organización del nuevo tejido creado hasta alcanzar, en condiciones ideales, las características 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, desde la membrana de Bowman al endotelio, será reparada dejando una cicatriz, esto es, un tejido desestructurado y que además de no tener las propiedades tensiles y refractivas de la córnea sana, producirá una opacidad focal que, dependiendo de su localización, extensión e intensidad, comprometerá en mayor o menor medida la visión.

La primera reacción corneal frente a una erosión a nivel epitelial, es el desencadenamiento de una intensa actividad bioquímica en el área dañada y sus alrededores en respuesta a las señales procedentes de las células degeneradas o de la exposición de la MB. Dicha actividad tiene como finalidad la reorganización celular y la consecución de una serie de cambios morfológicos y funcionales por parte de las CEC sanas. Este

periodo, conocido como fase de latencia, se prolongará durante aproximadamente 1 hora.

Una vez concluida la fase de latencia, las células basales epiteliales localizadas en los bordes de la herida comienzan a aplanarse y a extender pseudópodos hacia la MB y matriz extracelular (MEC) desnudas. Dichos cambios morfológicos dependen de la contracción de los microfilamentos de actina presentes en el citoplasma de las CEC y que, a su vez, se encuentran unidos por medio de la vinculina a receptores transmembrana selectivos para la fibronectina, laminina y colágeno.

La fibronectina aparece inmediatamente tras la agresión, tanto como producto de las CEC como vehiculizada a través de la lágrima. Las moléculas de fibronectina se depositan sobre la MB y estroma expuestos, y establecen uniones con el colágeno y proteoglucanos, constituyendo una matriz provisional sobre la que tiene lugar la primera oleada de migración celular.

El fin de esta primera fase de estabilización del defecto epitelial supone la llegada de los neutrófilos polimorfonucleares a través de la lágrima al lugar de la lesión y su acción fagocítica sobre los restos de las células destruidas.

El inicio de la fase reparativa tiene lugar aproximadamente a las 6 horas de la lesión y está representado por el avance en sábana de las CEC basales sobre la superficie de la herida. Ello es posible gracias a la desaparición de los hemidesmosomas de las células basales y al aumento de la síntesis de vinculina.

A medida que el manto de células basales progresa, proceso desarrollado a una velocidad de aproximadamente $0,75 \mu\text{m}/\text{min}$, la capa epitelial superficial de los márgenes de la herida se adelgaza y comienza, asimismo, a desplazarse hacia el área dañada inmediatamente por encima del frente de avance de las células basales.

Las células que han migrado serán sustituidas por nuevas CEC formadas a partir de la mitosis de las células germinales limbares. La migración finalizará una vez las CEC repobladoras entren en contacto físico con las CEC de los restantes márgenes de la herida, lo que provoca una inhibición por contacto de la misma.

A medida que el defecto epitelial es reparado, las células basales reestablecerán complejos de adhesión con la MB y el estroma, mientras que las capas epiteliales suprayacentes se engrosarán y adquirirán sus características de diferenciación, recuperándose paulatinamente el efecto barrera del epitelio intacto.

Sin embargo, pese a que este proceso en condiciones normales dura pocos días, serán necesarias varias semanas para que el epitelio vuelva a recuperar la resistencia y adhesividad a la MB previos a la lesión.

Ahora bien, cuando el estímulo traumático además de erosionar el epitelio, produce una disrupción estromal, el proceso cicatricial se ralentiza debido a que la activación y reacción de los queratocitos sanos

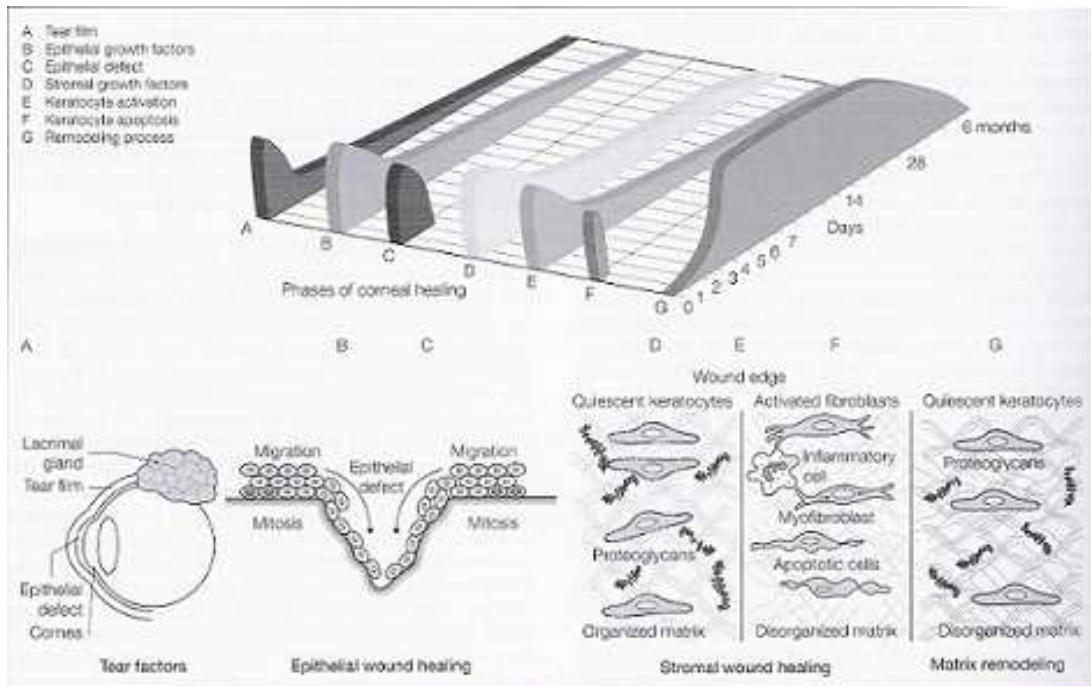
circundantes es lenta y su número, escaso. En este caso, se considera que el factor limitante para el inicio de la reparación corneal, es la apoptosis sufrida por los queratocitos de las inmediaciones de la lesión.

Los queratocitos activados sufren mitosis y diferenciación a fibroblastos y miofibroblastos. Ambos fenotipos celulares tienen una capacidad incrementada de síntesis de proteoglicanos y colágeno y capacidad migratoria. Los miofibroblastos, además, poseen la facultad de contraerse. Tanto la migración como la síntesis de MEC en el área lesionada, se producirán una vez que el epitelio haya recuperado su integridad y los monocitos y neutrófilos hayan fagocitado los restos estromales degenerados.

Las características de la nueva MEC formada son, sin embargo, diferentes a las fisiológicas. Así, aunque el colágeno mayoritario de la nueva MEC sea también el de tipo 1, el diámetro de sus fibras será mayor y su orientación será heterogénea. Los proteoglicanos producidos no respetarán las proporciones fisiológicas, teniendo lugar un incremento relativo del dermatán y heparán sulfato con respecto al queratán sulfato. La MEC resultante tiende a captar más agua y ello, sumado al aumento de la celularidad estromal, ocasiona la opacidad del estroma cicatricial. Los miofibroblastos al contraerse, podrán originar un astigmatismo irregular al provocar una deformación focal del tejido.

Durante meses la nueva matriz será remodelada por las metaloproteasas y los queratocitos activados irán volviendo a su estado basal quiescente e hiposecretor. No obstante, la opacificación corneal sólo regresará en parte, y la cicatriz estromal nunca adquirirá la fuerza tensil original.

Los nervios corneales también sufren una lenta regeneración, que se prolonga durante meses e incluso años, y tampoco en este caso, como sucede con el estroma, se consigue alcanzar el estado basal.



Adaptado de Krachmer 2005

Figura 3 Esquema y cronología de las fases de cicatrización corneal epitelial y estromal.

A: Película lagrimal. B: Factores de crecimiento epiteliales. C: Defecto epitelial. D: Factores de crecimiento estromales. E: Activación queratocítica. F: Apoptosis queratocítica. G: Proceso de remodelado.

La regulación de los mecanismos de reparación y regeneración corneales es mediada fundamentalmente por la acción de proteasas, citocinas y factores de crecimiento, segregados a nivel autocrino, paracrino y exocrino en un proceso en el que la interacción entre el epitelio y el estroma adquiere una gran transcendencia.

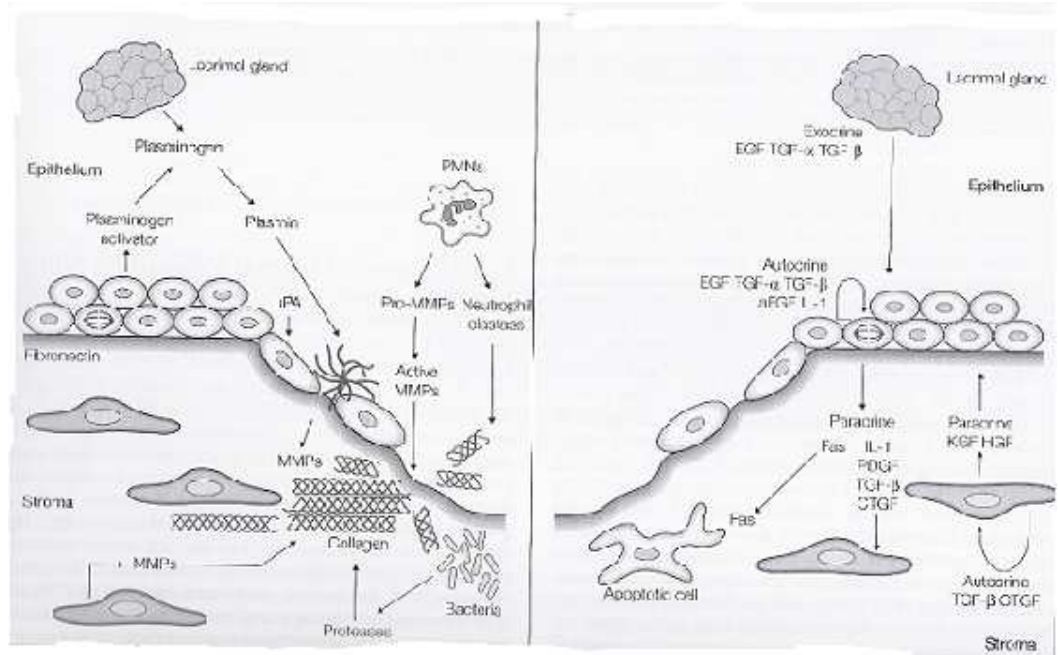
Las **proteasas** se dividen en dos grupos: las metaloproteasas o proteasas de matriz (MMPs) y las proteasas séricas (tPA, uPA, proteasas de neutrófilos) y son producidas tanto por las células corneales como por los neutrófilos y macrófagos.

Las proteasas son fundamentales durante la migración de las CEC puesto que son las encargadas de inducir la destrucción de los complejos de anclaje CEC-MB. Asimismo, participan en la degradación de los componentes dañados de la MEC y en el remodelamiento del tejido cicatricial recién formado. Así, por ejemplo, la uroquinasa-activadora del plasminógeno (u-PA), liberada por las CEC del frente de avance cicatricial activará la plasmina, la cual degradará la fibronectina y laminina de la MEC dañada y activará a otras proteasas, como las gelatinasas.

Las **citocinas**, entre las que destacan la IL-1, la IL-6 y el TNF- α , desarrollan acciones proapoptóticas y quimiotácticas. De forma similar a los factores de crecimiento, las citocinas y sus receptores son expresadas por las células corneales tras una agresión, aunque su liberación deriva mayoritariamente de las células inflamatorias (linfocitos, monocitos y macrófagos, polimifonucleares, etc).

Algunas de ellas, como la IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 pueden ser encontradas en baja cantidad en la lágrima en condiciones normales.

La IL-1, IL-6 y TNF- α inducen la migración de las CEC. Además, la IL-1, almacenada en las CEC, será liberada por las CEC dañadas tras lo cual difunde al estroma estimulando las síntesis del ligando Fas por los queratocitos. Una vez unido el ligando Fas a sus receptores en los queratocitos, inducirá la apoptosis de los mismos. El ligando Fas es sintetizado de modo inmediato a la lesión por las CEC y queratocitos.



Adaptado de Krachmer 2005

Figura 4 Modulación de la cicatrización corneal. Papel y origen de algunos de los principales GF, citocinas y proteasas.

MMPs: metaloproteasas. **Lacrimal gland:** glándula lagrimal. **CTGF:** Factor de crecimiento de tejido conectivo.

Papel de los factores de crecimiento ^{76,77,78}

Los factores de crecimiento principalmente implicados en los mecanismos de reparación y regeneración corneales son: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento queratinocítico (KGF), el factor de crecimiento hepatocitario (HGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF-I), el factor transformante β (TGF- β), el factor derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF).

o Familia EGF:

Los miembros de la familia EGF más implicados en la cicatrización epitelial son el EGF, el factor de crecimiento transformante α (TGF- α), el factor de crecimiento tipo EGF de unión a la heparina (HB-EGF) y la epirregulina.

Todos ellos son segregados como proteínas de anclaje a la membrana, siendo posteriormente procesados a este nivel para dar lugar a los factores solubles bioactivos.

El EGF y el TGF- α se unen exclusivamente a los receptores de membrana erb-1 de las CEC, mientras que el HB-EGF y la epirregulina, se unen también a los receptores erb-4.

El EGF es sintetizado por las CEC, plaquetas, macrófagos y fibroblastos y actúa de forma paracrina sobre las células epiteliales. En córneas desepitelizadas se ha detectado un incremento de los niveles de mRNA de HB-EGF y TGF- α , pero no de mRNA de EGF, lo que ha llevado a postular una implicación indirecta del mismo en el proceso de cierre fisiológico. Sin embargo, su capacidad de reepitelización ha sido probada en diferentes estudios in vitro e in vivo⁷⁹.

El TGF- α es un componente constante de la lágrima, y al igual que el HB-EGF y el EGF estimula la proliferación y migración corneal epitelial e inhibe el marcador de diferenciación queratina K3. El TGF- α también está implicado en el cierre palpebral, y actúa de modo sinérgico con el HB-EGF en la estimulación de la extensión del frente de avance en sábana de las CEC durante el cierre palpebral.

El HB-EGF parece ser el miembro más potente en la inducción de la regeneración corneal puesto que muestra además una retención incrementada en la superficie del tejido lesionado y su unión al receptor erb-4 se ha relacionado con la generación de las protrusiones de las CEC.

La epirregulina parece tener un papel en el mantenimiento de la capacidad proliferativa de las células basales limbares.

○ KGF:

El KGF es un miembro de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y es también conocido como FGF-7.

Es producido por los queratocitos y las células endoteliales, habiéndose detectado del mismo modo, niveles incrementados del mismo en la glándula lagrimal en situaciones de laceración corneal.

Ejerce su acción de forma paracrina y exocrina sobre las CEC, estimulando su crecimiento y proliferación, sin afectar a su migración. Dicha acción es más marcada a nivel del epitelio periférico corneal.

○ HGF:

El HGF es producido a nivel de los fibroblastos estromales y actúa sobre las CEC de modo paracrina. Al contrario que el KGF, su expresión y sus receptores son más abundantes en la córnea central que en la periférica.

El HGF facilita la proliferación y migración de las CEC e inhibe su apoptosis. Se cree que su acción sobre la migración la realiza por medio de la activación del receptor de EGF.

○ IGF-1:

El IGF-1 regula la proliferación, migración y diferenciación celular, así como su supervivencia, al inhibir la apoptosis. La IGF-1 y su receptor son expresados tanto por los queratocitos como por las CEC.

La administración exclusiva de IGF-1 no ha probado tener beneficios in vitro o in vivo, pero sí en combinación con la sustancia P, por la sinergia entre ambas proteínas.

El IGF-1 induce la expresión de conexina por los fibroblastos corneales, influyendo, por tanto, positivamente en la comunicación interqueratocítica mediada por las uniones gap.

○ TGF- β :

La familia TGF- β consta de tres miembros: el TGF- β 1, el TGF- β 2 y el TGF- β 3, aunque sólo las dos primeras han sido detectadas en el segmento anterior del ojo.

El TGF- β es segregado de forma inactiva, a modo de complejo dimérico unido a un péptido asociado a latencia (LAP) y es activado mediante su disociación del LAP.

El TGF- β 1 y β 2 son de origen epitelial, estromal y lagrimal, siendo el TGF- β 2 la isoforma predominante en condiciones normales. No obstante, cuando la lágrima se acidifica, el TGF- β 1 se convierte en el mayoritario.

Sus receptores están localizados en las tres estirpes celulares corneales.

El TGF- β 1 y β 2 inhiben la proliferación de las CEC e inducen la proliferación y migración de los fibroblastos corneales así como la alteración de la síntesis por parte de estos de los proteoglicanos de la MEC. En particular, induce un aumento de la síntesis de dermatán y heparán sulfato en detrimento del queratán sulfato, lo que contribuye a la generación de un tejido fibrótico.

El TGF- β es un factor modulador de la acción de otros GF. Concretamente, inhibe de forma débil la proliferación CEC mediada por EGF y de forma intensa, la mediada por KGF y HGF. Asimismo concentraciones bajas de TGF- β promueven la producción de PDGF, mientras que concentraciones altas, inhiben la expresión del receptor de PDGF.

La presencia del TGF- β en el humor acuoso se ha relacionado con la inhibición de la angiogénesis y con el privilegio inmunitario de la cámara anterior (ACAID).

○ PDGF:

El PDGF es un dímero compuesto por dos cadenas denominadas A y B. De la combinación de ambas derivan las tres isoformas del PDGF: PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB.

El PDGF-BB es producido por las CEC basales y ejerce un efecto positivo sobre la migración de los queratocitos y las células endoteliales.

Tanto el PDGF-BB como el AA, han mostrado estimular la quimiotaxis de las CEC en presencia de fibronectina.

Del mismo modo que el TGF- β posee un rol en la regulación de los efectos del PDGF, el PDGF modula la respuesta proliferativa de los fibroblastos secundaria al TGF- β .

○ FGF:

La familia del FGF contiene más de 20 proteínas, de las cuales, el FGF-acídico (a-FGF) y el FGF- básico (b-FGF) son los que se han encontrado en mayor cantidad a nivel corneal.

Mientras que el a-FGF está fundamentalmente presente en el endotelio y la membrana de Descemet, el b-FGF y su receptor aparece en las tres líneas celulares corneales.

Su acción principal es la estimulación de la proliferación de los fibroblastos y la migración de éstos y las células endoteliales.

Posee un efecto modulador negativo sobre la expresión del TGF- β 1.

○ NGF:

El NGF es liberado fundamentalmente por los nervios corneales, aunque también puede ser detectado a nivel epitelial, estromal y endotelial. Su receptor se halla mayoritariamente a nivel epitelial y endotelial.

El NGF es vital para el trofismo y homeostasis corneal. Su acción principal es la regeneración de los nervios corneales, aunque también tiene un efecto estimulante sobre la proliferación y diferenciación de las CEC y queratocitos, aunque éste es menor que el de otros GF.

Regula positivamente la liberación de neuropéptidos y otros GF, como el TGF- β y la angiogénesis.

En la siguiente tabla podemos ver el origen y las acciones de los principales GF implicados en dichos procesos.

GF	ORIGEN	DIANA	EFECTO
Familia EGF 1. EGF 2. TGF- α 3. Hb-EGF 4. Epirregulina	Gl.lagrimal CEC	CEC	(+) Proliferación y migración (-) Expresión de marcadores de diferenciación* ¹ (+) Cierre palpebral* ²
KGF (FGF-7)	Queratocitos C. endoteliales Gl. lagrimal	CEC (limbares)	(+) Proliferación
HGF	Queratocitos	CEC (centrales)	(+) Proliferación y migración
IGF-1 e insulina	Gl. Lagrimal	CEC Queratocitos	(+) Proliferación (+) Migración (sólo de CEC) (-) Apoptosis
TGF- β (Is 1-3)	CEC Queratocitos Gl. Lagrimal CC y MT	CEC Queratocitos C. endoteliales	(-) Proliferación de CEC (+) Proliferación, migración y diferenciación de queratocitos (+) Síntesis de MEC (+) ACAID Regula la (+) proliferación del PDGF
PDGF (Is AA, AB, BB)	CEC	Queratocitos	(+) Proliferación Regula la (+) proliferación del TGF- β
FGF (Is α , β)	C. endoteliales	CEC Queratocitos C.endoteliales	(+) Proliferación (+) Migración (sólo de queratocitos y c.endoteliales) (+) Angiogénesis (-) Expresión de TGF- β 1
NGF	N. corneales	CEC Queratocitos C.endoteliales	(+) Proliferación y diferenciación (CEC sobre todo) (+) Producción de TGF- β (+) Angiogénesis

Tabla 5 Principales GF implicados en la cicatrización corneal.

GI: Glándula. **CEC:** Células epiteliales corneales. **C:** Células. **CC:** Cuerpo ciliar. **MT:** malla trabecular. **N:** nervios. **ACAID:** Desvío inmunitario asociado a la cámara anterior. *¹: Inhibe la expresión del marcador de diferenciación queratina tipo 3. *² Estimula la migración en sábana de las CEC durante el cierre palpebral (acción sinérgica entre el TGF- α y el HB-EGF).

2.6.3 Relevancia de la lágrima en la homeostasis y reparación de la superficie ocular.

El término superficie ocular hace referencia a la unidad formada por el epitelio conjuntival y corneal, es decir, la parte del globo ocular expuesta al medio ambiente⁹⁷.

El epitelio conjuntival está compuesto por células estratificadas no queratinizadas entre las que se distribuyen las células caliciformes productoras de mucina. A diferencia del epitelio corneal, carece de una membrana basal organizada y descansa sobre un tejido conectivo fibrovascular conocido como sustancia propia. Éste se divide en una capa más superficial o adenoidea, donde residen los linfocitos y una más profunda, con vasos sanguíneos y linfáticos y terminaciones nerviosas.

La película lagrimal se encuentra en íntima conexión con ambos epitelios, siendo vital para la regulación de su estabilidad y viabilidad ya que, por un lado, actúa como una barrera húmeda que los protege físicamente de las agresiones a las que se ven continuamente sometidos, y por otra parte, aporta las moléculas necesarias para su metabolismo. La lágrima, como veíamos anteriormente, desempeña asimismo un importante papel en la óptica ocular.

La lágrima está formada por una capa superficial o lipídica, que tiene como fin evitar la evaporación excesiva del contenido acuoso, y una capa acuosa, con una presencia creciente de mucinas a medida que nos acercamos a su parte basal o zona de unión a las membranas celulares epiteliales.

Está compuesta por una gran cantidad de proteínas, electrolitos y nutrientes necesarios para el metabolismo corneal, entre los que destacan el oxígeno, el agua, el cloro, el potasio y la glucosa.

También contiene proteínas estructurales como la albúmina y la fibronectina, así como factores de crecimiento y proteínas asociadas a efectos antimicrobianos, como la lisozima, lactoferrina, inmunoglobulina A secretada (slgA), peroxidasa, lipocalina y lipofilina.

En la siguiente tabla podemos ver las principales características físico-químicas de la lágrima.

COMPOSICIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LA PELÍCULA LAGRIMAL	
Índice de refracción	1,336
Grosor	7-40µm
pH	7,2-7,4
Osmolaridad	300-305 mOsm/l
Electrolitos	Cl, K, Na
Proteínas antimicrobianas	Lactoferrina, lisocima, TNF-α, peroxidasa, lipocalina, fosfolipasa A
Nutrientes	Oxígeno, agua, glucosa
Proteínas estructurales	Albúmina, fibronectina
Inmunoglobulinas	slgA, IgE, IgG y complemento
Factores de crecimiento	EGF, TGF-α, TGF-β, HGF, FGF, VEGF, PDGF-BB
Neuropéptidos	Sustancia P, péptido relacionado con la calcitonina
Proteasas	MMP, α2-macroglobulina

Tabla 6 Composición físico-química de la lágrima.

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 ésta se encuentre. Es el caso de la β -2-microglobulina, las inmunoglobulinas, la sustancia P, el EGF, el TGF- β (1 y 2), la plasmina y la α -1-antitripsina, entre otras. A modo de ejemplo, se ha constatado un incremento de los niveles de la familia EGF y del TGF- β 1 ante la agresión mecánica y química epiteliales, con una elevación particular del TGF- β 1 en situaciones de acidificación del pH lagrimal.

La secreción lagrimal está sometida a un continuo control nervioso, y aunque no se conocen del todo los mecanismos que la regulan, se acepta que la secreción tanto de la glándula lagrimal principal como de las accesorias y lipícas están mediadas por una rama aferente dependiente de las terminaciones nerviosas del V par craneal y una rama eferente más indirecta y compleja en la que participan las fibras parasimpáticas del VII par, el equilibrio entre andrógenos y estrógenos y el parpadeo.

Dicho control hace que la lágrima sea una solución dinámica, con un volumen basal al que se añade, según la estimulación de la superficie ocular, un volumen reflejo mayor o menor.

Situaciones en las que dicho control sea alterado o bien, exista un déficit secretor a nivel glandular, producirán un déficit cualitativo y/o cuantitativo de la misma y con ello, de los diversos componentes biológicamente activos en ella presentes, poniendo en riesgo el mantenimiento y funcionamiento de la superficie ocular.

2.6.4 Posibles indicaciones oftalmológicas del PRGF: los defectos epiteliales persistentes y el ojo seco.

2.6.4.1 Defecto epitelial persistente (DEP).

2.6.4.1.1 Definición.

Un defecto epitelial persistente corneal se define como una lesión epitelial de más de 2 mm de diámetro y más de dos semanas de duración y es resistente a la aplicación de los tratamientos convencionales^{80,81,82}.

Los DEPS tienen un aspecto biomicroscópico característico consistente en una úlcera de bordes redondeados, grisáceos y ligeramente sobreelevados de localización central o paracentral inferior.

2.6.4.1.2 Etiopatogenia

La etiopatogenia de los defectos epiteliales persistentes es muy variada, aunque las dos causas principales son las disfunciones neurogénicas y el síndrome de ojo seco severo. Otros agentes etiológicos incluyen: las causticaciones químicas, alteraciones inmunológicas, distrofias del epitelio y la membrana basal, alteraciones metabólicas, yatrogenia (retraso de la cicatrización epitelial postquirúrgica), traumatismos e incluso infecciones.

Los defectos epiteliales persistentes secundarios a disfunciones neurogénicas reciben también la denominación de úlceras o queratopatía

neurotróficas, y son consecuencia de la afectación del V par craneal, lo que provoca una hipoestesia o anestesia corneal.

El daño trigeminal puede deberse a la traumatismos quirúrgicos (ablación del ganglio trigémino, queratoplastia penetrante, LASIK...), accidentes cerebrovasculares, esclerosis múltiple, tumores (neurinoma del acústico, neurofibromas..), diabetes mellitus I y II, abuso de determinados fármacos tópicos(anestésicos, AINES..), a los virus herpes simple y zoster e incluso a neuropatías hereditarias (disautonomía de Riley-Day).

2.6.4.1.3 Fisiopatología

Los DEPS suponen una respuesta cicatricial inadecuada ante la ocurrencia de una disrupción epitelial corneal.

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 germinales limbares, como ocurre en los DEPs asociados a insuficiencias límbicas postcausticación severa ^{80, 83}.

No es infrecuente la coexistencia de varios mecanismos fisiopatológicos en un mismo DEP.

Además de la alteración de la proliferación y migración de las CEC, se ha descrito la presencia de una reepitelización aberrante e inestable, lo que se ha asociado a una disregulación del sistema activador del plasminógeno/plasmina⁸⁴. Dicha disregulación conduce a una permanencia prolongada de la plasmina libre en la superficie ocular. Los niveles incrementados de plasmina en el frente de avance epitelial inducen la reducción y debilidad de los complejos de unión epitelio-MB-fibronectina de la MEC, contribuyendo a la persistencia del defecto epitelial ⁸⁵.

Asimismo, la unión de la plasmina al factor de complemento C3, tiene como resultado la activación del mismo. El C3a (C3 activado) es quimiotáctico para los leucocitos polimorfonucleares, que atraídos al foco de la lesión, liberarán múltiples enzimas hidrolíticas lisosómicas implicadas en el melting estromal.

La plasmina es capaz a su vez de provocar la activación de formas latentes de colagenasas corneales. La acción de todas las enzimas colagenolíticas e hidrolíticas en el área del DEP resulta en la disolución de la membrana basal epitelial y MEC estromal, dificultando aún más la reepitelización al eliminar el sustrato necesario para la migración CEC y conduciendo a una lisis estromal progresiva, que en ocasiones puede terminar en la perforación corneal.

La pérdida prolongada de la barrera epitelial provocará 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 producirá una perpetuación y complicación del curso del defecto epitelial.

2.6.4.1.4 *Tratamiento*

Los DEPs presentan, como su nombre indica, una mala respuesta a los tratamientos convencionales, lo que habitualmente lleva a la asociación de un gran número de ellos durante un tiempo prolongado, provocando que la toxicidad derivada de los mismos contribuya a la perpetuación del DEP.

Entre los tratamientos convencionales se encuentran las lágrimas artificiales, fármacos antiinflamatorios, antibióticos tópicos y orales, inhibidores de enzimas colagenolíticas, lentes de contacto terapéuticas y medidas oclusivas palpebrales, como los parches, la ptosis inducida por toxina botulínica o la tarsorrafia.

El correcto abordaje de los DEPs comprende por un lado la corrección de la enfermedad o mecanismo subyacente, siempre que ello sea posible y por otro lado, la estimulación precoz del cierre epitelial, puesto que la desprotección del estroma anterior propicia la infección y la acción de las enzimas colagenolíticas sobre el mismo, pudiendo producirse una lisis estromal, que en los casos más severos puede llegar a la perforación y ptosis ocular.

Es de vital importancia no abusar del empleo de fármacos tópicos así como administrar aquellos que no contengan conservantes potencialmente tóxicos.

Destacan entre los tratamientos convencionales las lágrimas artificiales sin preservantes, así como las tetraciclinas sistémicas y la medroxiprogesterona, por su actividad inhibitoria sobre las MMP.

En la actualidad disponemos de algunas terapias de origen natural ricas en sustancias regenerativas que han mostrado una mayor eficacia in vivo que los tratamientos convencionales para la curación de los DEPs, como el trasplante de membrana amniótica (TMA)^{86 87} y el suero autólogo^{80,81,82}.

Igualmente se ha descrito el empleo de diversas proteínas recombinantes para la estimulación de la cicatrización epitelial corneal, si bien aún se carece de suficiente experiencia con ellos en humanos. Destacan en este grupo, la fibronectina^{88,89} la albúmina⁹⁰, factores de crecimiento aislados (EGF79, PDGF-BB y AB⁹¹) y factores neurogénicos (sustancia P en combinación con IGF-1^{92 93} y NGF⁹⁴).

Recientemente han aparecido las primeras publicaciones que utilizan suero de cordón umbilical⁹⁵ y derivados hemáticos autólogos ricos en plaquetas^{75,96} para el tratamiento de los DEP.

2.6.4.2 **Síndrome de ojo seco.**

2.6.4.2.1 *Definición.*

“El ojo seco es una enfermedad multifactorial de la película lagrimal y la superficie ocular que causa síntomas de malestar, trastornos visuales e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial en

la superficie ocular. Va acompañado de un incremento en la osmolaridad de la película lagrimal e inflamación de la superficie ocular”.

“El ojo seco se reconoce como un trastorno de la Unidad Funcional Lagrimal (LFU), un sistema integrado formado por las glándulas lagrimales, la superficie ocular (córnea, conjuntiva y glándulas de meibomio) y los párpados, así como los nervios sensoriales y motores que los conectan”.

Dry Eye Workshop 2007 ⁹⁷

No obstante, dicha definición está pendiente de ser revisada próximamente en un nuevo taller internacional de ojo seco.

El ojo seco es una de las patologías oftalmológicas más frecuentes, con una prevalencia creciente con la edad, estimándose que afecta aproximadamente a un 12% de la población general y a un 35% de los mayores de 50 años, siendo la incidencia mayor en las mujeres que en los hombres^{98,99}.

2.6.4.2.2 *Etiopatogenia*

El síndrome ojo seco puede ser dividido en dos grandes grupos: el ojo seco acuodeficiente (OSAD), en el que existe un déficit de la secreción acuosa y el ojo seco evaporativo (OSE), en el que la secreción lagrimal es normal pero existe una evaporación aumentada de la misma.

Ambos grupos no son excluyentes entre sí y la presencia de uno de ellos puede derivar de forma secundaria en el otro. La coexistencia de ambos e incapacidad de establecer el subgrupo de ojo seco principal recibe la denominación de ojo seco mixto.

1. Ojo seco acuodeficiente (OSAD):

En el ojo seco acuodeficiente existe un menor volumen lagrimal debido a la disminución de la secreción lagrimal.

El OSAD se divide a su vez en dos subgrupos principales: el OSAD asociado al síndrome de Sjögren (OSAD SS) y el OSAD no asociado al síndrome de Sjögren (OSAD no SS).

OSAD SS:

El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmune en el que se produce una infiltración por linfocitos T de las glándulas lagrimales y salivales de modo predominante, aunque se pueden ver afectadas otras mucosas, como la gástrica, respiratoria, etc.

Como consecuencia de los cambios inflamatorios glandulares, tiene lugar una destrucción de los acinos y conductos secretores resultando en una hiposecreción lagrimal y salivar así como en la presencia de mediadores inflamatorios en las lágrimas, saliva y el interior de la conjuntiva y mucosa oral.

Existen dos tipos de SS: el primario y el secundario, en el que existe asociada una conectivopatía, como la artritis reumatoide (la más frecuente), el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis biliar primaria, etc.

La frecuencia de DGM es mayor en los pacientes con SS que en la población normal, lo que puede contribuir a una mayor desecación de la superficie ocular.

En la siguiente tabla podemos ver los criterios diagnósticos del SS.

CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN DEL SÍNDROME DE SJÖGREN	
1. SÍNTOMAS OCULARES	Respuesta positiva al menos a 1 de las 3 preguntas siguientes: - ¿Ha tenido problemas por ojos secos diaria y persistentemente durante más de 3 meses? - ¿Tiene una sensación recurrente de tener arena o gravilla en los ojos? - ¿Usa sustitutos de las lágrimas más de 3 veces al día?
2. SÍNTOMAS ORALES	Respuesta positiva al menos a 1 de las 3 preguntas siguientes: - ¿Ha tenido sensación diaria de sequedad de boca durante más de 3 meses? - ¿Ha notado inflamación recurrente o persistente de las glándulas salivares desde que ha llegado a la edad adulta? - ¿Bebe líquidos con frecuencia para facilitar la deglución de alimentos secos?
3. SIGNOS OCULARES	Resultado positivo de al menos 1 de las 2 pruebas siguientes: - Prueba de Schirmer I <5mm en 5 min - Tinción con rosa de Bengala >4 en la escala de Van Bijsterveld
4. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	Sialoadenitis linfocítica focal en las glándulas salivales menores (puntuación focal ≥1)
5. AFECTACIÓN DE LAS GLÁNDULAS SALIVALES	Signos objetivos de afectación de las glándulas salivales, determinadas por el resultado positivo en al menos 1 de las 3 pruebas siguientes: - Gammagrafía salivar. - Hialografía parotídea. - Flujo salival no estimulado ≤ 1,5ml en 15 min
6. AUTOANTICUERPOS	Presencia de al menos 1 de los siguientes autoanticuerpos en suero: - Anticuerpos frente a Ro o SS-A. - Anticuerpos frente a La o SS-B.
* CRITERIOS DE EXCLUSIÓN: linfoma, SIDA, sarcoidosis, enfermedad crónica de injerto contra huésped preexistente, irradiación previa de cabeza y cuello, hepatitis C, uso de anticolinérgicos.	
* SÍNDROME DE SJÖGREN PRIMARIO: presencia de 4 de los 6 criterios o presencia de 3 de los 4 criterios objetivos (criterios 3-6).	
* SÍNDROME DE SJÖGREN SECUNDARIO: asociación a AR, LES, esclerodermia, polimiositis y dermatomiositis o cirrosis biliar primaria.	

Tabla 7 Criterios para la clasificación del síndrome de Sjögren.

AR: Artritis reumatoide. **LES:** Lupus eritematoso sistémico.

OSAD no SS:

El ojo seco acuodeficiente no Sjögren está provocado por una disfunción de la secreción lagrimal donde se excluyen las características sistémicas del SS. La disfunción en la secreción lagrimal puede ocurrir tanto por una deficiencia de la glándula lagrimal como de los conductos excretores e inervación de la glándula.

La forma más común de OSAD no SS se produce por una deficiencia primaria de la glándula lagrimal asociada a la edad. Ello es debido a que con la edad se produce una fibrosis progresiva a nivel periductal y periacinar que desemboca finalmente en la atrofia celular acinar.

En la siguiente tabla podemos ver un esquema de los distintos subtipos de los que se compone el OSAD no SS.

CLASIFICACIÓN DEL OSAD NO SS	
1. DEFICIENCIAS PRIMARIAS DE LA GLÁNDULA LAGRIMAL	Ojo seco relacionado con la edad Alacrimia congénita Disautonomía familiar
2. DEFICIENCIAS SECUNDARIAS DE LA GLÁNDULA LAGRIMAL	Infiltración de la glándula lagrimal (sarcoidosis, linfoma, SIDA). Enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) Ablación de la glándula lagrimal Denervación de la glándula lagrimal
3. OBSTRUCCIÓN DE LOS CONDUCTOS DE LA GLÁNDULA LAGRIMAL	Tracoma Penfigo de ocular cicatricial Eritema multiforme Causticación química/térmica
4. HIPOSECRECIÓN REFLEJA	a.- Bloqueo sensorial reflejo: Uso de lentes de contacto Diabetes Herpes simple/zoster oftálmico Cirugía corneal (LASIK, PRK, QR, queratoplastia, etc) Lesión del núcleo/ división oftálmica del V par craneal Anestésicos tópicos Medicación sistémica (β - bloqueantes, anticolinérgicos..) b.- Bloqueo motor reflejo: Daño en el VII par craneal Neuromatosis múltiple Medicación sistémica

Tabla 8 Clasificación del OSAD no SS en los distintos subgrupos de los que se compone.

2. Ojo seco evaporativo (OSE):

El ojo seco evaporativo se debe a una desecación de la superficie ocular expuesta por una pérdida excesiva de agua en presencia de una secreción lagrimal normal.

Las causas del OSE son múltiples: disfunción de las glándulas de meibomio, trastornos de la apertura palpebral y congruencia párpado/globo ocular, la baja frecuencia de parpadeo, trastornos de la superficie ocular secundarios a hipovitaminosis A o medicaciones tópicas, el empleo de lentes de contacto y la conjuntivitis alérgica.

La disfunción de las glándulas de meibomio (DGM), también conocida como blefaritis posterior, consiste en la obstrucción de las glándulas de meibomio. Es la causa más común de OSE. Puede ser primaria o secundaria a enfermedades locales (blefaritis anterior, quemaduras químicas, tracoma, etc.), enfermedades sistémicas (el acné rosácea, dermatosis seborréica y psoriasis), síndromes (Turner, displasia ectodérmica anhidrótica) o a medicaciones sistémicas (ácido 13-cis-retinoico bifenilos clorados).

2.6.4.2.3 *Fisiopatología*

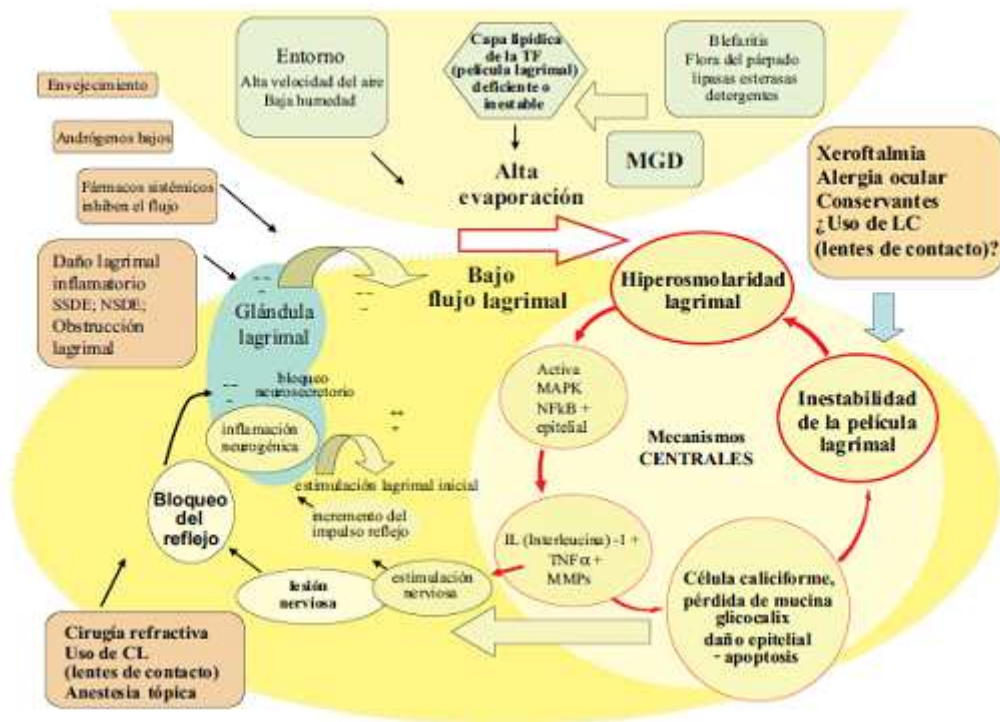
Como consecuencia de la disminución de la lágrima y los factores esenciales aportados por la misma se va a ocasionar un daño en la superficie ocular a través de dos mecanismos finales, que son comunes a las distintas noxas desencadenantes del ojo seco: la hiperosmolaridad y la inestabilidad de la película lagrimal.

La hiperosmolaridad se considera el mecanismo fisiopatológico central en la alteración de la homeostasis de la superficie ocular y los síntomas derivados de la misma. Aparece como consecuencia tanto de una evaporación excesiva del contenido acuoso de la lágrima, como de un bajo flujo lagrimal.

La hiperosmolaridad pone en marcha una cascada de reacciones mediadas por las quinasas MAP y NFκB, las citocinas IL-1α, IL-1β y TNF-α así como por algunas metaloproteasas, como la MMP9. Como resultado tiene lugar una inflamación de la superficie, con un aumento de la permeabilidad epitelial y apoptosis de las células epiteliales corneales y conjuntivales, incluidas las células calciformes. El descenso en la síntesis de mucinas por parte de éstas generará junto con la pérdida de la homogeneidad epitelial una inestabilidad de la película lagrimal, perpetuándose de este modo la cascada lesiva a modo de círculo vicioso. Los cambios anatomopatológicos inducidos por este círculo se traducen en la metaplasia escamosa de los epitelios conjuntival y corneal.

Inicialmente, siempre y cuando la glándula lagrimal sea funcional, la hiperosmolaridad puede ser compensada mediante el aumento de la estimulación refleja de la secreción lagrimal. Sin embargo, una estimulación excesiva mantenida de forma crónica terminará resultando en una disminución de la secreción, según algunos autores por inflamación y agotamiento de la glándula lagrimal y según otros, por una disminución de la sensibilidad corneal.

La inestabilidad de la película lagrimal puede actuar como el suceso desencadenante en algunos subtipos de ojo seco, como la DGM. La inestabilidad, representada por una ruptura prematura de la película lagrimal en el intervalo entre dos parpadeos, origina una sequedad e hiperosmolaridad locales, lo que desemboca en la cascada inflamatoria previamente comentada.



Adaptado del DEWS 2007

Figura 5 Fisiopatología del síndrome de ojo seco.

En el margen derecho de la figura podemos ver el ciclo fisiopatológico originado por la inestabilidad e hiperosmolaridad de la película lagrimal. Vemos cómo la hiperosmolaridad de la lágrima genera un daño epitelial conjuntivo-corneal mediante la activación de la inflamación de la superficie ocular. La lesión epitelial a su vez estimula las terminaciones nerviosas, originando síntomas de sequedad y provocando un incremento inicial de la secreción refleja lagrimal que termina, sin embargo, induciendo la inflamación de la glándula lagrimal con el consiguiente descenso del flujo. Vemos asimismo, representados en cuadros de color naranja los principales factores etiológicos de ojo seco acuodeficiente y en verde, los de ojo seco evaporativo.

2.6.4.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de ojo seco se basa en la presencia de una serie de síntomas y/o signos característicos. A menudo existe una escasa correlación entre la severidad de ambos, siendo frecuente la presencia de importantes síntomas con escasa afectación de las pruebas diagnósticas objetivas y viceversa^{100,101}.

1. Síntomas:

Los síntomas de ojo seco tienden a empeorar al final del día y con la exposición a condiciones ambientales desfavorables (viento, uso de ordenador, aire acondicionado, escasa humedad ambiental).

Los síntomas más asociados a la sequedad ocular son la sensación de arenillas, quemazón, sensación de sequedad, fotofobia y visión borrosa.

La cuantificación de los mismos puede ser realizada mediante cuestionarios, aunque estos no suelen emplearse en la práctica clínica habitual.

Existe una gran variedad de cuestionarios. Algunos valoran exclusivamente la frecuencia¹⁰² o severidad¹⁰³ de los síntomas, mientras que otros, como el SiDEQ¹⁰⁸, tienen en cuenta ambos. Otros test, como el OSDI¹⁰¹ y el McMonnies¹⁰⁴ tienen en cuenta también la presencia de factores de riesgo para el ojo seco y el impacto de los síntomas sobre la función visual.

2. Principales pruebas diagnósticas para determinar los signos de sequedad:

○ Biomicroscopía:

La exploración biomicroscópica es esencial para detectar signos asociados al ojo seco como: anomalías palpebrales (blefaritis anterior y la disfunción de las glándulas de meibomio), la reducción del menisco lagrimal, la hiperemia bulbar, irregularidades en la superficie corneal, etc

La DGM se diagnostica en la práctica clínica por la presencia de uno o más de los siguientes signos: secreción espumosa en el párpado inferior, secreción densa o tapones de queratina a nivel de las glándulas de meibomio, hiperemia del borde libre con/sin irregularidad asociada de su contorno y vasos telangiectásicos prominentes (marcas en cepillo) y la presencia de chalazión u orzuelos.

○ Tiempo de rotura de la película lagrimal (TBUT):

El TBUT es un marcador funcional de la estabilidad lagrimal. Se determina instilando fluoresceína y observando con el filtro azul el lapso entre el último parpadeo y la aparición de la primera zona seca a nivel corneal.

El acortamiento del TBUT a un tiempo ≤ 10 segundos es indicativo de la inestabilidad de la película lagrimal y es característico de la deficiencia mucínica y lipídica (como sucede en la DGM) de la película lagrimal.

○ Test de Schirmer:

El test de Schirmer es una de las mediciones más extendidas para la evaluación de la producción lagrimal.

Se realiza mediante la colocación de una tira de papel de filtro en el fondo de saco y la retirada del mismo tras 5 minutos. El valor del test se corresponde con la medición en mm de la zona de la tira humedecida.

Existen tres variantes del test de Schirmer:

Schirmer I: se realiza sin anestesia y por tanto determina la secreción lagrimal basal y refleja.

Existe una variante del mismo, conocida como test de Jones, en el que se emplea anestesia, de modo que queda registrada exclusivamente la secreción basal. Es el método más empleado en la práctica clínica.

Schirmer II: se realiza sin anestesia y con la estimulación de la mucosa nasal. Permite distinguir entre la alteración de la función lagrimal secundaria a un mal funcionamiento de la glándula lagrimal y la secundaria a una alteración a nivel corneal de la estimulación nerviosa de la secreción.

Schirmer III: se realiza sin anestesia y con la exposición a la luz solar.

Se consideran valores normales del test de Schirmer los ≥ 10 mm, siendo indicativos de ojo seco acuodeficiente valores inferiores al mismo y de ojo seco tipo Sjögren valores de ≤ 5 mm.

- Tinción con fluoresceína:

La instilación de fluoresceína permite poner de manifiesto las erosiones epiteliales y la membrana basal expuesta, así como los filamentos de moco y otros detritus de la película lagrimal.

Es característica del ojo seco acuodeficiente una tinción granular en la córnea central y de la disfunción de glándulas de meibomio, una tinción inferior de la córnea.

- Tinción con colorantes vitales:

El verde lisamina y el rosa de Bengala al 1% son particularmente útiles para la evaluación del ojo seco puesto que no sólo tiñen las células desvitalizadas y el moco, sino también las células epiteliales que han perdido la capa de protección mucínica.

La tinción con verde lisamina y rosa de Bengala es por tanto más sensible que la fluoresceína para mostrar los casos leves o precoces de queratoconjuntivitis seca. Existe un patrón especialmente característico de ojo seco acuodeficiente, conocido como tinción por exposición, y que se define como la tinción de las áreas conjuntivales bulbar nasal y temporal a modo de triángulo con base limbar.

La DGM, por el contrario, produce una tinción en la conjuntiva bulbar adyacente al margen palpebral inferior (tinción lineal).

Existen escalas que gradúan la tinción de la superficie por estos colorantes, como son la escala de Van Bijsterveld y el esquema de Oxford. Puntuaciones ≥ 4 en la escala de Van Bijsterveld son indicativos de OSAD tipo Sjögren.

El verde lisamina presenta algunas ventajas sobre el rosa de Bengala, como una menor toxicidad para la superficie,

ausencia de fotosensibilización, ausencia de tinción de la conjuntiva sana y ausencia de inhibición del crecimiento vírico, por lo que su uso en la clínica es cada vez más extendido.

- Citología de impresión:

La citología de impresión suele estar confinada al campo de la investigación más que al diagnóstico del síndrome seco en la práctica clínica.

Permite evaluar con precisión los cambios histológicos que ocurren a nivel de los epitelios corneal y conjuntival en respuesta a la sequedad ocular.

- Medición de la osmolaridad:

La hiperosmolaridad es un marcador común a los distintos tipos de ojo seco, siendo valores superiores a 312 mOsm/l patológicos.

No obstante, al igual que la citología de impresión, la osmolarimetría es una herramienta más empleada en la investigación que en la clínica, al requerir para su realización un instrumental no disponible habitualmente en la consulta.

2.6.4.2.5 *Tratamiento*

El tratamiento del ojo seco va destinado a la mejora de los síntomas y confort ocular de los pacientes y a la devolución de la superficie ocular y la película lagrimal a su estado fisiológico.

Puesto que el ojo seco está determinado por la alteración cualitativa y /o cuantitativa de la lágrima, la base del tratamiento es la sustitución de dicha lágrima deficitaria.

Existen para ello multitud de lágrimas artificiales en el mercado. No obstante, la simplicidad de su composición en comparación con la de la lágrima natural, las convierte, en su mayoría, en meros lubricantes incapaces de remedar el resto de acciones de la lágrima, como la metabólica, defensiva y regeneradora de la superficie ocular.

La presencia en las lágrimas artificiales de agentes conservantes y estabilizadores, hace que sean potencialmente tóxicos para el epitelio corneal y conjuntival. En la actualidad, dicha toxicidad ha sido compensada en parte con el desarrollo de conservantes con un mayor perfil de tolerancia y seguridad, como el clorito de sodio (Purite®) y el polyquad. Asimismo, el empleo de soluciones monodosis, en cuya formulación se incluyen agentes estabilizadores, como el EDTA, en lugar de conservantes, ha supuesto una notable mejora en el confort asociado a su utilización.

En los casos leves de sequedad ocular, el efecto humectante de las lágrimas artificiales puede resultar suficiente. Sin embargo, en los casos de ojo seco más severo es necesario reponer los componentes esenciales de la lágrima, de lo contrario el mecanismo lesivo proseguirá y se retroalimentará, requiriéndose para su abordaje, por consiguiente, la asociación de múltiples tratamientos.

Dicho abordaje incluye medidas destinadas a fomentar la retención lagrimal (oclusión puntal, lentes de contacto, gafas con cámaras de humedad), la secreción lagrimal (agonistas colinérgicos), fármacos antiinflamatorios (corticoides y ciclosporina), fármacos antibacterianos y reguladores de la secreción lipídica meibomiana (tetraciclinas orales), estrategias ambientales y dietéticas (suplementos de ácidos grasos esenciales) y la administración de sustitutos biológicos de la lágrima (suero autólogo, autotransplante de glándulas salivales..).

En las tablas siguientes podemos ver la clasificación del ojo seco en función de su severidad y las estrategias terapéuticas sugeridas para cada uno de los niveles de sequedad ocular ¹⁰⁵.

Nivel de severidad del ojo seco	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4
Incomodidad, gravedad y frecuencia	Leve y/o episódico, ocurre bajo estrés ambiental	Moderado episódico o crónico, con estrés o sin estrés	Agudo frecuente o constante sin estrés	Agudo y/o discapacitante y constante
Síntomas visuales	Ninguno o fatiga leve episódica	Molesto y/o episódico con limitación de actividad	Molesto crónico y/o con limitación constante de la actividad	Constante y/o posiblemente discapacitante
Inyección conjuntival	Ninguna o leve	Ninguna o leve	+/-	+ / ++
Tinción conjuntival	Ninguna o leve	Variable	Moderada o marcada	Markada
Tinción de la córnea (gravedad/ubicación)	Ninguna o leve	Variable	Central marcada	Erosiones puntiformes agudas
Signos de la córnea o las lágrimas	Ninguna o leve	Detritus leve, ↓ menisco	Queratitis filamentosa, aglutinación de mucus, ↑ detritus lagrimal	Queratitis filamentosa, aglutinación de mucus, ↑ detritus lagrimal, ulceración
Párpacos/glándulas meibomianas	DGM variablemente presente	DGM variablemente presente	Frecuente	Tricúeisis, queratinización, simblefaron
TBUT (seg)	Variable	≤ 10	≤ 5	Inmediato
Puntuación de Schimer (mm/5min)	Variable	≤ 10	≤ 5	≤ 2

Tabla 9 Escala de la gravedad del síndrome de ojo seco.

<p>Nivel 1: Educación y modificaciones ambientales/alimentarias Eliminación de medicaciones sistémicas lesivas Sustitutos de lágrimas artificiales, geles/ungüentos Terapia de párpados</p> <p>Nivel 2: <i>Si los tratamientos de nivel 1 son inadecuados, añadir:</i> Antiinflamatorios Tetraciclinas (para meibomianitis, rosácea) Tapones puntales Secretogogos Gafas con cámara de humedad</p> <p>Nivel 3: <i>Si los tratamientos de nivel 2 son inadecuados, añadir:</i> Suero Lentes de contacto Oclusión puntal permanente</p> <p>Nivel 4: <i>Si los tratamientos de nivel 3 son inadecuados, añadir:</i> Agentes antiinflamatorios sistémicos Cirugía (cirugía de párpado, tarsorrafia; transplante de membrana mucosa, glándula salival, membrana amniótica)</p>
--

Adaptado del DEWS 2007

Figura 6 Esquema de los tratamientos recomendados por el taller internacional de ojo seco para cada uno de los niveles de severidad del ojo seco.

Recientemente, existe un creciente número de publicaciones en las que se postula el empleo de los sustitutos biológicos, concretamente el suero autólogo, a partir de niveles de severidad inferiores al nivel 3^{106, 59}. La base de ello se encuentra, por un lado, en la frecuente falta de correlación entre los síntomas y signos clínicos del síndrome seco y por otro lado, en la capacidad demostrada del suero autólogo para prevenir los cambios inflamatorios y apoptóticos inducidos a nivel epitelial¹⁰⁷.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio de investigación clínica observacional descriptivo prospectivo de tipo serie de casos realizado entre los años 2006 y 2012, en el Instituto Clínico Quirúrgico Oftalmológico (ICQO) en Bilbao, España.

Este diseño de estudio es frecuentemente empleado en la investigación médica, especialmente cuando se trata de valorar de forma inicial hallazgos u observaciones obtenidas en la práctica clínica. Ello se debe a que los estudios de tipo serie de casos permiten, con un coste reducido, generar preguntas e hipótesis que servirán como base a estudios posteriores.

3.2 SELECCIÓN DE PACIENTES

Nuestro estudio fue aprobado por el Comité Ético del ICQO y se siguieron las recomendaciones de la Declaración de Helsinki.

Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito previo a la inclusión y tras haber sido informados acerca del tratamiento.

3.2.1 Selección de pacientes con ojo seco

Se incluyeron en este grupo 106 pacientes del Instituto Clínico Quirúrgico de Oftalmología de Bilbao afectados de síndrome de ojo seco que habían presentado una respuesta escasa o nula a los tratamientos convencionales aplicados previamente. Dicha falta de respuesta fue considerada como la persistencia de síntomas, signos o ambos, que motivaran la consulta oftalmológica.

Se excluyó a los pacientes menores de 18 años de edad así como a aquellos en los que no se pudo realizar un seguimiento mínimo de 3 meses, tiempo necesario para completar un ciclo de tratamiento. También quedaron excluidos, siguiendo el antecedente de otros derivados hemáticos de dispensación domiciliaria, como el suero autólogo, los pacientes afectados de las siguientes infecciones sistémicas: VIH, VHC, VHB y sífilis.

La media de edad de dicho grupo fue de $59,5 \pm 14,4$ años y en cuanto a la distribución por sexos, el 91,51% eran mujeres (97 mujeres respecto a 9 hombres).

La clasificación etiopatogénica de ojo seco de los pacientes reclutados muestra que el grupo más numeroso era el formado por los pacientes con síndrome de ojo seco acuodeficiente tipo no Sjögren (OSAD no SS): 46,23% (49/106), seguido del mixto (disfunción de glándulas de Meibomio (DGM) + OSAD): 29,25% (31/106), síndrome de DGM: 15,09% (16/106) y en último lugar, el síndrome de Sjögren (OSAD SS): 9,43% (10/106). Cabe destacar que 11 pacientes habían sido previamente intervenidos de cirugía refractiva (10 LASIK y 1 queratotomía radial), contribuyendo ello a agravar sus manifestaciones clínicas; 7 de ellos eran SOAD no S, 1 SOAD S secundario a artritis reumatoide, 3 mixtos y 1 era una DGM.

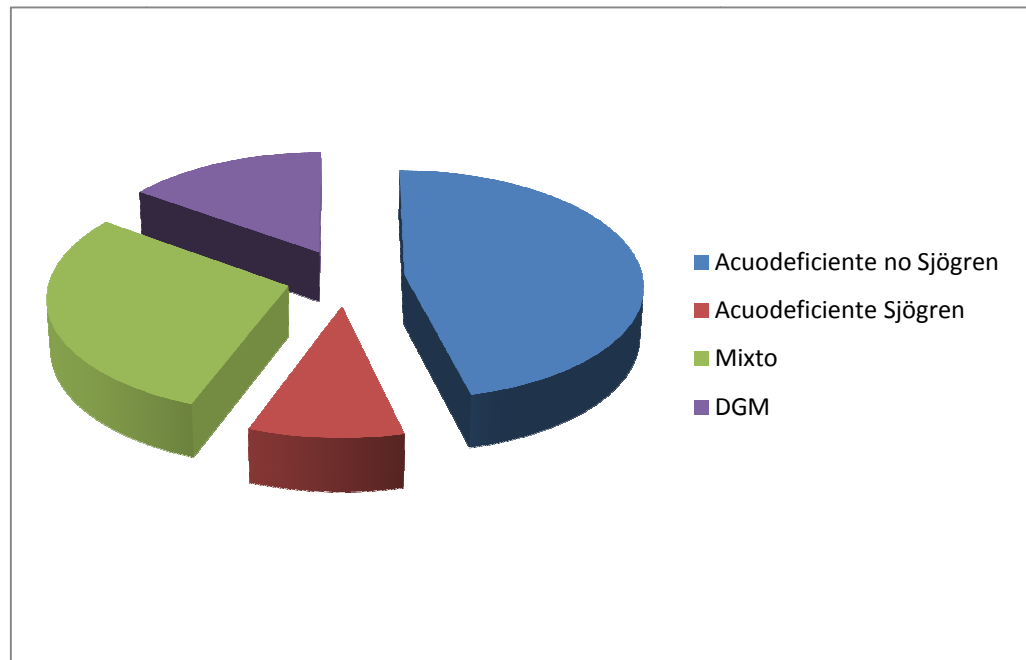


Figura 7 Distribución porcentual de la muestra según la etiopatogenia del ojo seco.

En cuanto a los tratamientos recibidos previamente, el 100% de los pacientes habían empleado lágrimas artificiales convencionales (incluyendo geles lubricantes), bien a modo de tratamiento único en el 16,98% (18/106) o bien combinado con otra medidas, como sucedía en la mayoría de ellos (83,02%). Los tratamientos asociados a las LA, ordenados por orden de frecuencia, fueron los siguientes: corticoides tópicos (56,60%), higiene palpebral (42,45%), oclusión puntal (16,03%), ciclosporina tópica (10,37%), suero autólogo (8,49%), antibióticos orales del grupo de las tetraciclinas (7,54%), procedimientos quirúrgicos de la superficie ocular, como resecciones conjuntivales para la corrección de conjuntivochálasis o queratoconjuntivitis límbica superior y TMA (7,54%), antibióticos tópicos (6,60%), complementos nutricionales (2,83%), secretagogos (1,88%), pomada de vitamina A (1,88%), acetilcisteína tópica (1,88%), lente de contacto terapéutica (1,88%) y aceite de árbol de té (1,88%).

En la tabla inmediatamente inferior podemos ver con detalle las características de la muestra a estudio.

Pacientes n°	EDAD	SEXO	DIAGNÓSTICO	TRATAMIENTOS PREVIOS
1	59	M	OSAD no SS	LA+ C
2	85	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+ H+ C+ S+ OP
3	72	M	DGM	LA,+ H+ C+ oATB+ Cx
4	41	V	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA
5	68	M	OSAD SS 2 ^{ario}	LA
6	49	M	OSAD no SS	LA+ C+ OP
7	31	M	Mixto (DGM+OSAD no SS) (LASIK)	LA+ C+ SA+ H

8	69	M	DGM	LA+H
9	46	M	DGM	LA+ H+ C+ oATB
10	69	M	DGM	LA+ C+ H+ oATB
11	63	M	OSAD SS 2 ^{ario}	LA+ C
12	53	M	OSAD no SS	LA+ C+ OP+ Cs+ SA+ VitA
13	60	M	OSAD no SS	LA+ C+ Cs
14	40	M	OSAD no SS	LA
15	40	V	OSAD no SS (LASIK)	LA
16	72	M	OSAD no SS	LA+ C + H
17	57	M	OSAD no SS	LA+ SA
18	66	V	Mixto	LA+ C+ H+ oATB
19	57	V	OSAD no SS	LA+ C+ Cs+ OP+ N+ SA
20	60	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+H+ C+ Cs
21	64	M	OSAD no SS	LA+ C
22	64	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+C+ Cs+ H+ Cx
23	77	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+ H+ C+ OP+ vitA+ oATB+ Cs+ SA
24	61	M	OSAD SS 1 ^{ario}	LA+C+ AC+ LC+ OP+ SA+ S+ Cx
25	58	M	OSAD no SS	LA
26	62	M	OSAD no SS	LA
27	60	M	OSAD no SS (LASIK)	LA+ C
28	87	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+ H+ C+ SA+ vitA
29	58	M	OSAD no SS (LASIK)	LA+ C
30	62	V	OSAD SS 2 ^{ario} (LASIK)	LA+ C+ OP + SA
31	59	M	OSAD no SS	LA+ C+ OP+ N
32	76	M	OSAD no SS	LA+ OP+ SA
33	54	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ C+ H
34	55	M	Mixto (DGM + OSAD no SS)	LA+ H
35	45	M	OSAD SS 2 ^{ario}	LA+ C
36	77	M	OSAD no SS	LA
37	82	M	OSAD no SS	LA+ OP
38	50	M	OSAD no SS	LA
39	63	M	OSAD no SS (LASIK)	LA
40	55	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ C+ H
41	65	M	OSAD no SS	LA+ C+ OP+ SA
42	61	M	OSAD no SS	LA+ tATB
43	61	M	OSAD no SS	LA+ AH
44	89	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA
45	73	M	OSAD SS 1ario	LA+ C
46	40	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ OP+ H
47	96	M	OSAD no SS	LA+ C
48	61	M	OSAD no SS	LA+ C
49	78	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+ Cs+ H
50	61	M	OSAD no SS	LA+C+ Cs+ Cx

51	79	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ C+ H
52	61	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ H+ aT+ Cs
53	72	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ H+ aT+ C
54	68	M	OSAD no SS	LA+ C+ Cx
55	50	M	OSAD SS 1 ^{ario}	LA+ C+ Cx (TMA OD)
56	73	M	OSAD no SS	LA
57	47	V	DGM	LA+ H+ tATB+ oATB
58	68	M	OSAD SS 1 ^{ario}	LA+ C+ N
59	71	M	OSAD SS 1 ^{ario}	LA+ C+ tATB
60	36	M	OSAD no SS	LA+ C
61	59	M	OSAD no SS	LA+ C+ AC
62	24	V	OSAD no SS (LASIK)	LA+ AH
63	48	M	OSAD no SS	LA+ C+ OP+ Cx (TMA)
64	75	M	OSAD no SS	LA+ OP
65	52	M	OSAD no SS	LA+ C
66	54	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+ C+ Cs+ H
67	73	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ H
68	45	V	OSAD no SS	LA
69	63	M	DGM	LA+ C+ H
70	67	M	DGM	LA+ C+ H
71	72	M	DGM	LA+ H
72	59	M	Mixto (DGM+ OSAD SS 2 ^{ario})	LA
73	31	M	DGM	LA+ C+ H
74	62	M	OSAD no SS	LA
75	70	M	Mixto (DGM+OSAD no SS)	LA+ H
76	85	M	OSAD no SS	LA
77	61	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ C+ AH+ H
78	53	M	OSAD no SS	LA
79	37	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS) (Q.R)	LA+ H
80	61	M	OSAD no SS	LA+ C
81	58	M	OSAD no SS	LA+ C
82	38	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS) (LASIK)	LA+ H
83	59	M	OSAD no SS	LA
84	67	M	OSAD no SS	LA
85	58	M	OSAD no SS	LA+ C
86	58	M	Mixto (DGM+ OSAD SS 2 ^{ario})	LA+ H
87	47	M	DGM (LASIK)	LA+ H
88	22	M	DGM	LA+ C + H
89	55	M	Mixto (DGM + OSAD no SS)	LA+ C+ H
90	54	M	OSAD no SS (LASIK)	LA+ C
91	37	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ tATB+ H
92	41	V	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ C+ H

93	36	M	OSAD no SS	LA+ C
94	28	M	DGM	LA+ C+ tATB+ H
95	50	M	OSAD no SS	LA+ C
96	80	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ H
97	71	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ tATB+ H
98	69	M	OSAD no SS	LA+SA+ OP
99	71	M	DGM	LA+ C+ H+ Cx
100	68	M	Mixto (DGM+ OSAD no SS)	LA+ H+ C
101	62	M	OSAD no SS	LA+ C+ OP
102	36	M	OSAD no SS (LASIK)	LA+ OP
103	70	M	DGM	LA+ H+ C+ oATB
104	60	M	OSAD SS 2 ^{ario}	LA+ C+ Cs
105	67	M	DGM	LA+ AH+ H
106	62	M	DGM	LA+ H+ C+ tATB+ oATB+ Cs

Tabla 10 Características del grupo de ojo seco: edad, sexo, diagnóstico y tratamientos previos recibidos.

En el desglose etiopatogénico podemos ver entre paréntesis los casos en los que coexistía una cirugía refractiva previa LASIK o Q.R (queratotomía radial). Cabe destacar entre el grupo diagnóstico de OSAD no SS, la existencia de 2 enfermedades de injerto contra el huésped (pacientes nº 78 y nº 92) y 3 fibromialgias (pacientes nº52, 81 y 99).

LA: lágrimas artificiales; **H:** higiene palpebral; **C:** corticoides tópicos; **Cs:** ciclosporina; **OP:** oclusión puntal; **tATB:** antibióticos tópicos; **oATB:** antibióticos orales (tetraciclinas); **AC:** acetilcisteína tópica; **vitA:** pomada de vitamina A (ácido trans-retinoico); **S:** secretagogos (pilocarpina oral); **N:** complementos nutricionales ricos en ácidos grasos omega-3; **aT:** aceite de árbol de té; **AH:** antihistamínicos tópicos; **SA:** suero autólogo; **Cx:** cirugía de la superficie ocular (conjuntivoplastias inferiores y/o superiores, salvo cuando especifica entre paréntesis); **TMA:** trasplante de membrana amniótica.

3.2.2 Selección de pacientes con defectos epiteliales persistentes (DEP)

Se incluyeron 51 pacientes (53 ojos) diagnosticados de defecto epitelial persistente en el Instituto Clínico Quirúrgico de Oftalmología de Bilbao.

La edad media de los pacientes fue de 62,9± 15,7 años (rango de 29 a 90 años). Un 69,81% (36/51) eran varones y un 30,19% (15/51) eran mujeres.

La etiopatogenia de los defectos epiteliales era variada, correspondiendo un 39,62% de los casos a DEP yatrogénicos tras cirugía ocular (21/53), un 26,41% a úlceras neurotróficas no herpéticas (14/53), un 15,09 % a úlceras neurotróficas herpéticas (8/53), un 13,2% a DEPs de origen traumático (6/53) y un 7,54% DEPs de otras etiologías (2 casos de ojo seco severo y 2 de toxicidad medicamentosa).

El grupo más nutrido de DEPs corresponde a los DEPs secundarios a procedimientos quirúrgicos oculares, entre los que destacan las vitrectomías (13/21), aunque también la cirugía de catarata complicada (4/21) o no (2/21) y queratoplastias (2/21).

Entre los DEPs neurotróficos no herpéticos: un 35,71% (5/14) a descompensaciones endoteliales bullosas, un 28,57% (4/14)

corresponden a anestesia corneal secundaria a la afectación del núcleo del nervio trigémino bien por ablación o bien por un accidente cerebrovascular, un 21,42% (3/14) en el que el origen de la alteración trófica se atribuyó a la diabetes, al no poderse encontrar en la anamnesis ni exploración ningún otro factor causal y 1 caso postLASIK.

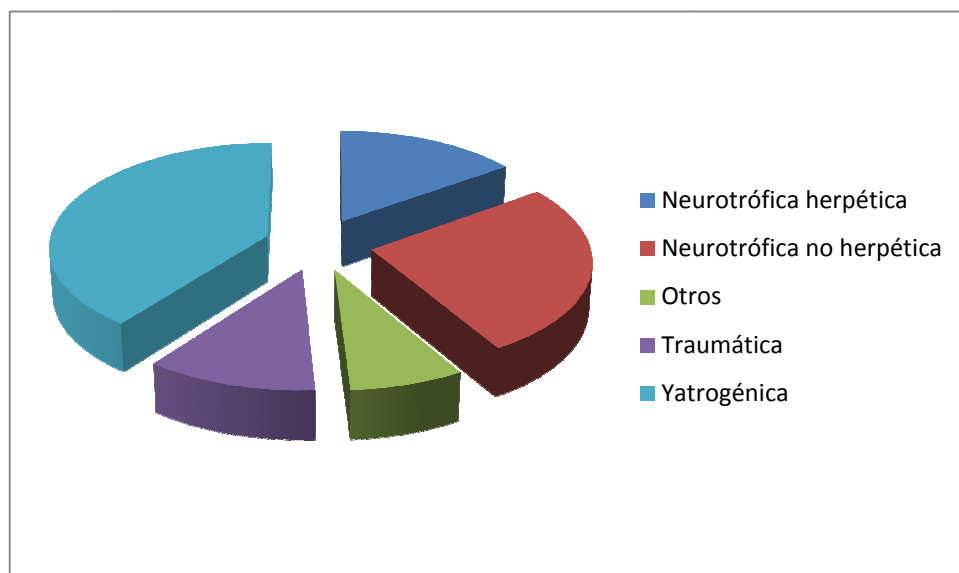


Figura 8 Distribución porcentual de la muestra según la etiopatogenia del defecto epitelial persistente.

Como único criterio de inclusión se exigía presentar un defecto epitelial persistente que no mejorase tras los tratamientos convencionales, incluyendo entre éstos tanto tratamientos médicos (lágrimas artificiales, esteroides tópicos, antibióticos tópicos y/o orales, antivíricos, lentes de contacto terapéuticas, suero autólogo, etc.), como tratamientos quirúrgicos (transplante de membrana amniótica y cirugía palpebral).

Los criterios de exclusión fueron la presencia de una infección corneal activa y los mismos que se aplican al empleo del suero autólogo, es decir, la presencia de una de las siguientes infecciones sistémicas: VIH, VHC, VHB y sífilis.

El 94,23% de los pacientes incluidos en nuestro estudio (49/53) había recibido tratamiento previo, siendo el más habitualmente empleado la asociación de antibiótico y corticoide tópico, combinado o no con lágrimas artificiales (36/53 ó 67,93%). Ocho casos 8 (15,09%) habían sido también tratados con lentes de contacto terapéuticas y otros 5 (9,43%) con agentes antivíricos tópicos, concretamente antiherpéticos. Cabe destacar que 9 casos (16,98%) habían recibido tratamiento sin éxito con suero autólogo al 20%. En 10 casos (19,23%) había sido necesario un tratamiento quirúrgico además del médico. Los procedimientos quirúrgicos realizados incluían la tarsorrafia lateral, el transplante de membrana amniótica y la pexia lateral del párpado inferior.

En la siguiente tabla podemos ver las características del grupo de DEP en cuanto a edad, sexo, diagnóstico y tratamientos recibidos con anterioridad al tratamiento con PRGF.

Pacientes n°	EDA D	SEXO	DIAGNÓSTICO	TRATAMIENTOS PREVIOS
1	33	V	Neurotrófico no herpético	tATB+ C+ Cx palpebral
2	53	M	DEP asociado a ojo seco severo	tATB+ C+ oATB
3	53	M	DEP asociado a ojo seco severo	tATB+ C+ oATB
4	88	V	Yatrogénico	tATB+ C
5	47	V	Traumático	tATB+ C+ SA+ Cx (TMA)
6	69	V	Neurotrófico no herpético	No
7	60	V	Neurotrófico no herpético	No
8	60	V	Neurotrófico no herpético	No
9	60	M	Yatrogénico	tATB+ C+ tAV
10	68	V	Neurotrófico herpético	tAV+LA
11	68	V	Neurotrófico herpético	X
12	55	V	Traumático	tATB+ C+ Cp+ LA
13	45	V	Yatrogénico	tATB+ C+ Cp+ LA
14	40	V	Yatrogénico	tATB+ C+ Cp+ LA
15	83	V	Neurotrófico no herpético	tAV+ Cx palpebral
16	60	V	Traumático	TATB+ Mx+ depilación pestaña
17	84	M	Neurotrófico no herpético	LA+ SA
18	61	V	Yatrogénico	LA+ tATB+ C+ SA
19	64	M	Neurotrófico herpético	LC+ C+ tATB+ Cp+ Cx (TMA)
20	73	M	DEP por toxicidad medicamentosa	SA+ LA+ oATB+ C
21	66	V	Neurotrófico herpético	tATB+LC
22	29	M	Neurotrófico herpético	tATB+ tAV
23	67	V	Yatrogénico	C+ tATB
24	80	V	Yatrogénico	C+ tATB+ LA
25	45	V	Neurotrófico no herpético	LA
26	42	V	Neurotrófico no herpético	LA
27	35	V	Traumático	LA+ tATB+ C
28	61	V	Neurotrófico no herpético	LA+ Cx (TMA)
29	81	M	DEP por toxicidad medicamentosa	LA+ tATB
30	57	V	Yatrogénico	LA+ tATB+ Cp+ C
31	72	M	Yatrogénico	C+ tATB
32	72	V	Neurotrófico no herpético	C+ tATB+ SA+ LC
33	79	V	Neurotrófico herpético	LC+ LA+ tATB
34	50	M	Neurotrófico no herpético	LC+ tATB+ C
35	60	M	Neurotrófico herpético	tAV+ tATB+ C+ Cp
36	81	M	Yatrogénico	tATB+ C+ Cx (TMA)
37	86	M	Neurotrófico no herpético	tATB
38	59	V	Traumático	LA+ oATB+ LC

39	88	M	Neurotrófico no herpético	tATB+ LA
40	33	V	Traumático	LA+ C+ Cx (TMA)+ SA+ conformador
41	83	V	Yatrogénico	LA+LC+ C+ LC+ Cx (TMA)
42	75	M	Yatrogénico	LA+ LC+ C+ATB
43	46	V	Yatrogénico	LA+ C
44	90	M	Neurotrófico no herpético	LA+ C+ tATB
45	43	V	Yatrogénico	LA+C+ tATB
46	64	V	Yatrogénico	LA+ C+ tATB
47	80	V	Yatrogénico	LA+ C+ tATB+ oATB+ Cx (TMA)
48	60	V	Yatrogénico	LA+ C+ tATB
49	65	V	Yatrogénico	LA+ C+ tATB
50	74	V	Yatrogénico	LA+ C+ tATB
51	57	V	Neurotrófico herpético	LA+ tAV+ oAV
52	72	V	Yatrogénico	C+ tATB+ LA+ LC
53	58	V	Yatrogénico	C+ tATB+ LA+ LC

Tabla 11 Características del grupo DEP: edad, sexo, diagnóstico y tratamientos previos recibidos.

Cabe destacar entre el grupo diagnóstico de DEP yatrogénico los DEPs secundarios a una o varias vitrectomías (pacientes nº 4,13,14,30,41,42,43,45,48,49,50,52 y 53) y en el grupo neurotrófico no herpético los secundarios a la afectación del núcleo trigémino (pacientes nº 1,6,7 y 17) y descompensación endotelial bullosa (pacientes nº 25,26,28 y 39).

LA: lágrimas artificiales; **C:** corticoides tópicos; **Cp:** ciclopléjico; **tATB:** antibióticos tópicos; **oATB:** antibióticos orales (tetraciclinas); **tAV:** antivíricos tópicos; **oAV:** antivíricos orales; **LC:** lente de contacto terapéutica; **SA:** suero autólogo; **Cx:** cirugía; **TMA:** transplante de membrana amniótica.

3.3 PARÁMETROS DE EVALUACIÓN CLÍNICA.

3.3.1 Grupo de ojo seco

Todos los parámetros que siguen a continuación fueron evaluados en una primera visita, previa al inicio del tratamiento con PRGF y en una segunda visita al cabo de 3 meses, tiempo necesario para completar un primer ciclo de tratamiento.

3.3.1.1 Síntomas.

Registramos la mejoría de los síntomas tras un primer ciclo de PRGF, bien pidiéndole al paciente que calificara su mejoría en leve, moderada, importante o nula o bien mediante la diferencia en la puntuación obtenida vía cuestionario, pre y post-tratamiento. En este último caso, se consideró mejoría leve una reducción de la puntuación inferior al 25%; moderada, entre el 25-50% e importante, superior al 50%.

Como cuestionario escogimos una versión modificada del SiDEQ (Single-Item Score Dry Eye Questionnaire)¹⁰⁸ que gradúa la frecuencia e impacto en la calidad de vida del paciente de los siguientes 8 síntomas: sequedad,

sensación de cuerpo extraño, enrojecimiento, quemazón, picor, cansancio ocular, pesadez de párpados y fotofobia, puntuándolos de 0 a 4, siendo:

0= ausencia del síntoma.

1= síntoma poco frecuente.

2= relativamente frecuente pero no le molesta.

3= frecuente y le molesta pero no interfiere con sus actividades diarias.

4= frecuente e interfiere con sus actividades diarias.

SÍNTOMAS	PUNTUACIÓN
Enrojecimiento	0-4
Sensación de cuerpo extraño	0-4
Quemazón	0-4
Picor	0-4
Sequedad	0-4
Cansancio ocular	0-4
Pesadez de párpados	0-4
Fotofobia	0-4
*(La puntuación de 0 a 4 se corresponde con: 0= ausencia del síntoma, 1= poco frecuente, 2= frecuente pero no le molesta, 3= frecuente y le molesta pero no interfiere en sus actividades diarias y 4= frecuente e interfiere en sus actividades diarias)	

Tabla 12 Cuestionario SIDEQ modificado.

Como vemos, la puntuación según este cuestionario oscila entre 0 y 32 puntos, siendo considerados síntomas leves los valores entre 0 y 10; síntomas moderados, entre 11 y 21 y síntomas severos, entre 22 y 32.

Las modificaciones realizadas sobre el SiDEQ original corresponden a la sustitución de los ítems originales: “otros”, “dolor” y “visión borrosa” por: cansancio ocular, enrojecimiento y pesadez de párpados.

En un principio se realizó también el test de OSDI (Ocular Surface Disease Index), ampliamente empleado para el seguimiento de los pacientes no sólo en investigación sino también en el entorno asistencial, pero se dejó de emplear debido a la imposibilidad de gran parte de nuestra población a estudio para contestar algunas de sus preguntas, como p.ej. las referentes al impacto de la sequedad ocular en la conducción nocturna.

Para asegurar una correcta comprensión de la prueba, se realizó en la primera visita una lectura del cuestionario conjunta con el paciente.

No se tuvieron en cuenta en este estudio los datos de mejoría de síntomas posteriores a la visita de los 3 meses, a fin de garantizar la

uniformidad de resultados entre los pacientes que sólo recibieron un pulso de PRGF y los que recibieron varios o siguieron con él de modo ininterrumpido.

3.3.1.2 Tinción verde lisamina

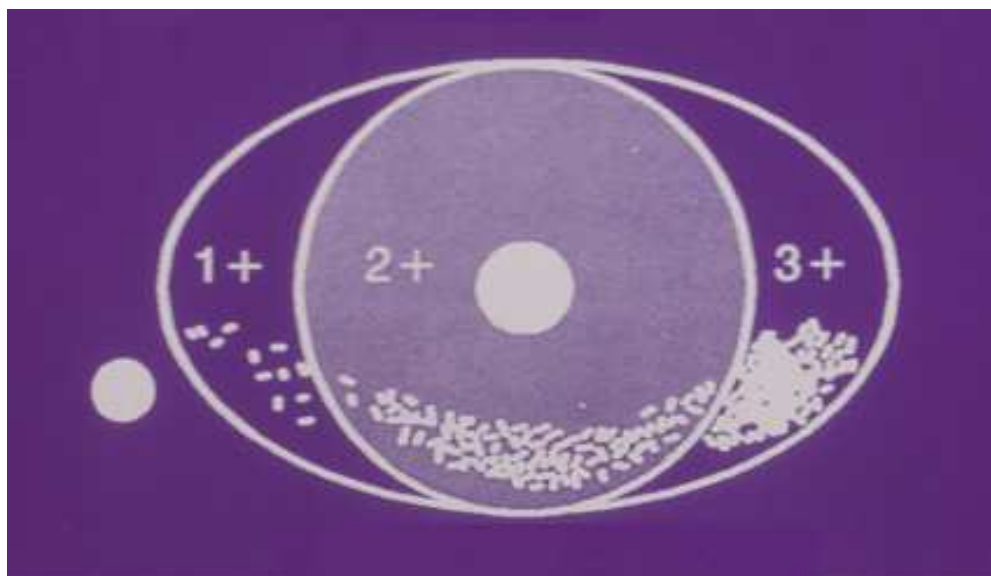
La tinción con verde lisamina la realizamos al inicio de la exploración biomicroscópica, y previamente a la tinción con fluoresceína y otras exploraciones invasivas de la superficie ocular, como estesiometría, osmolarimetría, etc. Para ello, empleamos una gota de colirio de colorante verde lisamina al 1% (fórmula magistral obtenida de la dilución del verde lisamina con suero fisiológico).

La capacidad de tinción del verde de lisamina en forma de solución es muy superior a la que se obtiene con las tiras impregnadas del mismo, y tiene además la ventaja añadida, debido a su escaso potencial irritativo, de no necesitar el uso de anestésico para su realización, evitando así que la toxicidad del mismo o de la mera disposición de las tiras contra la conjuntiva, puedan alterar el resultado de la prueba.

Para evaluar los resultados de la tinción utilizamos la escala de Van Bijsterveld, que gradúa del 0 al 3 la intensidad de la tinción de tres segmentos de la superficie ocular expuesta: la córnea, la conjuntiva nasal y la conjuntiva temporal.

El resultado de la prueba, valor numérico entre el 0 y el 9, representa la suma de la puntuación obtenida en cada uno de esos tres segmentos.

Para el análisis del grado de tinción de verde lisamina previo y posterior al tratamiento con PRGF se tuvo en cuenta, para cada paciente, el ojo con mayor puntuación, siguiendo la pauta establecida por otros grupos^{109,110}.



Adaptado de Tear Film & Ocular Surface Society (2004)

Figura 9 Escala de Van Bijsterveld para la graduación de la tinción de la superficie ocular con verde lisamina/Rosa de bengala.

La puntuación por cada sector varía entre 0 y 3, correspondiendo 0 a la ausencia de tinción; 1= puntos de tinción escasos y separados entre sí, 2= puntos de tinción numerosos y separados entre sí y 3= puntos numerosos y confluentes.

3.3.1.3 Test de Schirmer

Realizamos el test de Schirmer con anestesia, también conocido como test de Jones, mediante la instilación de 1 gota de colirio de fluoresceína sódica al 0,25% y oxibuprocaina hidrocloreto al 0,4% (Colircusi Fluotest®, Alcon, España).

Transcurridos unos minutos de la instilación, para permitir que el volumen lagrimal retornase a sus valores basales, colocamos unas tiras de papel de filtro graduadas (Schirmer plus®, Gecis, Francia) en la unión entre el tercio externo y los dos tercios internos del párpado inferior.

Las tiras se retiraron al cabo de 5 minutos, anotándose el valor en mm de la porción humectada por cada ojo.

Durante el período que mantuvimos la tira en el párpado, se pidió al paciente que mantuviese los ojos abiertos y parpadease con normalidad, con la mirada dirigida hacia delante.

Se consideró que el ojo seco era acuodeficiente cuando los valores del test de Schirmer con anestesia eran inferiores a 10mm.

De cara a la cuantificación de la producción lagrimal por cada paciente, tuvimos en cuenta los resultados del ojo con menor puntuación en el test de Schirmer^{109,110}.

3.3.1.4 Citología de impresión.

Efectuamos una citología de impresión a 22 sujetos del grupo de ojo seco escogidos al azar.

Para obtener la muestra se instiló una gota de la mezcla de tetracaina clorhidrato al 0,1% y oxibuprocaina clorhidrato al 0,4% (Colircusi Anestésico Doble®, Alcon, España) y se depositaron 4 pequeños fragmentos de papel de filtro (Millipore, HAWP3O4 de 5x5 mm, Millipore Corporation®, Billerica, MA) sobre cada uno de los cuatro cuadrantes de la conjuntiva (superior, inferior, nasal y temporal) haciendo una ligera presión durante unos 3 segundos.

Las tiras de papel con las muestras se fijaron en etanol absoluto y se tiñeron siguiendo el protocolo descrito previamente por Rivas et al.¹¹¹, que consta de los siguientes pasos:

- Lavado con agua destilada (5 min).
- Ácido periódico al 1% (10 min).
- Lavado con agua destilada (5 min).
- Reactivo de Schiff puro (tapado) (3 min).
- Lavado en agua corriente (2 min).
- Hematoxilina de Harris (5 min).
- Lavado en agua corriente (5 min).
- Etanol de 50° (5 min).
- Etanol de 96° (5 min).
- Etanol de 96° (5 min).
- Etanol de 100° (5 min).
- Etanol de 100° (5 min).
- Xilol (7 min).

Todo el proceso se realizó en placas de 24 pocillos, excepto el paso del Xilol, que requiere el empleo de envases de cristal. Tras este último paso, se montaron las muestras en los portas y se tomaron fotografías a 200 aumentos de las distintas zonas de la superficie ocular.

Aunque el proceso de metaplasia escamosa es continuo, ha sido dividido en distintos grados para una mejor comprensión. Esta graduación está basada en los siguientes cambios celulares:

- La disminución de la densidad de las células caliciformes.
- El aumento del tamaño y alargamiento anormal de las células epiteliales no secretoras.
- Los cambios metacromáticos en la tinción del citoplasma.
- La separación intercelular.
- Los cambios morfológicos del núcleo.
- El incremento en la relación núcleo-citoplasma (N:C) de las células epiteliales.
- La aparición de queratinización.

Según la presencia e intensidad de los cambios mencionados, y siguiendo el criterio propuesto por Oroza¹¹², describimos la metaplasia escamosa de las muestras de citología de impresión mediante una escala de cuatro grados, además de un grado normal. Dicha graduación coincide con la graduación clínica propuesta por Murube¹¹³. Así, el grado 0 es considerado normal; el grado 1, ligeramente alterado; el grado 2, medianamente alterado; el 3, severamente alterado y el 4, completamente degenerado y queratinizado.

En la siguiente tabla podemos ver la descripción de las alteraciones celulares correspondientes a cada uno de los grados.

GRADO DE METAPLASIA ESCAMOSA	CAMBIOS EN LAS CÉLULAS CONJUNTIVALES
GRADO 0	C. epiteliales pequeñas y redondas, completamente unidas entre ellas. Núcleos grandes. N:C de 1:2. C. caliciformes abundantes.
GRADO 1	C. epiteliales ligeramente mayores y más poligonales, con ligeros espacios intercelulares. Núcleos grandes. N:C de 1:3. < número de c. caliciformes.
GRADO 2	C. epiteliales mayores y bastante poligonales, con moderados espacios intercelulares entre ellas. Núcleos normales. N:C de 1 :5. C. caliciformes muy disminuídas.
GRADO 3	C. epiteliales mayores y muy polimorfas, muy separadas entre sí. Núcleos pequeños. N:C de 1:10. C. caliciformes francamente disminuídas.
GRADO 4	C. epiteliales muy grandes y siempre aisladas. Citoplasma completamente queratinizado. Núcleos líticos o ausentes. N:C >20. C. caliciformes difíciles de encontrar.

Tabla 13 Graduación de la metaplasia escamosa de la superficie ocular junto con los cambios en las células epiteliales conjuntivales correspondientes. (Oroza 2000)

C: células; N:C: relación núcleo-citoplasma.

A fin de evitar sesgos de medición, la interpretación de las muestras de citología de impresión fue realizada por dos profesionales independientes que desconocían la exploración clínica, anamnesis y evolución de los sujetos a estudio.

A efectos de análisis del grado de metaplasia escamosa de la muestra a estudio, en los casos en que existía una discordancia entre ambos ojos, se tuvo en cuenta el ojo con mayor puntuación en la citología de impresión.

3.3.1.5 Parámetros relacionados con la dispensación del PRGF

Registramos la tolerancia del tratamiento graduándola en buena, mala o regular, así como la incidencia de posibles efectos adversos asociados a la administración del PRGF, prestando especial atención a la aparición de: irritación local (aumento de la hiperemia), infección, infiltrados corneales y neovascularización corneal.

La duración del tratamiento y la necesidad de retratamiento fueron también evaluados.

3.3.2 Grupo de defectos epiteliales persistentes

3.3.2.1 Tiempo hasta la cicatrización.

Medimos el tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento y la completa epitelización del defecto, registrando dicha medición en semanas.

3.3.2.2 Sensibilidad corneal.

Para la medición de la sensibilidad corneal empleamos una hebra de algodón procedente del deshilachado manual de una torunda de algodón o de una gasa.

Se valoró el grado de sensibilidad resultante del contacto corneal con la misma en ambos ojos, anotando el resultado en términos de estesia comparativa entre el ojo del defecto epitelial y el adelfo del siguiente modo: estesia normal, cuando no se hallaban diferencias apreciables entre ambos ojos; hipoestesia, cuando el ojo del defecto presentaba cierta sensibilidad pero ésta era menor a la observada en el ojo adelfo y anestesia, cuando la sensibilidad en el ojo del defecto era nula.

3.3.2.3 Necesidad de tratamientos asociados.

En los casos en los que lo permitían el diagnóstico y evolución de los DEPs se empleó el PRGF como tratamiento único.

No obstante, se estableció, como consideración previa al inicio del estudio, que la aplicación del PRGF no debiera en ningún caso ser impedimento para la aplicación de otros tratamientos (ej; tarsorrafia, oclusión puntal, tetraciclinas orales, antibióticos tópicos, antiinflamatorios, etc.) si éstos eran considerados necesarios.

Además, se incluyó en el protocolo de tratamiento la posibilidad de llevar a cabo un transplante de membrana amniótica siempre que tras cumplirse quince días de tratamiento con PRGF no se objetivase una mejoría de la úlcera o en cualquier momento de la evolución si ocurría un deterioro de los signos clínicos.

3.3.2.4 Parámetros relacionados con la dispensación del PRGF.

Recogimos, al igual que en el grupo de ojo seco, si la tolerancia al tratamiento era buena, regular o mala.

En cuanto a los efectos adversos, solapables a los del grupo de ojo seco, prestamos por añadidura especial atención a la aparición de haze o fibrosis corneal así como a la aparición o aumento de neovascularización.

3.4 PROTOCOLO PARA LA ELABORACIÓN DEL PRGF

3.4.1 Preparación del paciente

Es conveniente que el paciente acuda en ayuno relativo, es decir habiendo hecho un desayuno ligero y habiendo evitado una dieta rica en grasas el día anterior. Ello es importante para evitar que la grasa se acumule en el plasma e interfiera en la funcionalidad de las plaquetas.¹¹⁴
115 116

Así mismo, se deben suspender las medicaciones antiagregantes 3 días antes de la extracción.

3.4.2 Material requerido

Todo el material necesario para la obtención del PRGF está disponible en el mercado bajo el nombre Equipo PRGF System IV®, que se compone de:

- 1 Centrífuga (microcentrífuga BTI PRGF system®).
- 1 Campana de flujo laminar (imprescindible para garantizar la esterilidad durante todo el procedimiento).
- 1 Horno Plasmatherm-H (opcional)
- 1 Kit PRGF® monouso, en el que a su vez se incluyen:
 - Tubos de 5ml y 9ml con una solución de citrato sódico al 3,8% como anticoagulante para la extracción de la sangre.
 - Tubos de 4ml y 9 ml para el fraccionamiento del plasma
 - Varias unidades del BTI Plasma Transfer Device® (PTD), pipeta diseñada para la aspiración de las distintas fracciones del plasma.
 - Ampollas de PRGF® Activator (cloruro cálcico)
 - Agujas de distintos calibres.

A fecha de realización de este trabajo, disponíamos de 3 kits comercializados: el kit PRGF® Dental (kit KMU 15), el Traumatológico (kit KMU 9) y el Dermatológico-Estético (kit KMU 10).

Al no tener disponible, por tanto, un kit PRGF® específico para Oftalmología, empleamos para nuestro estudio el traumatológico, realizando las modificaciones pertinentes para el uso que pretendíamos darle, como veremos más adelante.



Figura 10 Kit monouso Traumatológico.

De izquierda a derecha vemos, los tubos de extracción, junto al material necesario para la misma, las ampollas del PRGF® activador, los tubos de fragmentación del plasma, y finalmente el PTD.

3.4.3 Recogida de la muestra y centrifugación

Se extrae una muestra de sangre venosa (generalmente entre 30 y 60 ml, dependiendo del uso que se le vaya a dar) utilizando para ello los tubos estériles de 5ml ó 9ml con anticoagulante (0'5 ml de citrato sódico al 3'8%).

Los tubos deben ser invertidos entonces cuidadosamente en varias ocasiones para conseguir la correcta mezcla entre el anticoagulante y la sangre.

A continuación se introducen los tubos en la centrífuga de manera simétrica para que el rotor esté convenientemente equilibrado, de modo que cuando el número de tubos de sangre sea impar, se colocará un tubo con un volumen equivalente de agua para que sirva de contrapeso.

Los parámetros de centrifugación son: 460g durante 8 minutos en el caso de tratarse de tubos de 5ml y 580g durante 8 minutos para los de 9ml. El proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente.

Tras el proceso de centrifugación, la sangre se separará en tres componentes:

El plasma rico en factores de crecimiento o whole plasma (WP) (color amarillo), que a su vez se divide en tres fracciones (F1, F2 y F3) con concentración creciente de plaquetas hasta la F3.

La serie blanca o buffy coat (color blanco), inmediatamente inferior.

La serie roja (color rojo) o hematíes, en la parte inferior del tubo.

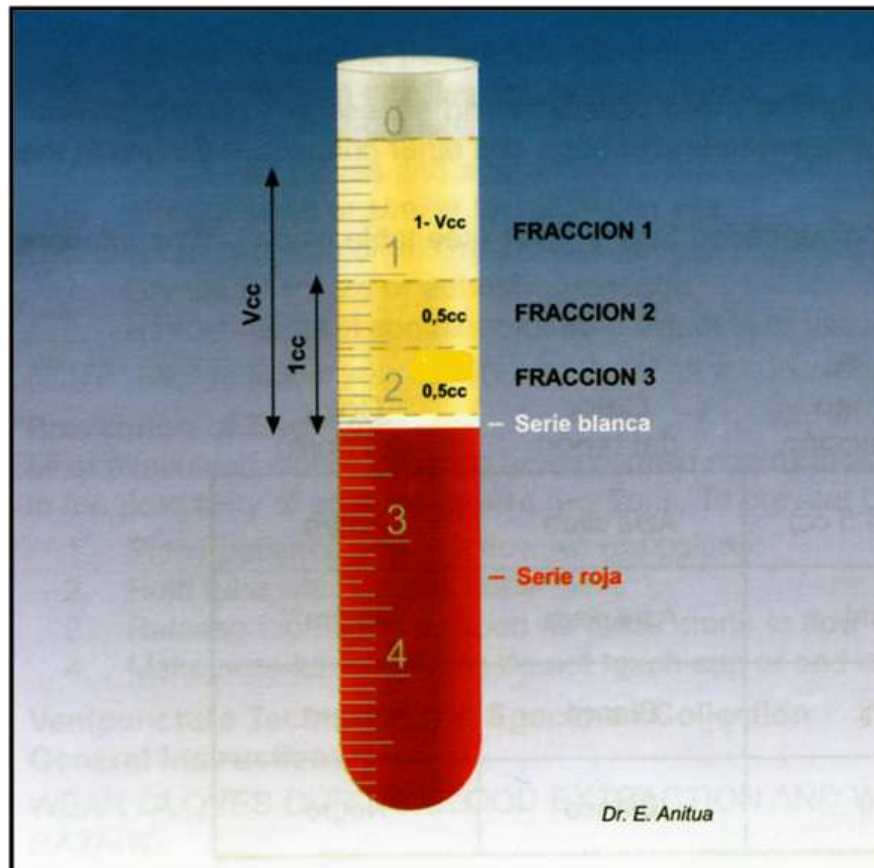
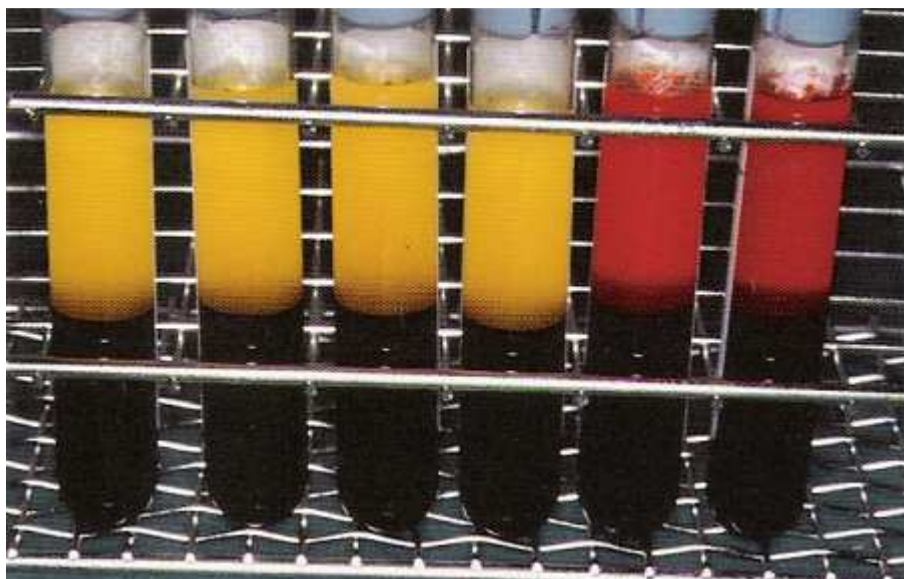


Figura 11 Separación de la muestra sanguínea en sus tres componentes.

El plasma rico en factores de crecimiento o whole plasma se corresponde con la columna amarilla. En la imagen podemos ver los volúmenes que se obtendrán de cada fracción del mismo para un tubo de 5ml.

Si en lugar de obtener un plasma de la típica coloración amarillenta translúcida nos encontramos con un plasma rosáceo o rojizo, ello nos está indicando que se ha producido un proceso de hemólisis.

La hemólisis puede ser consecuencia de una venopunción traumática o de un manejo poco cuidadoso de la muestra, como puede ser, por ejemplo, el hecho de agitar muy enérgicamente los tubos tras la extracción e invalida el proceso de obtención del PRGF, por lo que deberán desecharse los tubos en los que se haya producido.



Adaptado de Anitua E (2008)

Figura 12 Tubos con coloración amarillenta traslúcida típica (a la izquierda) y tubos rojos (a la derecha) en los que se observa hemólisis.

3.4.4 Fraccionamiento del plasma

Antes de iniciar el fraccionamiento del plasma se ha de proceder a la medición del volumen total del plasma (WP) obtenido y que puede ser variable, en relación inversa al hematocrito del paciente.

Se procede entonces al aspirado de cada una de las fracciones del plasma mediante un cuidadoso pipeteado con el PTD, tras insertar en su parte posterior un tubo de fraccionamiento.

Se comienza aspirando la fracción 1 de cada uno de los tubos, hasta que quede aproximadamente 1ml (para tubos de 5ml) o 2ml (para tubos de 9ml) por encima de la serie blanca. Se repetirá el proceso con las dos fracciones restantes aunque en este caso los volúmenes serán de 0,5 ml (para tubos de 5ml) y 1 ml (para tubos de 9ml).

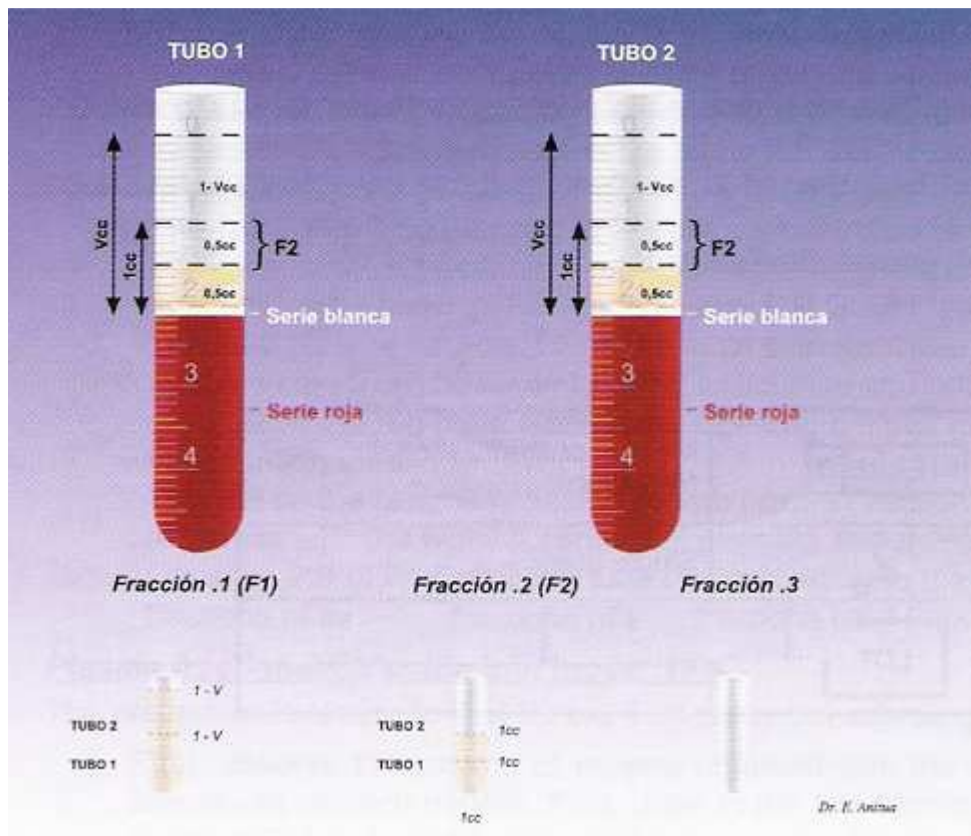


Figura 13 Procedimiento de aspiración de la F2 del plasma correspondiente a dos tubos (tubos 1 y 2) y disposición de la misma en un único tubo de fragmentación.

En la imagen podemos ver la fragmentación de la F1, completada de un modo previo, mientras que la de la F3 aún está pendiente.

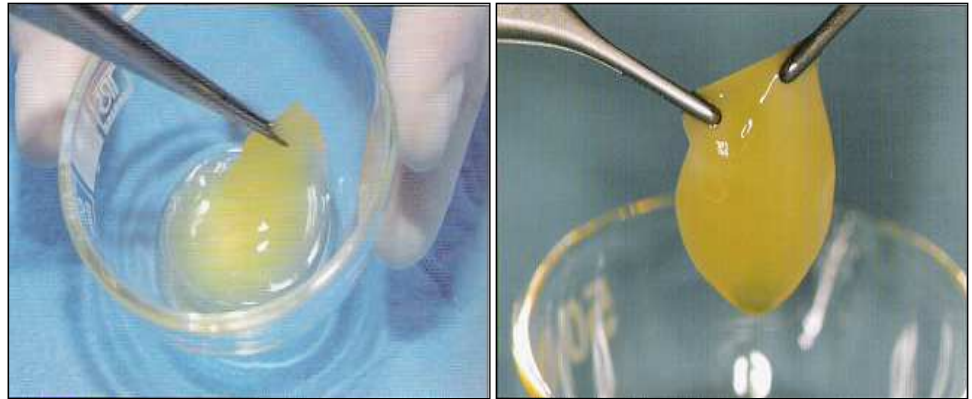
3.4.5 Activación del plasma

Tras seleccionar la fracción del plasma que vayamos a utilizar, procederemos a su activación mediante la adición del PRGF® Activator, a razón de 50 µl por cada ml de plasma contenido en el tubo.

Pasados entre 5 y 10 minutos de la activación del plasma, se formará el coágulo. Este tiempo puede variar en función del número de plaquetas del paciente, con el que mantiene una relación inversa. Así mismo, también estará condicionado por cuál sea la fracción originaria, así el tiempo será algo mayor para la F1 (entre 6 y 10 minutos), que para la F2 y F3 (entre 5 y 8 minutos).

Podemos acortar el proceso de formación del coágulo si antes de activar el plasma equilibramos la temperatura del mismo con la temperatura corporal. Para ello, disponemos del horno Plasmatherm-H diseñado para mantener las distintas fracciones del plasma a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$.

El coágulo resultante irá liberando los factores de crecimiento en él contenidos a medida que se vaya produciendo su retracción.



Adaptado de Anitua E (2008)

Figura 14 Imágenes correspondientes al coágulo del PRGF activado.

Vemos como el coágulo de la imagen de la izquierda está más retraído que el de la derecha. Así mismo, podemos ver el sobrenadante resultante de su retracción.

Todos los procedimientos anteriormente descritos deben ser llevados a cabo bajo condiciones de esterilidad, trabajando en el interior de una campana de flujo laminar.

3.4.6 Adaptación de la tecnología PRGF al ámbito oftalmológico

Puesto que no existían antecedentes del empleo del PRGF en Oftalmología, adecuamos el método PRGF® para su utilización a modo de colirio, presentación con una mayor versatilidad terapéutica en nuestra especialidad y que se adapta bien al tratamiento tanto de los DEPs como del ojo seco.

Para ello, una vez extraída y centrifugada la muestra sanguínea, en nuestro caso entre 30 y 60ml en tubos de 5 y 9ml, respectivamente, seguimos los siguientes pasos específicos:

En primer lugar, nosotros recogemos el Whole Plasma y no exclusivamente la F3 (fracción más rica en factores de crecimiento), como se hace en otras especialidades médicas.

Ello responde a motivos de eficiencia ya que la cantidad de F3 obtenida por extracción resulta escasa cuando lo que precisamos es aplicarla de modo frecuente y prolongado en el tiempo en lugar de en una única aplicación intraquirúrgica.

Dicha variación eminentemente práctica no va en detrimento de la calidad del producto final, como avalan estudios realizados recientemente¹¹⁷ y en los que no se hallan diferencias entre el W.P y la F3 en cuanto a la concentración de factores de crecimiento y la capacidad de proliferación y migración de los queratocitos y fibroblastos conjuntivales.

Seguidamente, procedemos a la activación de la suma de los W.P del total de tubos de fraccionamiento con el PRGF activator®.

Puesto que en nuestro caso el objetivo no es la implantación del coágulo resultante, para que éste actúe de reservorio y vaya liberando paulatinamente los distintos factores en el tejido diana, sino la utilización del plasma en forma líquida, esperaremos, tras la adición del PRGF activator® un tiempo de 2-3h (variable en función del número de plaquetas del paciente). Éste es el tiempo necesario para que el coágulo se retraiga al máximo y libere los mediadores en él contenidos al sobrenadante, que es lo que nosotros recogeremos.

Dicho proceso es acelerado mediante un bloque térmico (Horno Plasma-Therm H) que calentará los tubos a 37°C, reduciéndose a la mitad el tiempo de espera.

En siguiente lugar, siendo necesaria una dispensación domiciliaria, tuvimos que establecer unas pautas de conservación y administración no contempladas hasta la fecha en el método PRGF®. Así pues, seguimos las mismas normas que regulan el tratamiento con suero autólogo y que cuentan con el respaldo de una dilatada investigación y experiencia clínica.

Así pues, instruimos a los pacientes para mantener los botes de PRGF a -20°C por un máximo de 3 meses, exceptuando el frasco en uso, que debe mantenerse a 4°C por un máximo de 5-7 días.

3.4.7 Concentración

Atendiendo también a los antecedentes de las concentraciones de suero autólogo empleadas para los dos grupos de patologías oculares objeto de nuestro estudio, decidimos diluir el sobrenadante con una solución salina balanceada (BSS®, Alcon, España).

En el grupo de ojo seco diluimos el W.P hasta alcanzar una concentración del 20%.

En el caso de los defectos epiteliales persistentes, en los que prima la rápida reparación corneal, aplicamos una concentración de PRGF del 50%, como sugieren las publicaciones más recientes del empleo del suero autólogo para el tratamiento de úlceras tróficas^{118 119}

Además, en un subgrupo de 12 pacientes con ojo seco y 14 DEPs, es decir el 11,32% y el 26,82% de la muestra respectivamente, utilizamos el PRGF® sin diluir. Dicho subgrupo fue elegido en base a la fecha de consulta, tratándose de los últimos casos reclutados y una vez comprobada la seguridad y tolerancia del PRGF® líquido activado a concentraciones inferiores. Sirvieron de apoyo para tomar dicha decisión por un lado, varios estudios sobre los niveles de TGFb1 presente en el WP y la ausencia de estimulación de fibrosis secundaria al mismo³² y por otro lado, publicaciones del uso del S.A al 100%.¹²⁰

El PRGF resultante se transfiere finalmente a frascos de colirio estériles de 5ml etiquetados a nombre del paciente y con la advertencia de la imposibilidad de ser empleados por otra persona.

3.4.8 Posología

Establecimos una pauta de administración estándar en el ojo seco de 1 gota cada 6h.

En los defectos epiteliales persistentes tratados con PRGF al 50% la pauta fue de 1 gota cada 2 horas los primeros 2 días y de 1 gota cada 1/4h hasta cumplir la semana, con un descenso posterior paulatino en función de la evolución.

Para los pacientes tratados con PRGF al 100% establecimos una pauta constante de una gota cada 12h.

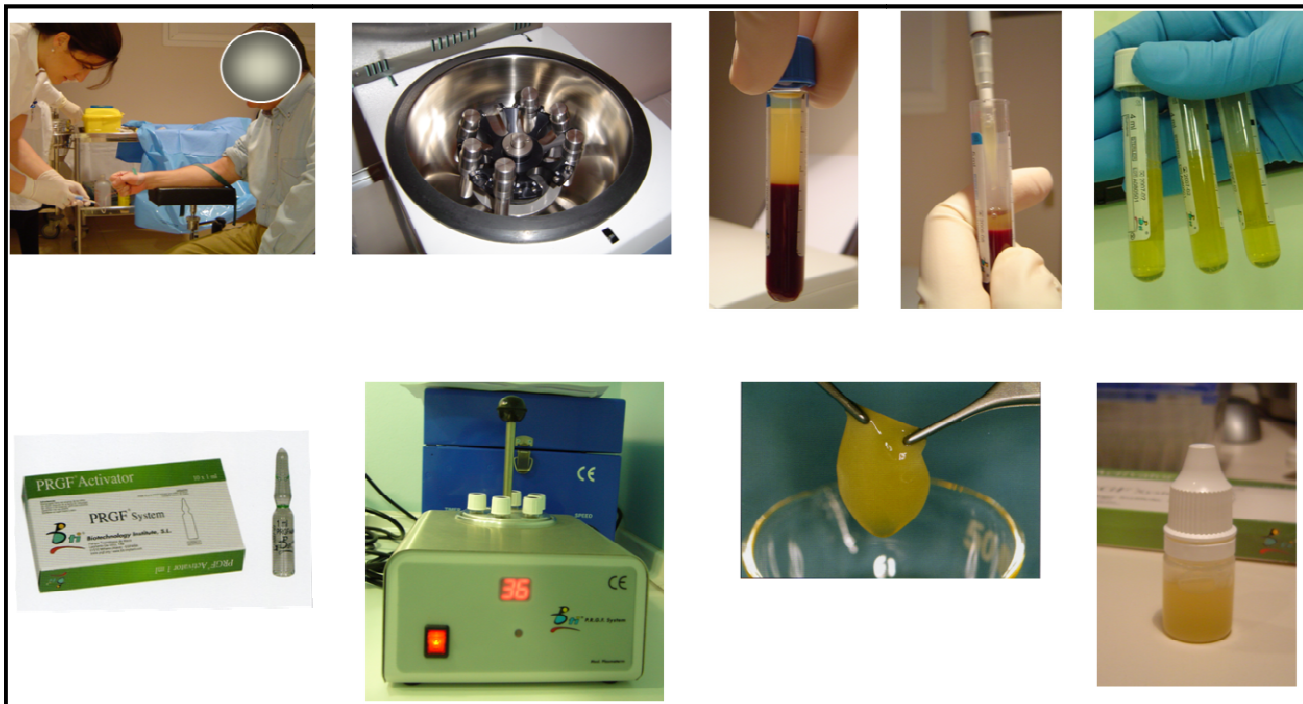


Figura 15 Proceso de elaboración del colirio de PRGF.

- 1) Obtención de la muestra de sangre por venopunción.
- 2) Centrifugación a 460g durante 8 minutos.
- 3) Muestra separada en sus tres componentes tras la centrifugación.
- 4) Recogida del WP o PRGF.
- 5 y 6) Se activa el PRGF con el PRGF activator®.
- 7) Bloque térmico utilizado para acelerar la coagulación del PRGF (opcional).
- 8) Retirada del coágulo de fibrina.
- 9) Recogida del sobrenadante y almacenamiento, una vez diluido, en frascos de colirio estériles de 5ml.

3.5 CARACTERIZACIÓN DEL PRGF

3.5.1 PH

Para realizar las mediciones de pH se utilizaron tiras Panreac® con una escala de colores (Panreac SLu, Barcelona, España). Dichas tiras constan de unas sustancias llamadas indicadores, que varían reversiblemente de color en función del pH del medio en el que se disuelvan.

La determinación de pH fue realizada en 60 muestras de PRGF obtenidas a partir de pacientes incluidos en el estudio así como de otros tratados en nuestro centro pero no pertenecientes a la población del estudio.

3.5.2 Osmolaridad

Se midió la osmolaridad mediante el Tear Lab Osmolarity System® (OcuSense, Inc, CA, USA) en 60 pacientes, sólo parte de los cuales pertenecían a la población analizada en este estudio.

3.5.3 Factores de crecimiento y albúmina.

A fin de caracterizar el preparado de PRGF en cuanto a su composición de factores de crecimiento, se cuantificaron las concentraciones de EGF, FGF, HGF, PDGF, VEGF, TGF- β 1 y albúmina, en un pool de 68 pacientes del ICQO, parte de los cuales no estaban incluidos en el presente estudio.

Las concentraciones de los factores de crecimiento EGF, FGF, HGF, VEGF y PDGF, se cuantificaron mediante la técnica colorimétrica ELISA. Para ello, se emplearon los kits comerciales Quantikine colorimetric sandwich ELISA kits® suministrados por R&D, Minneapolis, USA.

Estos kits comerciales se basan en el método llamado de sándwich para realizar la detección de los factores de crecimiento. Es decir, los standards y muestras se unen a un anticuerpo monoclonal específico para cada factor de crecimiento a cuantificar (capture antibody), el cual se encuentra unido a su vez al plástico de la placa que sirve como soporte para realiza la cuantificación. Gracias a un anticuerpo policlonal (detection antibody) unido a una enzima peroxidasa se revela y cuantifica la reacción. Este anticuerpo se une a la molécula del factor de crecimiento por el extremo opuesto al anterior, formando así el mencionado sándwich.

La cuantificación mediante los kits de los factores anteriormente citados a excepción del TGF- β 1, se puede dividir en los siguientes pasos:

- En placas de 96 pocillos, se añaden 100 μ l por pocillo del capture antibody a la concentración que especifica el fabricante, y se deja toda la noche a T^a ambiente.
- Se lava 3 veces, 200 μ l por pocillo, con una solución de 0,05% Tween® 20 en PBS (Wash Buffer).
- Para evitar las uniones inespecíficas de otras moléculas que no nos interesa cuantificar, se añaden 300 μ l de una solución de 1% Seroalbúmina bovina(BSA) en PBS (Reagent Diluent) en cada pocillo y se deja durante una hora.

- Se repiten los tres lavados con las mismas condiciones.
- Se realizan diluciones seriadas a partir de una concentración stock conocida de cada factor de crecimiento, las cuales denominamos Standards. Los valores de absorbancia de estos Standard conocidos nos permiten realizar una recta patrón a partir de la cual se conocerán las concentraciones de los factores en las muestras a testar.
- Se introducen 100 µl / pocillo de los Standards y las muestras de PRGF por triplicado, siguiendo un riguroso orden previamente establecido y se incuba overnight para que se produzca la reacción entre el anticuerpo y el factor de crecimiento.
- Se repiten los tres lavados con las mismas condiciones.
- Se añaden 100 µl / pocillo del segundo anticuerpo (detection antibody) a la concentración que especifica el fabricante, y se deja reaccionar durante 2 horas.
- Nuevamente se hacen tres lavados.
- A continuación se añaden 100 µl / pocillo de Streptavidin-HRP diluido 200 veces en reagent diluent y se incuba 20 minutos al abrigo de la luz, para que se una la enzima peroxidasa al detection antibody.
- Se realizan nuevamente los lavados.
- Finalmente se añade 100 µl / pocillo de una solución 1:1 de H₂O₂ y tetrametilbencidina, la cual actúa como sustrato de la enzima peroxidasa, dando lugar a 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 que se esté cuantificando (entre 5 y 20 minutos).
- Para realizar la cuantificación de forma homogénea en todos los pocillos se añaden 50 µl / pocillo de una solución 2N H₂SO₄ con el propósito de parar la reacción.
- Inmediatamente se determina la densidad óptica de cada pocillo, es decir, se lee la absorbancia para cada pocillo en el lector de placas ELISA a 450 nm. Se utiliza el programa informático denominado GEN 5.

A partir de los resultados obtenidos en los Standards con una concentración conocida, se realiza una recta patrón para cada GF, gracias a la cual se podrán conocer las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento en las distintas muestras de PRGF.

La medición del TGF-β1 requiere una secuencia específica y ligeramente diferente, constituida por los siguientes pasos:

- Se añaden 50µl del diluyente de muestra RD1-73.

- Se añaden 50µl de los Standards y muestras de PRGF por pocillo, tras lo cual se procede a mezclar su contenido y cubrirlo mediante las tiras adhesivas. La muestra se incuba entonces durante 2 h a temperatura ambiente.
- Se aspira cada pocillo y se lava, repitiendo este procedimiento un total de 3 veces. Cada pocillo es aclarado con la solución de lavado(400µl).
- Se añaden 100µl del anticuerpo de TGF-β1 a cada pocillo, y se cubren de nuevo con tiras adhesivas e incuban durante otras 2h a temperatura ambiente.
- Se repite el procedimiento de lavado y aspiración.
- Se añaden 100µl de la solución de sustrato a cada pocillo, dejándolos incubar durante 30 minutos.
- Se añaden 100µl de solución inhibitoria a cada pocillo y se remueve bien el contenido.
- La determinación final de la densidad óptica no presenta variaciones respecto a la descrita para el resto de factores.

La albúmina a cuantificada mediante fotolorimetría previo envío de las muestras (alícuotas de 1 ml) al laboratorio de una clínica cercana (Clínica de La Virgen Blanca).

Los resultados quedaron expresados en pg/ml para todos los factores y en g/ml para la albúmina.

3.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado y cotejado por el Dr. Jose Ignacio Pijoan, Jefe de Sección de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Cruces (Baracaldo, Vizcaya) por medio del programa estadístico Stata (StataCorp, College Station, USA), considerándose estadísticamente significativas las pruebas con valores de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 GRUPO OJO SECO

4.1.1 Síntomas.

Tras un ciclo de 3 meses de tratamiento con colirio de PRGF se produjo una mejoría sintomática en el 75,47% (74/106) de los pacientes. La mejoría fue importante en el 32,08% (34/106) de los casos, moderada en el 25,47% (27/106) y leve en el 17,92% (19/106), no habiendo mejoría en el 24,53% restante (19/106).

Podemos ver la distribución de la evolución sintomática del grupo en el siguiente gráfico.

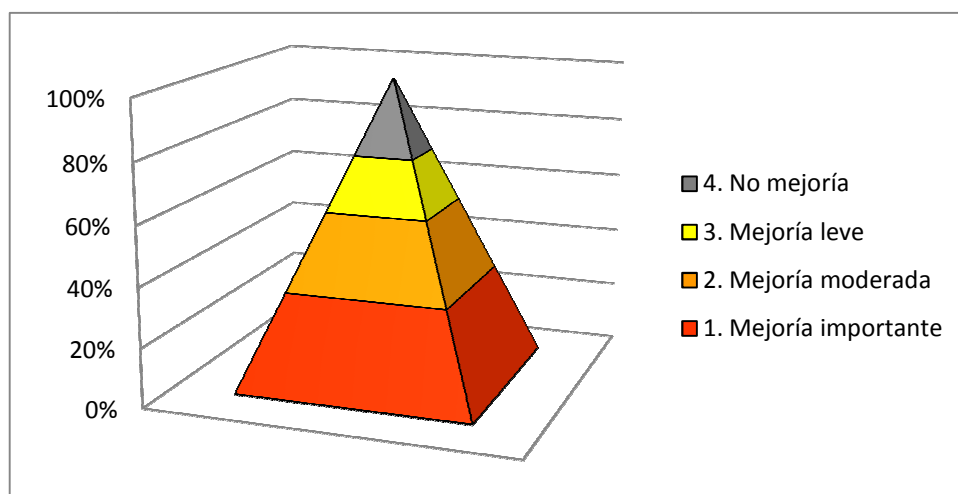


Figura 16 Evolución sintomática de los pacientes tras el tratamiento con colirio de PRGF.

En un subgrupo de 42 pacientes se efectuó una cuantificación de los síntomas mediante el cuestionario SiDEQ modificado, como describíamos en el apartado de Material y Métodos, realizado de forma previa y posterior al tratamiento.

La mayoría, esto es, el 97,61% de estos 42 pacientes, tenían síntomas moderados-severos antes de comenzar el tratamiento con PRGF. Concretamente, el 54,76% (23/42) presentaban síntomas moderados, el 42,85% (18/42), severos mientras que solamente un 2,38% (1/42) mostraba síntomas leves. La media global de los síntomas pre-tratamiento fue de $20,29 \pm 0,95$ (rango entre 10 y 32), siendo la media en el grupo de síntomas moderados, de $16,17 \pm 3,47$ y en el grupo de síntomas severos, de $26,11 \pm 3,14$.

Los valores medios post-tratamiento fueron de $12,60 \pm 1,20$ (rango entre 0 y 26), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con el promedio pre-tratamiento ($p < 0,001$) (*t de Student*).

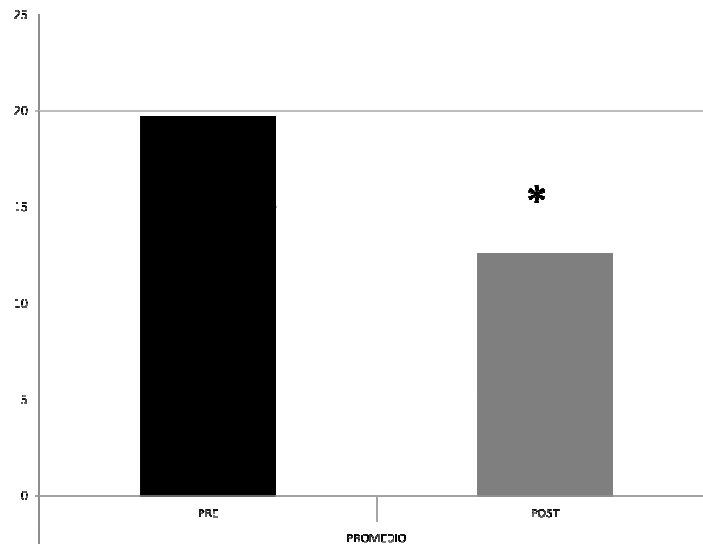


Figura 17 Promedio de la puntuación en el cuestionario SiDEQ previa y posterior al tratamiento.

4.1.2 Tinción verde lisamina.

La tinción verde lisamina pre y post-tratamiento pudo ser completada en 72 pacientes, mostrando una puntuación media pre-tratamiento de $2,76 \pm 2,66$ (rango entre 0 y 9) y post-tratamiento de $1,70 \pm 2,06$ (rango entre 0 y 9), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) (*t de Student*).

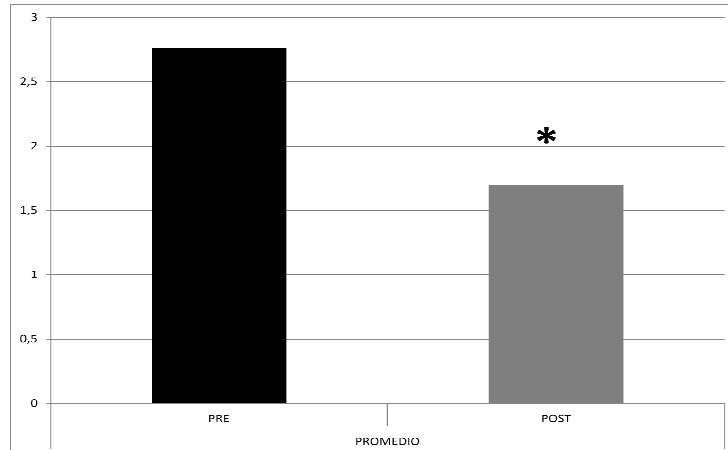


Figura 18 Promedio de la puntuación en la tinción verde lisamina (escala de van Bijsterveld) previa y posterior al tratamiento.

4.1.3 Test de Schirmer con anestesia.

Los datos del test de Schirmer con anestesia pre y post-tratamiento corresponden a 69 pacientes. El promedio de la prueba pre-tratamiento con PRGF fue de $4,21 \pm 6,12$ mm (rango entre 0 y 30), mientras que el post-tratamiento fue de $4,76 \pm 5,85$ mm (rango entre 0 y 30), si bien este incremento no alcanzaba la significación estadística ($p = 0,16$) (*t de Student*).

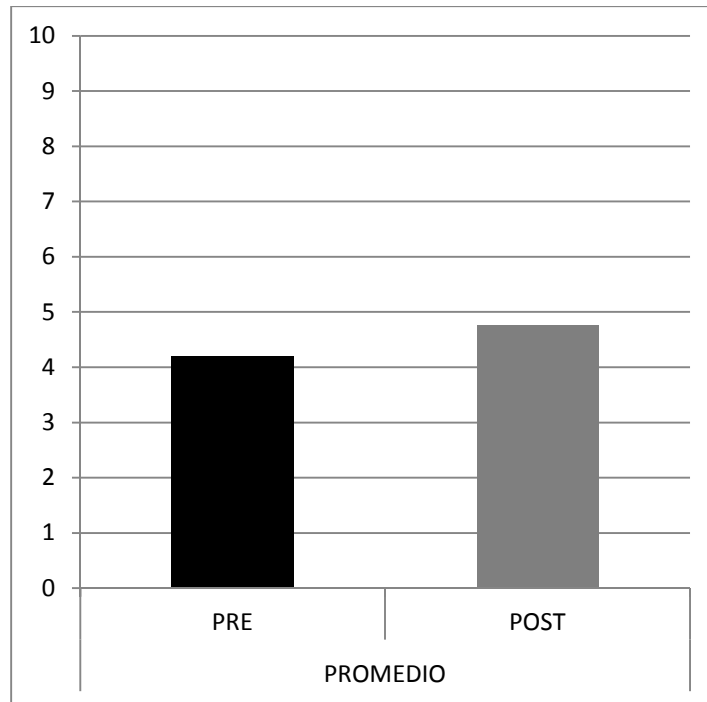


Figura 19 Promedio de la puntuación en el test de Schirmer con anestesia previa y posterior al tratamiento.

4.1.4 Citología de impresión.

La citología de impresión fue completada en un total de 22 pacientes, siendo los valores medios de metaplasia escamosa pre-tratamiento de $1,87 \pm 0,92$ (rango entre 0 y 4) y los post-tratamiento de $1,05 \pm 1,23$ (rango entre 0 y 4), resultando dicha diferencia significativa desde el punto de vista estadístico ($p=0,015$) (*t de Student*).

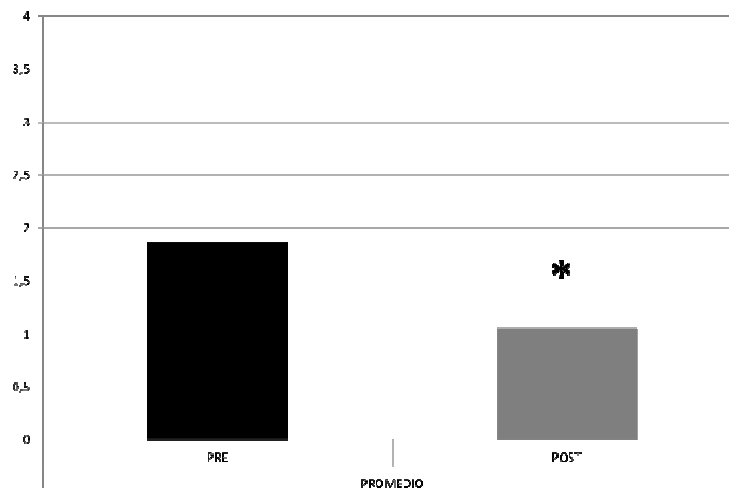


Figura 20 Promedio del grado de metaplasia escamosa pre y postratamiento.

4.1.5 Factores relacionados con el tratamiento.

El colirio de PRGF fue administrado como tratamiento único en el 57,54% de los pacientes (61/106), siendo el tratamiento asociado más frecuente el empleo ocasional de lágrimas artificiales.

La duración media del tratamiento fue de $6,6 \pm 6,6$ meses (rango entre 3 y 33 meses).

De los pacientes que sólo recibieron un único ciclo de tratamiento (64/106), un 15,62% (10 pacientes) precisaron con posterioridad un nuevo ciclo. Por otro lado, 22 de los 106 pacientes de ojo seco incluidos en el estudio seguían de forma continuada con el PRGF a la conclusión del mismo.

La tolerancia al tratamiento fue buena en la mayoría de los pacientes, concretamente en el 98,11% (104/106), con 1 caso de tolerancia regular, asociada a la temperatura fría del colirio de PRGF y otro caso de tolerancia mala, que incluso motivó el abandono del tratamiento al cabo de 1 mes de iniciado. En ninguno de los dos casos se observaron signos de irritación local asociados al tratamiento o empeoramiento en los parámetros objetivos de sequedad ocular.

No se observó ningún efecto adverso secundario al tratamiento con PRGF.

4.1.6 Relación entre síntomas y diagnóstico.

La distribución de la mejoría de síntomas en los distintos grupos diagnósticos mostró una tendencia a un mayor porcentaje de mejoría global en el grupo acuodeficiente no Sjögren con respecto al resto de diagnósticos, así como una mejoría más proclive a ser leve en el grupo de ojo seco tipo Sjögren. Sin embargo, dicha tendencia no resultó ser estadísticamente significativa ($p=0,322$) (*test exacto de Fischer*)

Podemos ver los resultados porcentuales de dicho análisis en la siguiente tabla.

EVOLUCIÓN SÍNTOMAS	DIAGNÓSTICO				
	OSAD no SS	OSAD SS	DGM	Mixto	Total
1. Mejoría importante	38,73%	21,00%	37,50%	25,00%	31,65%
2. Mejoría moderada	28,57%	10,00%	12,50%	33,33%	20,58%
3. Mejoría leve	18,37%	40,00%	12,50%	8,33%	17,72%
4. No mejoría	14,33%	30,00%	37,50%	33,33%	29,05%
Total	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 14 Relación porcentual de la evolución sintomática de los pacientes según el subgrupo diagnóstico de ojo seco.

4.1.7 Relación entre síntomas y edad.

Analizamos la relación entre la mejoría o no de los síntomas y la edad de los pacientes, según estos tuvieran más de 50 años o 50 años o menos, basándonos en la observación por parte de otros grupos de una mayor respuesta terapéutica en los pacientes ≤ 50 años¹²¹.

En nuestro caso, sin embargo, observamos que un mayor porcentaje de pacientes mayores de 50 años mejoraban en relación a los más jóvenes (78,75% versus 65,38%, respectivamente), aunque no se encontró una asociación estadísticamente significativa ($p=0,895$) (ANOVA de una vía).

Como vemos en la siguiente tabla y gráfico, la distribución de los grados de mejoría fue bastante similar en ambos grupos de edad.

EVOLUCIÓN SINTOMÁTICA	RANGO DE EDAD		
	≤ 50	> 50	Total
1. Mejoría importante	34,62%	31,25%	32,08%
2. Mejoría moderada	15,38%	28,75%	25,47%
3. Mejoría leve	15,38%	18,75%	17,92%
4. No mejoría	34,62%	21,25%	24,53%
Total	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 15 Relación porcentual de la evolución sintomática de los pacientes según su edad (grupo ≤ 50 y grupo >50).

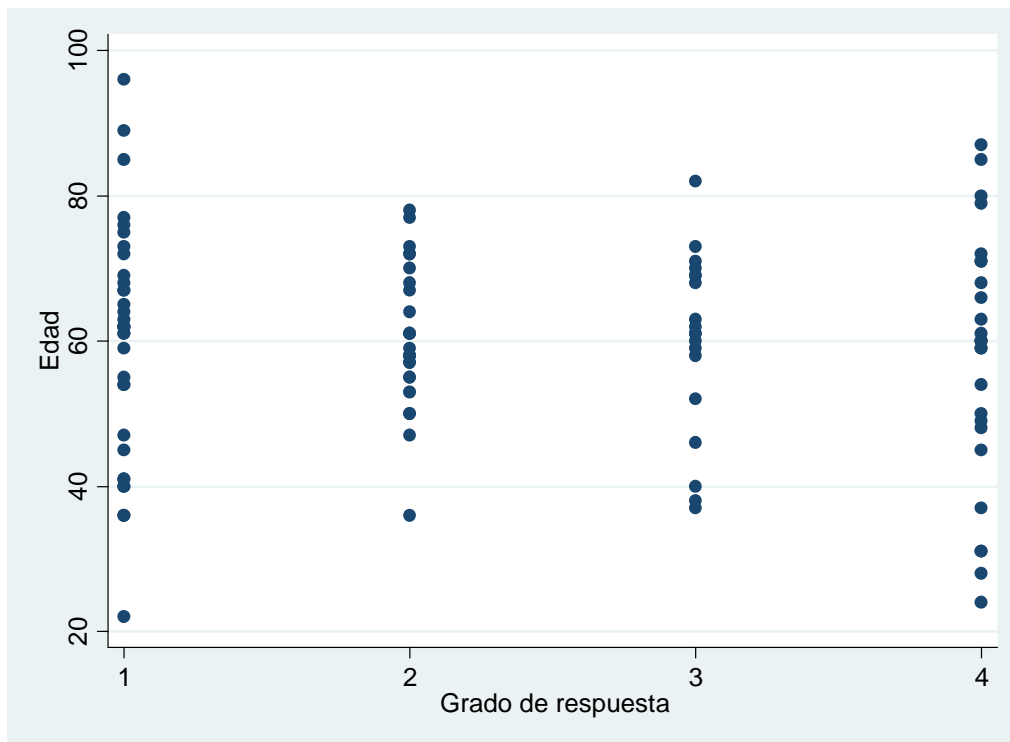


Figura 21 Distribución del grado de respuesta en términos subjetivos de los pacientes en función de su edad.

Los grados de respuesta clínica de 1 a 4 corresponden a : 1: mejoría importante. 2: mejoría moderada. 3: mejoría leve. 4: no mejoría.

4.1.8 Relación entre síntomas y sexo.

Se observó una mayor tendencia a la mejora sintomática en las mujeres en comparación con los hombres (76,29% versus 66,67%), no alcanzando sin embargo significación estadística ($p=0,463$) (*test exacto de Fisher*), aunque con mejorías de mayor cuantía a favor de los varones.

Como podemos ver en la siguiente tabla, en las mujeres se constató una distribución más homogénea entre los grados leve, moderado e importante de mejoría que en los hombres, donde la mejoría era fundamentalmente importante.

EVOLUCIÓN SINTOMÁTICA	SEXO		
	M	V	Total
1. Mejoría importante	30,93%	44,44%	32,08%
2. Mejoría moderada	25,77%	22,22%	25,47%
3. Mejoría leve	19,59%	0,00%	17,92%
4. No mejoría	23,71%	33,33%	24,53%
Total	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 16 Relación porcentual entre el grado de mejoría de síntomas y el sexo.

4.1.9 Relación entre síntomas y tinción verde lisamina.

No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la mejoría de síntomas y la puntuación en la tinción verde lisamina ($p=0,840$) (*test exacto de Fischer*) aunque se apreció una leve tendencia a una mayor mejora de la tinción verde lisamina en el grupo que había presentado una mejoría importante de síntomas.

EVOLUCIÓN SINTOMÁTICA	MEJORÍA EN TINCIÓN VL		
	no	si	Total
1. Mejoría importante	22,22%	29,41%	25,71%
2. Mejoría moderada	30,56%	26,47%	28,57%
3. Mejoría leve	19,44%	23,53%	21,43%
4. No mejoría	27,78%	20,59%	24,29%
Total	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 17 Relación porcentual entre la evolución sintomática y la mejoría en la tinción verde lisamina.

4.1.10 Relación entre síntomas y test de Schirmer con anestesia.

No se halló relación entre la evolución sintomática y la mejoría en el test de Jones de los pacientes, como podemos ver en la tabla adyacente ($p=0,311$) (Anova de una vía)

EVOLUCIÓN SINTOMÁTICA	MEJORÍA DEL TEST DE JONES		
	no	si	Total
1. Mejoría importante	18.60%	20,00%	19,12%
2. Mejoría moderada	32.56%	32,00%	32,35%
3. Mejoría leve	20.93%	24,00%	22,06%
4. No mejoría	27.91%	24,00%	26,47%
Total	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 18 Relación porcentual entre la evolución sintomática y la mejoría en el test de Schirmer con anestesia (test de Jones).

4.1.11 Relación entre síntomas y citología de impresión.

Analizamos la correspondencia entre la severidad de los síntomas y el grado de metaplasia escamosa en los 22 pacientes en los que se tomaron muestras para citología de impresión.

No existía una relación estadísticamente significativa entre ambas variables ($p=0,429$) (ANOVA de una vía).

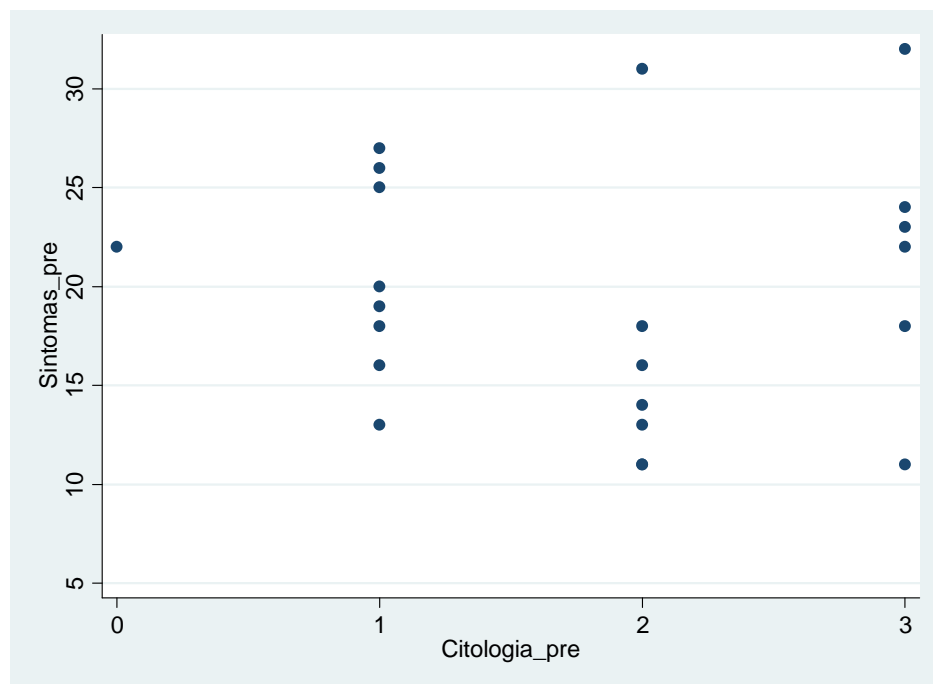


Figura 22 Gráfico que muestra la relación entre la severidad de los síntomas y el grado de metaplasia escamosa en la citología de impresión previos al tratamiento con PRGF

En la tabla que sigue a continuación recogemos las puntuaciones en el cuestionario SiDEQ modificado y los resultados de la citología de impresión pre y post-tratamiento por cada paciente.

Paciente.nº	SÍNTOMAS PRE	CITOLOGÍA PRE	SÍNTOMAS POST	CITOLOGÍA POST
3	22	0	4	0
4	11	3	1	0
5	16	2	14	0
8	26	1	22	1
10	18	1	8	0
11	23	3	20	3
25	31	2	16	3
27	11	2	12	2
33	14	2	5	0
34	13	2	9	1
35	24	3	11	4
36	18	3	4	2
37	20	1	15	1
38	32	3	22	x
39	13	1	6	0
40	27	1	13	0
45	25	1	x	x
46	18	2	x	x
59	19	1	26	2
60	22	3	5	x
69	16	1	17	0
88	11	2	1	1

Tabla 19 Puntuaciones individuales del cuestionario y citología de impresión previos y posteriores al tratamiento.

Como vemos, los datos previos corresponden a 22 pacientes. Los 4 casos en los que nos se pudo realizar la medición exacta posttratamiento, aparecen representados con un aspa.

Por otro lado, estudiamos si existía una asociación entre la mejoría de síntomas y la mejoría del grado de metaplasia escamosa una vez concluido el primer ciclo de tratamiento con PRGF (datos correspondientes a 18 de los 22 pacientes). Los hallazgos no mostraban una asociación estadísticamente significativa entre ambos parámetros ($p=0,223$) (*test exacto de Fischer*).

Sí que se observó una tendencia a una mayor mejora del grado de metaplasia escamosa en los casos de mejoría importante de síntomas, de modo que el 70% de los pacientes con mejoría subjetiva importante presentaron al mismo tiempo una mejora en el grado de metaplasia, como podemos ver detalladamente en la tabla y el gráfico inmediatamente inferiores.

EVOLUCIÓN SINTOMÁTICA	Grado de metaplasia		
	mejoría	no mejoría	Total
1. Mejoría importante	70,00%	22,22%	47,37%
2. Mejoría moderada	10,00%	22,22%	15,79%
3. Mejoría leve	10,00%	33,33%	21,05%
4. No mejoría	10,00%	22,22%	15,79%
Total	100,00%	100,00%	100,00%

Tabla 20 Relación porcentual entre la evolución sintomática y la mejoría en el grado de metaplasia escamosa.

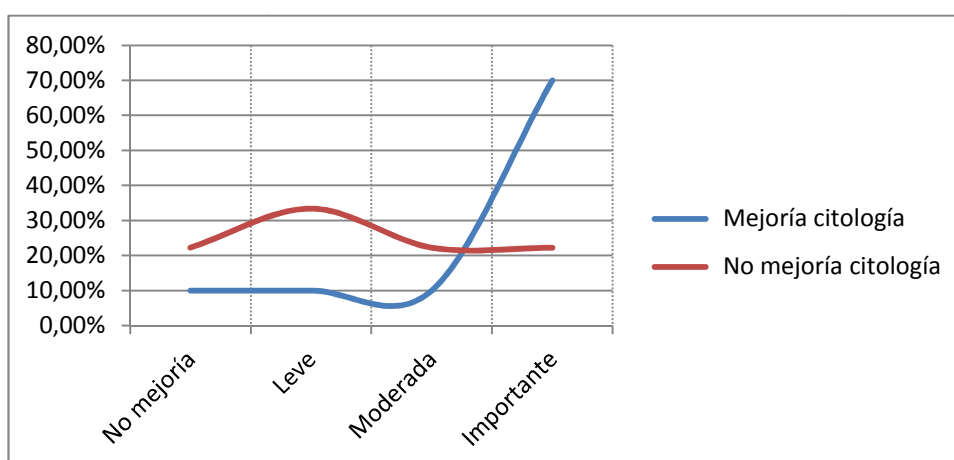


Figura 23 Gráfico que muestra la relación entre la mejoría de los síntomas y la mejoría en la citología de impresión.

4.1.12 Relación entre la mejoría y concentración del PRGF.

La mayoría de los pacientes del grupo de ojo seco, concretamente el 88,67% (94/106) recibieron tratamiento con PRGF al 20%. Analizamos aún así, la posibilidad de la existencia de una relación entre la mejoría de los distintos parámetros analizados y la concentración de PRGF.

- Mejoría sintomática y concentración de PRGF:

Observamos una tendencia a una mayor mejoría sintomática en el grupo de pacientes tratados con PRGF al 20% que en el grupo de pacientes tratados con PRGF al 100%. No obstante, dicho hallazgo no resultó ser estadísticamente significativo ($p=0,577$) (test exacto de Fisher).

Mejoría					
PRGF	1. Importante	2. Moderada	3. Leve	4. No mejoría	Total
20%	31 32.98	25 26.60	17 18.09	21 22.34	94 100.00
100%	3 25.00	2 16.67	2 16.67	5 41.67	12 100.00
Total	34 32.08	27 25.47	19 17.92	26 24.53	106 100.00

- Mejoría de la tinción VL y concentración de PRGF:

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de pacientes que mejoraban en la puntuación de la tinción con VL con respecto a la concentración de PRGF empleada: 48,39% en el grupo de PRGF al 20% versus 50% en el grupo de PRGF al 100% ($p=1,00$) (test exacto de Fisher).

Tampoco encontramos una asociación entre el grado de mejoría de la tinción VL y la concentración de PRGF empleada: $-1,258 \pm 0,245$ en el grupo de PRGF al 20% versus $-1,3 \pm 0,495$ en el grupo de PRGF al 100% ($p=0,948$) (t de Student).

- Mejoría del test de Schirmer y concentración de PRGF:

En ambos grupos observamos casos de aumento y disminución en el test de Jones, como podemos ver en el siguiente gráfico.

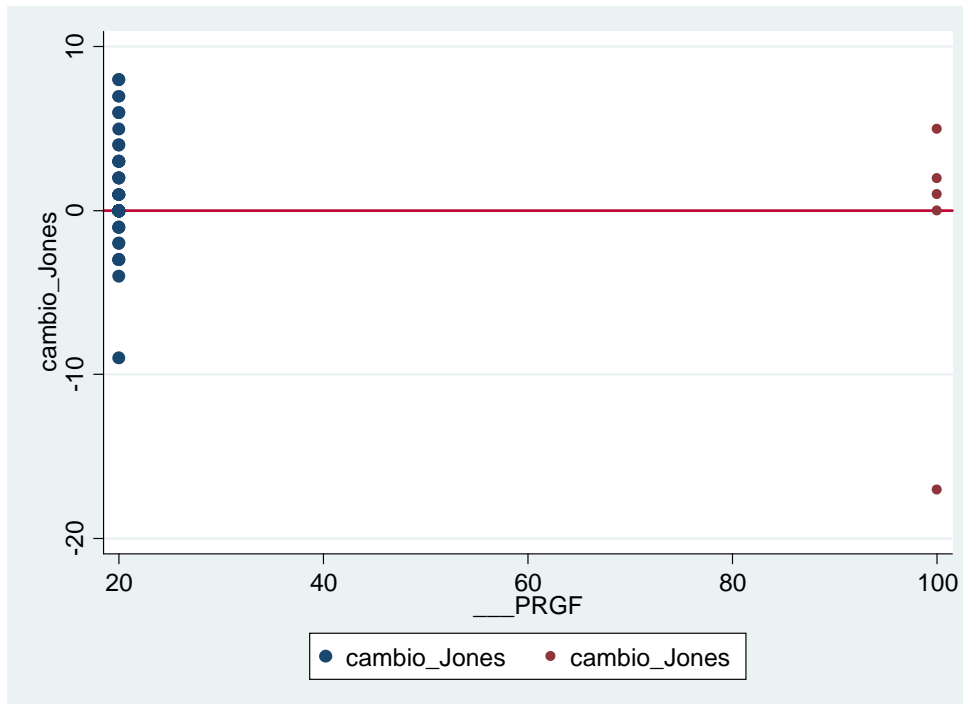


Figura 24 Cambio en el test de Jones tras tratamiento con PRGF al 20% y 100%.

Las diferencias en cuanto al porcentaje de pacientes que mejoraban en el test de Jones con PRGF al 20% y al 100% no resultaron estadísticamente significativas (34,38% versus 60%, $p= 0,344$) (*test exacto de Fisher*).

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de tratamiento con respecto al cambio en la puntuación del test de Jones (+0,781mm versus -1,8mm, $p= 0,544$) (*t de Student*).

- Mejoría de la citología de impresión y concentración de PRGF:

Todos los pacientes a los que se les realizó la citología de impresión recibieron tratamiento con PRGF al 20%, por lo que no pudimos analizar dicha relación.

4.2 GRUPO DEFECTOS EPITELIALES PERSISTENTES (DEP)

4.2.1 Tasa y tiempo de cicatrización.

El tiempo medio de evolución de los DEP antes de comenzar el tratamiento con PRGF era de $12,4 \pm 24,6$ semanas, con una mediana de 3,0 semanas.

El cierre con el tratamiento con PRGF se produjo en el 92,53% de los casos (49/53).

Los 4 casos en los que fracasó el tratamiento, correspondían a 2 defectos yatrogénicos (el paciente nº9, postfacioemulsificación no complicada con profilaxis antiherpética oral por un antecedente herpético y el nº18,

postfacoemulsificación no complicada con antecedente de radioterapia facial ipsilateral), 1 neurotrófico herpético (paciente nº33) y uno neurotrófico no herpético postablación del núcleo trigeminal (paciente nº6). Todos fueron tratados finalmente con un recubrimiento conjuntival, salvo el caso nº6, en el que se implantó una queratoprótesis de Boston.

La media del tiempo de reepitelización completa fue de $5,6 \pm 6,2$ semanas, con una mediana de 4,0.

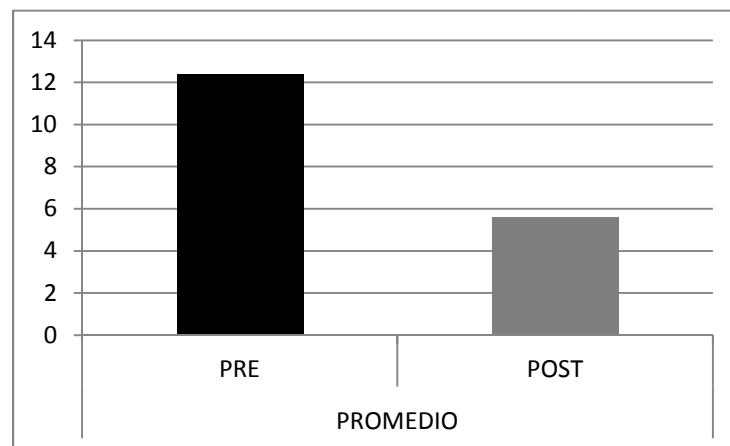


Figura 25 Promedio de duración (semanas) de los DEPs pre y post-tratamiento con PRGF.

4.2.2 Tratamientos asociados.

El PRGF fue administrado como tratamiento único en el 28,30% (15/53) de los pacientes.

En el 64,15% restante, la distribución porcentual mayoritaria corresponde al tratamiento exclusivamente médico (47,17% ó 25/53), seguida de la combinación de tratamiento médico y quirúrgico (16,98% ó 9/53) y de cirugía aislada (7,55% ó 4/53).

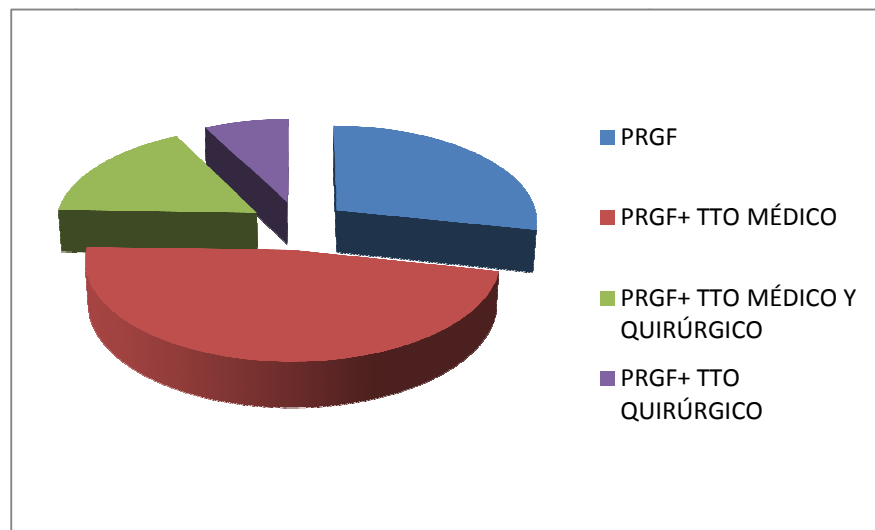


Figura 26 Distribución porcentual de la asociación o no del PRGF a otros tratamientos.

En la siguiente tabla presentamos detalladamente los procedimientos terapéuticos empleados en cada caso.

Pacientes n°	DIAGNÓSTICO	PAUTA PRGF	EFICACIA	TTOS ASOCIADOS
1	Neurotrófico no herpético	50%	sí	tATB+ C
2	DEP asociado a ojo seco severo	50%	sí	tATB+ C+ oATB
3	DEP asociado a ojo seco severo	50%	sí	oATB
4	Yatrogénico	50%	sí	tATB+ C
5	Traumático	50%	sí	tATB+ C
6	Neurotrófico no herpético	50%	no	tATB+ oATB
7	Neurotrófico no herpético	50%	sí	no
8	Neurotrófico no herpético	50%	sí	no
9	Yatrogénico	50%	no	tATB+ C+ oAV+ TMA
10	Neurotrófico herpético	50%	sí	oATB+ tATB
11	Neurotrófico herpético	50%	sí	no
12	Traumático	50%	sí	tATB+ C+ TMA+ tarsorrafia
13	Yatrogénico	50%	sí	no
14	Yatrogénico	50%	sí	no
15	Neurotrófico no herpético	50%	sí	no
16	Traumático	50%	sí	tATB
17	Neurotrófico no herpético	50%	sí	tATB
18	Yatrogénico	50%	no	tATB+ oATB+ TMA+ tarsorrafia
19	Neurotrófico herpético	50%	sí	tAV
20	DEP por toxicidad medicamentosa	100%	sí	no
21	Neurotrófico herpético	50%	sí	oATB
22	Neurotrófico herpético	50%	sí	tATB+ oAV
23	Yatrogénico	50%	sí	no
24	Yatrogénico	50%	sí	no
25	Neurotrófico no herpético	50%	sí	no
26	Neurotrófico no herpético	50%	sí	no
27	Traumático	50%	sí	no
28	Neurotrófico no herpético	50%	sí	tATB
29	DEP por toxicidad medicamentosa	50%	sí	no
30	Yatrogénico	50%	sí	no
31	Yatrogénico	50%	sí	no
32	Neurotrófico no herpético	50%	sí	LC

33	Neurotrófico herpético	50%	no	tATB+ oATB+ oAV
34	Neurotrófico no herpético	50%	sí	tATB+ C
35	Neurotrófico herpético	50%	sí	no
36	Yatrogénico	50%	sí	oATB+ LA
37	Neurotrófico no herpético	100%	sí	tATB
38	Traumático	50%	sí	oATB+ LA
39	Neurotrófico no herpético	50%	sí	LA
40	Traumático	50%	sí	LA+ tATB
41	Yatrogénico	100%	sí	LC+ TMA
42	Yatrogénico	100%	sí	no
43	Yatrogénico	100%	sí	oAV+ LA
44	Neurotrófico no herpético	100%	sí	tATB
45	Yatrogénico	50%	sí	LA+ C+ tATB
46	Yatrogénico	100%	sí	LA+ tATB
47	Yatrogénico	100%	sí	no
48	Yatrogénico	100%	sí	LC+ tATB+ C
49	Yatrogénico	100%	sí	tATB+ C
50	Yatrogénico	100%	sí	tATB+ C
51	Neurotrófico herpético	100%	sí	oAV
52	Yatrogénico	100%	sí	tATB+ Cp
53	Yatrogénico	100%	sí	LA

Tabla 21 Tabla resumen de la pauta (concentración) de PRGF empleada, la eficacia (cierre del DEP) y los tratamientos empleados en cada caso.

4.2.3 Sensibilidad corneal.

Se llevó a cabo la evaluación de la sensibilidad corneal antes del comienzo de la administración de PRGF en 35 pacientes, observándose una anestesia corneal completa en el 48,57% de los casos, una hipoestesia en el 37,14% y una sensibilidad conservada en el 14,29%.

La valoración de la sensibilidad una vez producido el cierre del defecto fue registrada en 21 de esos 35 pacientes. En ellos se analizó la existencia o no de mejoría, hallándose que en 4 pacientes con anestesia corneal pretratamiento existía, al fin del mismo, una hipoestesia corneal, lo que se traduce en una tasa de mejora de la sensibilidad del 19,04%.

4.2.4 Factores relacionados con el tratamiento.

El PRGF fue administrado a una concentración del 50% en el 73,58% de los casos (39/53) y al 100% en los 14 pacientes restantes.

El PRGF fue bien tolerado en el 94,34% (50/53) de los pacientes, regular en el 3,77%(2/53) y mala en 1 caso (1,89%). Mientras que los dos casos de tolerancia regular prosiguieron el tratamiento, con una mejora progresiva de la tolerancia al mismo, el caso de mala tolerancia, requirió su suspensión (caso nº18). Asociado al disconfort ante la administración del colirio de PRGF, dicho paciente presentaba un notable incremento de

la hiperemia e incluso quemosis conjuntival. Cabe destacar que había presentado una reacción similar con el suero autólogo, con el que había sido previamente tratado sin éxito.

En cuanto a los efectos adversos, se registró además del aumento de la hiperemia y quemosis local en el caso anterior, un caso de infiltrados subepiteliales durante el tratamiento con PRGF, sin la concurrencia, al menos conocida, de ningún otro factor causal. Puesto que se ha descrito dicha incidencia de forma anecdótica para el suero autólogo, consideramos que eran secundarios al tratamiento. La tasa de efectos adversos fue consecuentemente del 3,77% (2/53).

4.2.5 Relación tiempo de cicatrización y diagnóstico.

Se analizó la relación entre el diagnóstico etiopatogénico de los DEP y el tiempo de cierre aunque tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,101$) (*Chi-cuadrado*).

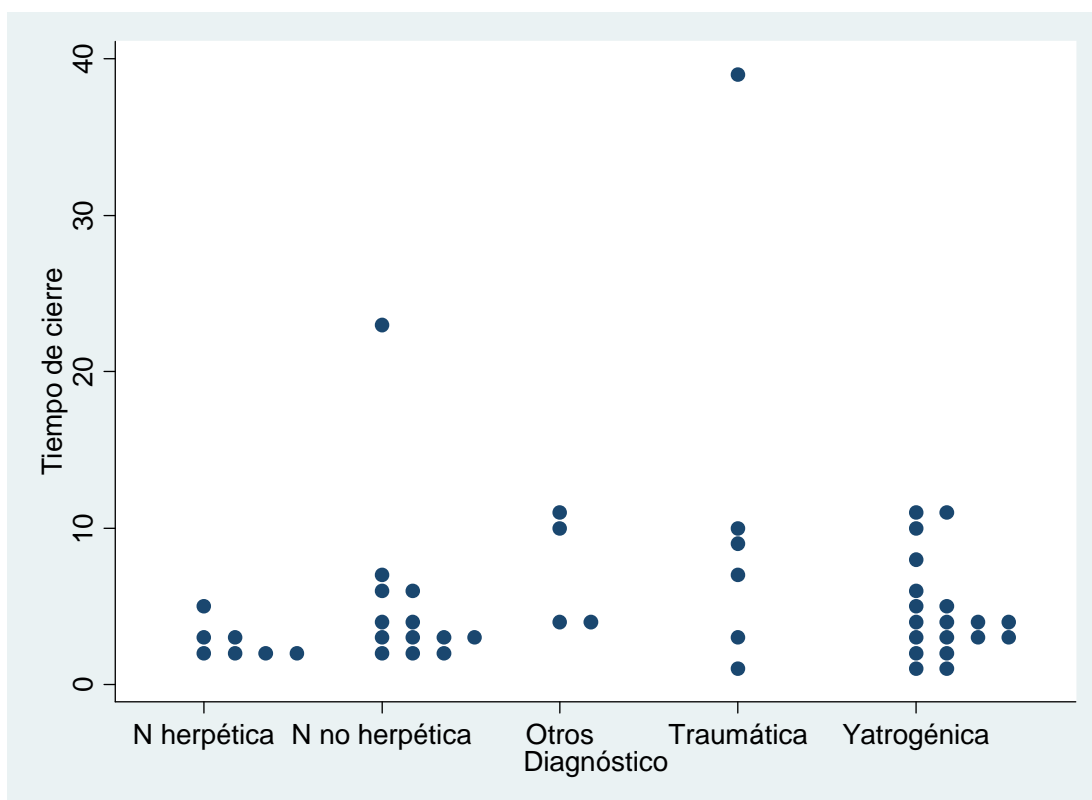


Figura 27 Relación entre el tiempo de cierre del DEP y el diagnóstico etiopatogénico.

Diagnóstico	T_cierre		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
Neurotrófica herpética	2.7142857	1.1126973	7
Neurotrófica no herpétic	5.2461538	5.5786222	13
Otros	7.25	3.7749172	4
Traumática	11.5	13.910428	6
Yatrogénica	4.7368421	3.1241373	19
Total	5.6163265	6.2259988	49

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

diagnostico_~m	Obs	Rank Sum
N herpética	7	100.00
N no herpética	13	313.00
Otros	4	144.00
Traumática	6	191.00
Yatrogénica	19	477.00

chi-squared = 7.734 with 4 d.f.
probability = 0.1018

chi-squared with ties = 7.891 with 4 d.f.
probability = 0.0957

4.2.6 Relación tiempo de cicatrización y pauta de tratamiento.

Se estudió la relación entre el empleo de PRG al 50% y al 100% con el tiempo de cicatrización, no hallándose una asociación entre ambas variables ($p=0,885$) (*chi-cuadrado*).

Llamaba la atención la mayor variabilidad en el tiempo de cierre en el grupo de pacientes tratados con PRGF al 50%.

PRGF	Summary of T_cierre		Freq.
	Mean	Std. Dev.	
50%	5.9714286	7.1434285	35
100%	4.7285714	2.9116288	14
Total	5.6163265	6.2259988	49

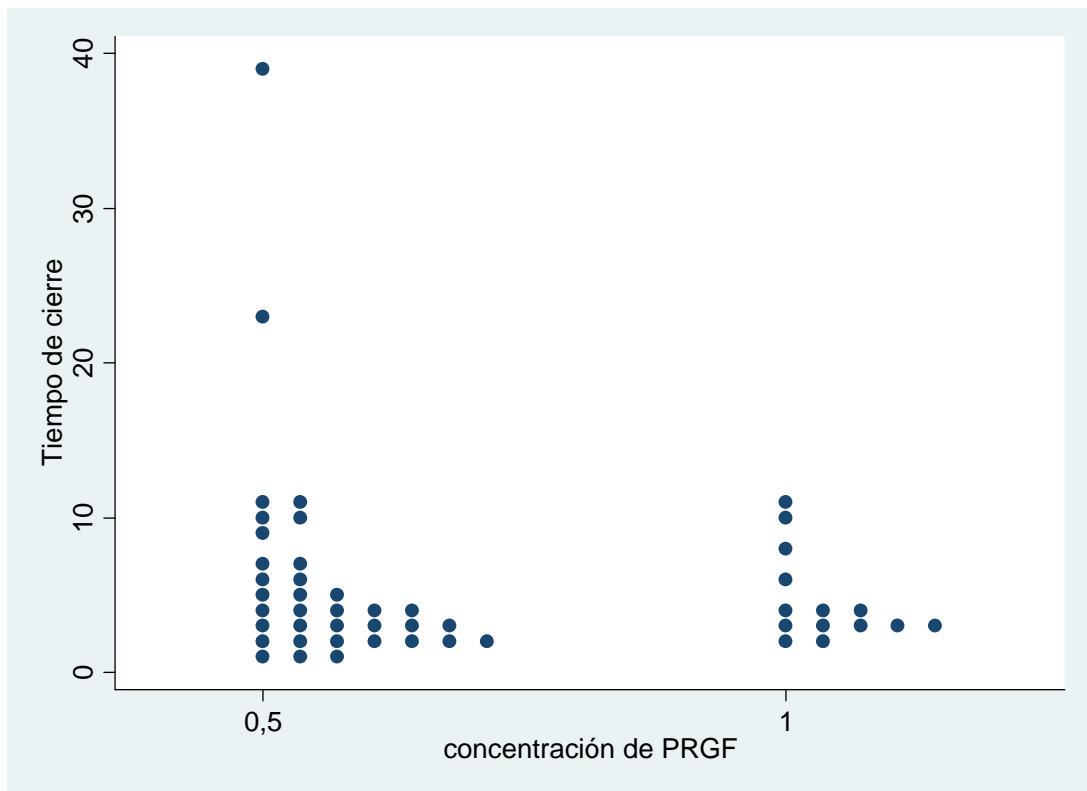


Figura 28 Relación entre la concentración de PRGF y el tiempo de cierre del DEP.

Kruskal-Wallis equality-of-populations rank test

Concen~n	Obs	Rank Sum
50%	35	868.50
100%	14	356.50

chi-squared = 0.021 with 1 d.f.
probability = 0.8856

chi-squared with ties = 0.021 with 1 d.f.
probability = 0.8845

4.2.7 Relación entre factores de crecimiento y tasa y tiempo de cicatrización.

Intentamos establecer la presencia de una relación lineal entre los distintos factores analizados y la tasa y tiempo de cierre, con las limitaciones claras en cuanto a la variabilidad interindividual de los factores y el escaso tamaño muestral. No observamos una correlación lineal para ninguno de los factores.

Mostramos los resultados por cada factor:

- EGF:

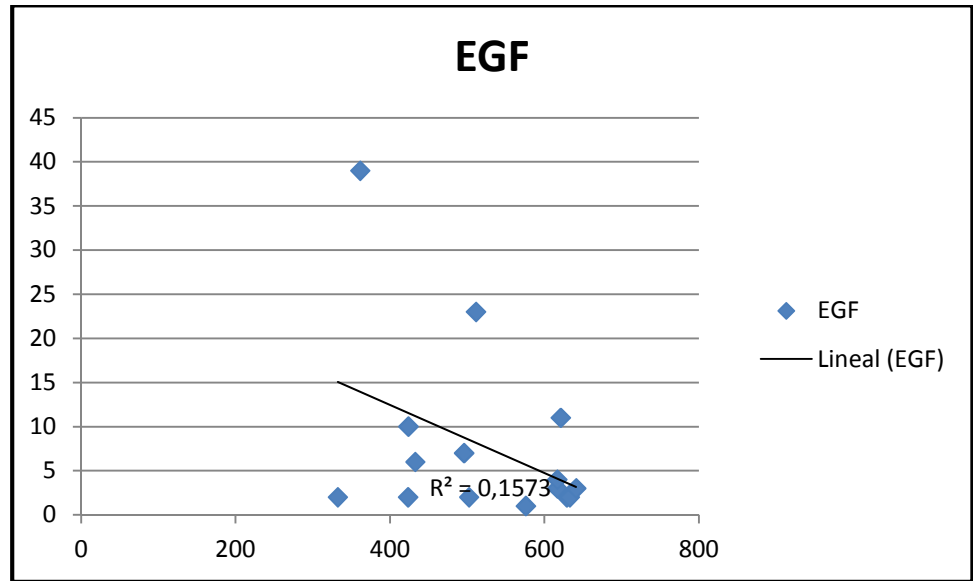


Figura 29 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el EGF.

- FGF:

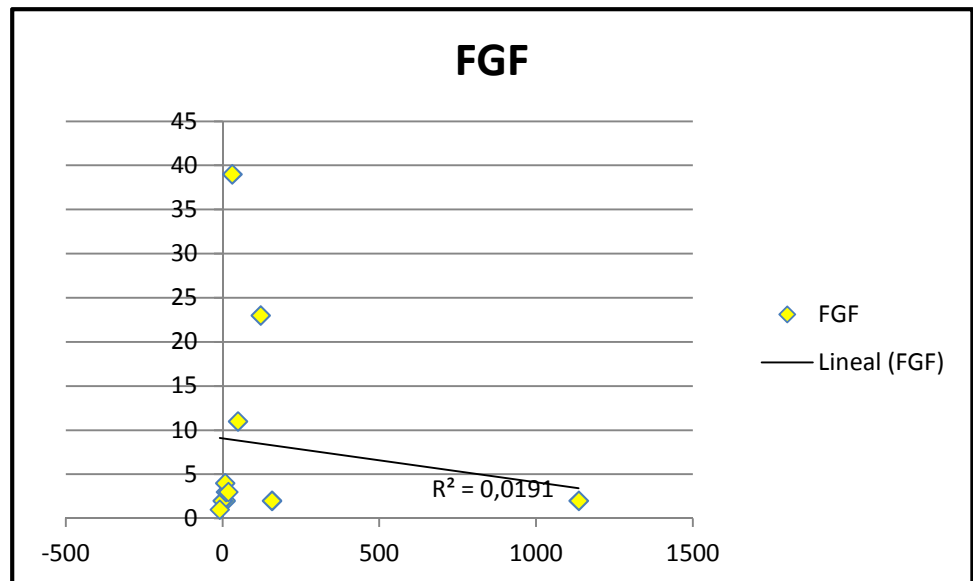


Figura 30 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el FGF.

- HGF:

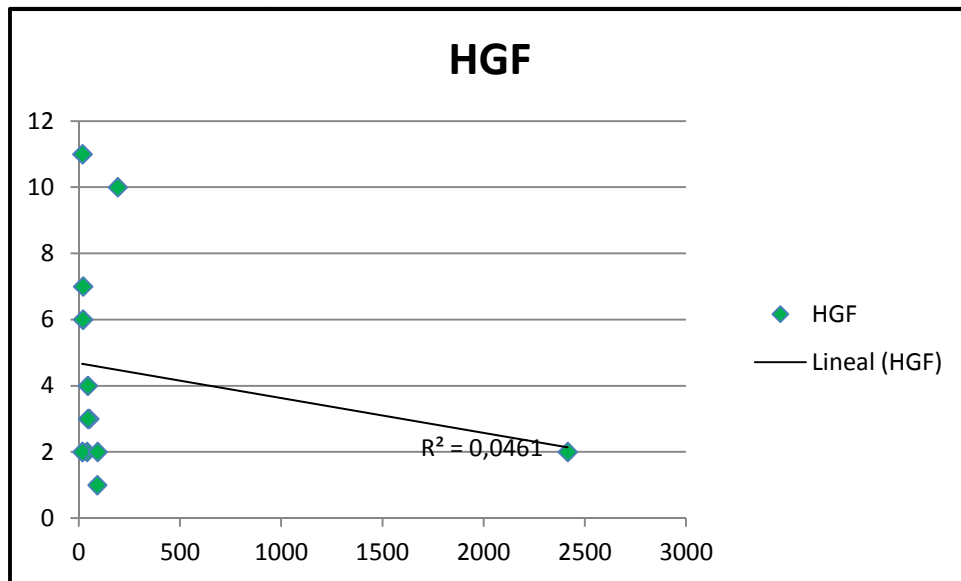


Figura 31 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el HGF.

- NGF:

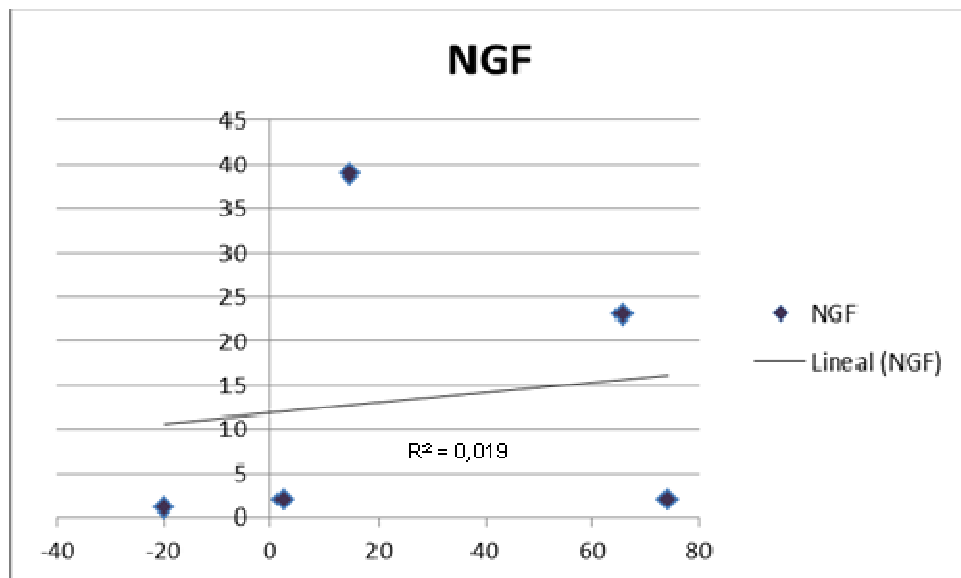


Figura 32 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el NGF.

- PDGF:

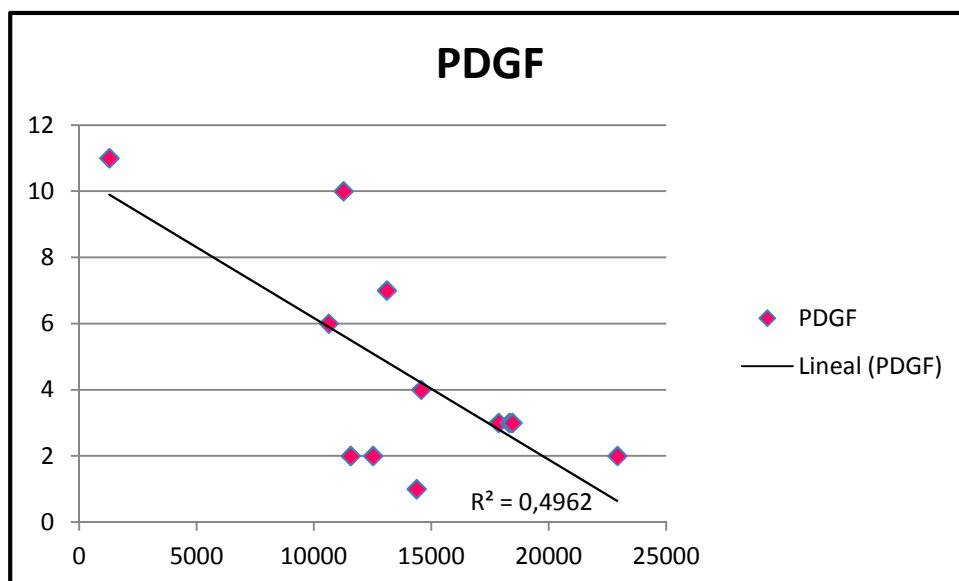


Figura 33 Correlación entre el tiempo de cierre del DEP y el PDGF.

4.3 CARACTERIZACIÓN DEL PRGF

4.3.1 pH.

Los valores de pH corresponden al colirio de PRGF procedente de 60 pacientes, de los cuales 32 habían sido diluidos con BSS al 20%, 9 al 50% y 19 no habían sido diluidos (PRGF al 100%).

	PRGF 20%	PRGF 50%	PRGF 100%
PH < 8	3	1	0
PH 8	25	2	6
PH > 8	4	6	13
Total de PRGFs	32	9	19

Tabla 22 Mediciones de pH del preparado de colirio de PRGF a distintas concentraciones.

Todos ellos se encontraban dentro del rango de tolerabilidad del ojo humano (entre 3,5 y 10,5), presentando concretamente valores entre 7 y 9.

Al analizar los colirios por concentraciones, se observa una tendencia al aumento de pH cuanto más concentrado es el colirio de PRGF, alcanzando en algunos casos de PRGF al 100%, valores cercanos a 9.

Mostramos en las siguientes gráficas los resultados numéricos obtenidos por cada grupo de concentración de PRGF.

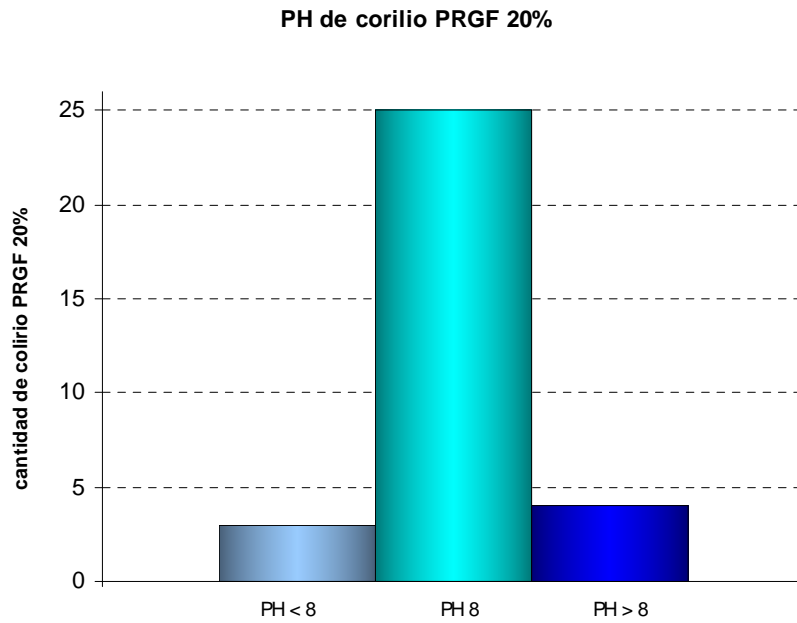


Figura 34 Medición del pH en las muestras de colirio de PRGF al 20%.

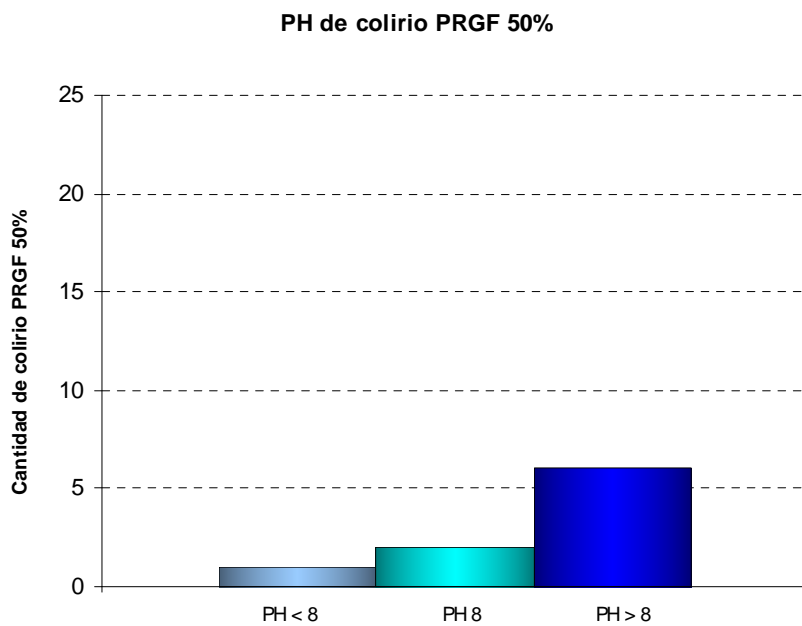


Figura 35 Medición de pH en las muestras de colirio de PRGF al 50%.

PH de colirio PRGF 100%

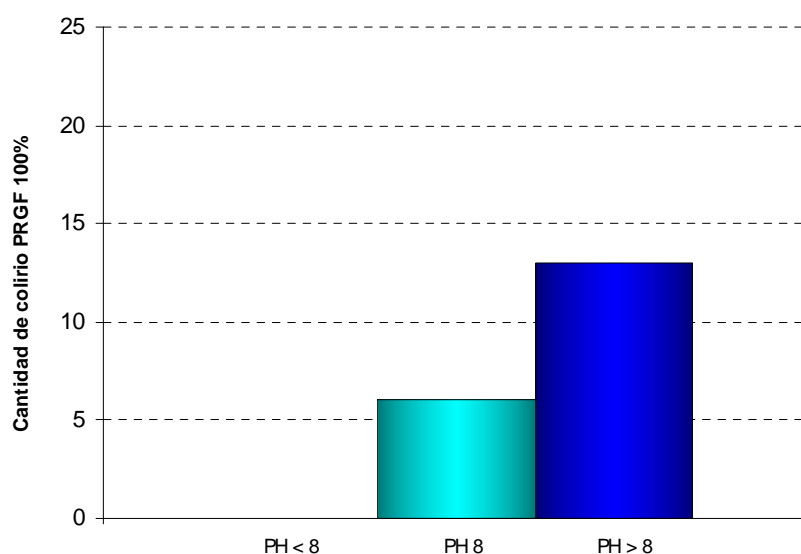


Figura 36 Medición de pH en las muestras de colirio de PRGF al 100%.

En definitiva, podemos concluir que todos los valores de pH de los colirios de PRGF para cualquiera de las tres concentraciones se encuentran dentro del rango de tolerabilidad del ojo, con valores de pH en general, superiores a los de la lágrima natural. Los valores de pH tienden a ser más altos en las muestras de PRGF al 100%. La explicación de ello se encuentra en el pH del diluyente empleado, el BSS, que es de 7,6.

4.3.2 Osmolaridad.

La osmolaridad fue evaluada en 61 colirios de PRGF, de los cuales 33 habían sido diluidos en BSS hasta alcanzar concentraciones del 20%, 9 al 50% y 19, no habían sido diluidos.

En los colirios de PRGF al 20% el rango de osmolaridad era amplio, aunque se encontraba en todos los casos, dentro de los límites de osmolaridad tolerables en colirio por el ojo humano (190-650 mOsm/l)¹²². Concretamente, y como podemos ver en el gráfico inmediatamente inferior, la mayoría se encontraban entre 280 y 290 mOsm/l (rango entre 276 y 297 mOsm/l).

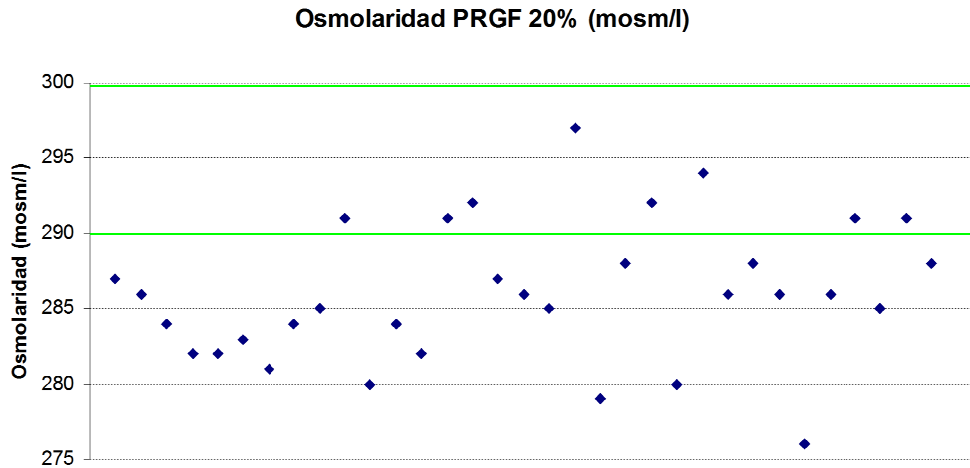


Figura 37 Osmolaridad del colirio de PRGF al 20%.

En el gráfico podemos ver los valores correspondientes a cada uno de los 33 pacientes en los que la muestra de PRGF fue diluida con BSS hasta alcanzar valores de concentración del 20%. Vemos, representados por dos líneas de color verde, el rango óptimo de osmolaridad (290-300 mOsm/l).

El número de muestras de colirios de PRGF al 50% en el que se realizó la osmolarimetría fue el más escaso, correspondiendo sólo a 9 pacientes del total de 61. En este caso el rango de osmolaridad oscilaba entre 276 y 304 mOsm/l, observándose en líneas generales una pequeña tendencia a valores menores que en el caso del PRGF al 20%.

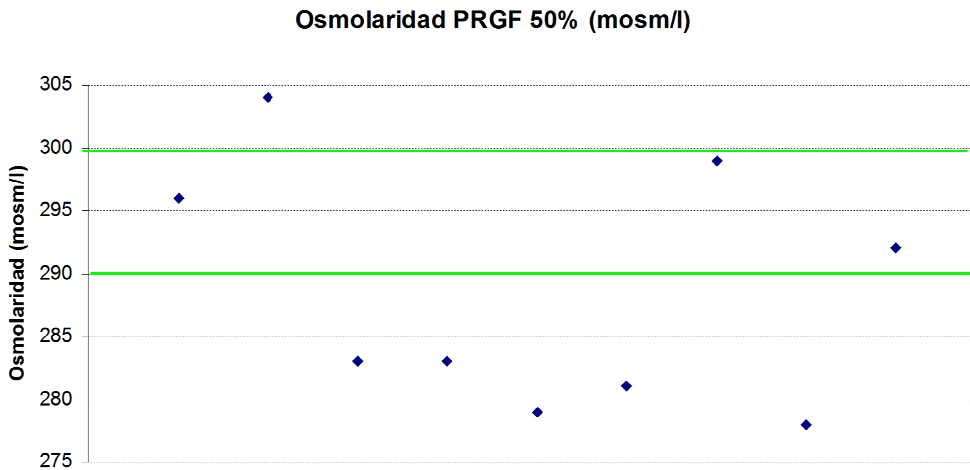


Figura 38 Osmolaridad del colirio de PRGF al 50 %.

En el gráfico podemos ver los valores correspondientes a cada uno de los 9 pacientes en los que la muestra de PRGF fue diluida con BSS hasta alcanzar valores de concentración del 50%. Vemos, representados por dos líneas de color verde, el rango óptimo de osmolaridad (290-300 mOsm/l).

En los colirios de PRGF al 100% se observó una clara tendencia a valores de osmolaridad inferiores a los de las muestras de PRGF diluidos con BSS (tanto al 20% como al 50%).

En 10 de las 19 muestras el valor de osmolaridad se encontraba por debajo del rango medible por nuestro osmómetro (<275 mOsm/l), mientras que en el resto de muestras, predominaban las mediciones menores de 280 mOsm/l.

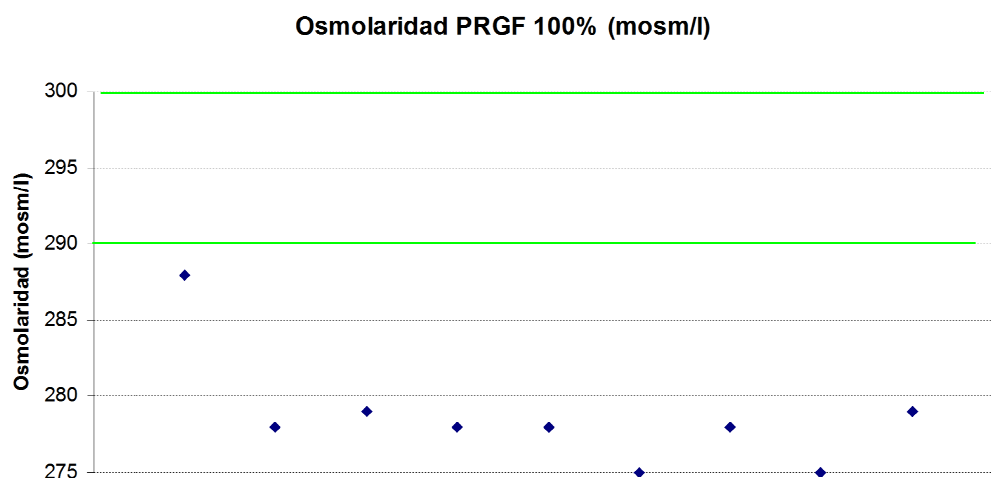


Figura 39 Osmolaridad del colirio de PRGF al 100%.

En el gráfico podemos ver los valores correspondientes a cada uno de los 19 pacientes en los que la muestra de PRGF no fue diluida. Vemos, representados por dos líneas de color verde, el rango óptimo de osmolaridad (290-300 mOsm/l).

En definitiva, podemos concluir que todos los valores de osmolaridad de los colirios de PRGF para cualquiera de las tres concentraciones se encuentran dentro del rango de tolerabilidad del ojo.

Además, como ya hemos comentado previamente, los valores de osmolaridad son ligeramente hiposmolares en relación a la lágrima natural para los tres preparados, siendo los más semejantes a la lágrima natural los correspondientes al PRGF al 20% y los más hiposmolares los correspondientes al PRGF al 100%. La explicación de ello se encuentra en la osmolaridad del diluyente empleado, el BSS, que es de 311 mOsm/l.

4.3.3 Factores de crecimiento y albúmina.

Los factores de crecimiento analizados fueron el EGF, el FGF, el HGF, el NGF, el PDGF, el VEGF, el TGF- β 1 y la albúmina.

Los valores de **EGF** fueron determinados en 53 pacientes, 17 hombres y 36 mujeres, con una media de edad de $57,39 \pm 14,71$ años (rango entre 23 y 84 años). El promedio de EGF fue de $500,45 \pm 147,05$ pg/ml (rango entre 124,44 y 735 pg/ml).

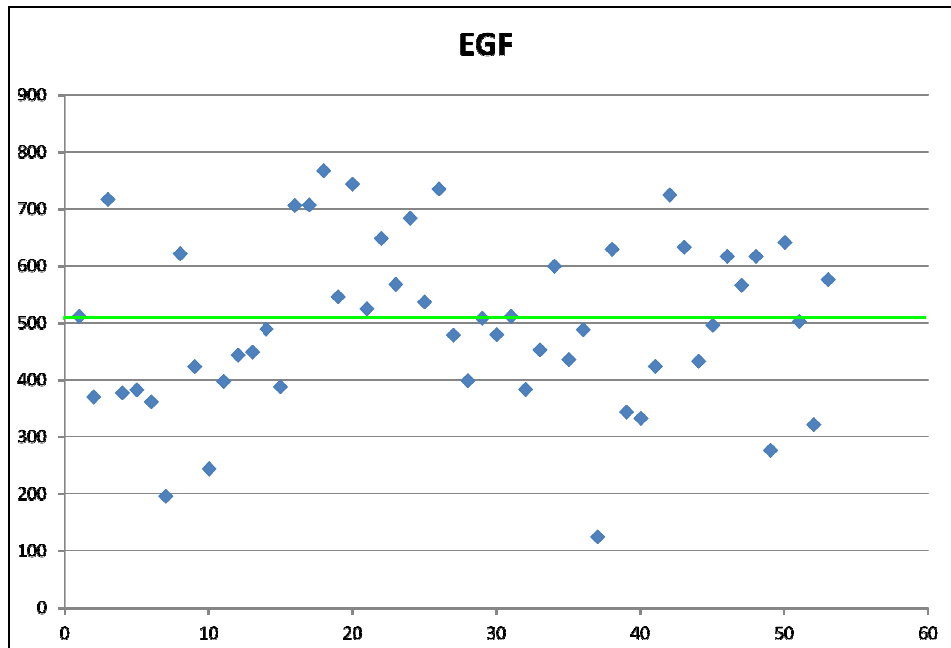


Figura 40 Concentración de EGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 53 pacientes. El valor medio fue de 500,45 pg/ml y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **FGF** fueron determinados en 48 pacientes, 15 hombres y 33 mujeres, con una media de edad de $55,86 \pm 14,58$ años (rango entre 23 y 78 años). El promedio de FGF fue de $60,68 \pm 175,89$ pg/ml (rango entre -11,95 y 1135,97 pg/ml).

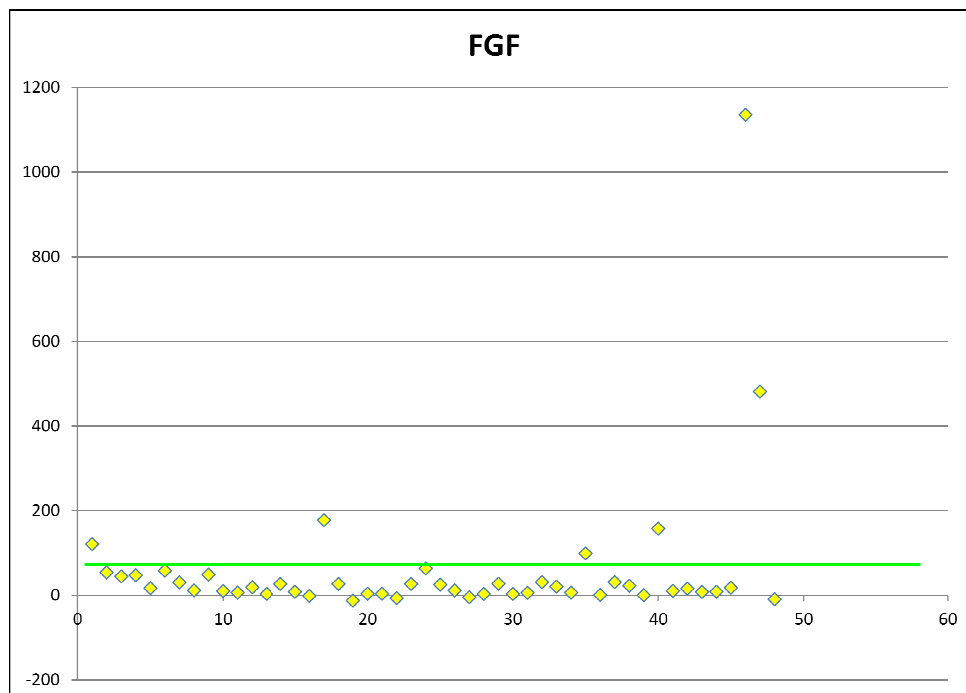


Figura 41 Concentración de FGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 48 pacientes. El valor medio fue de 60,68 pg/ml y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **HGF** fueron determinados en 43 pacientes, 13 hombres y 30 mujeres, con una media de edad de $57,17 \pm 16,41$ años (rango entre 23 y 84 años). El promedio de HGF fue de $266,96 \pm 759,02$ pg/ml (rango entre -19,75 y 2567,67 pg/ml).

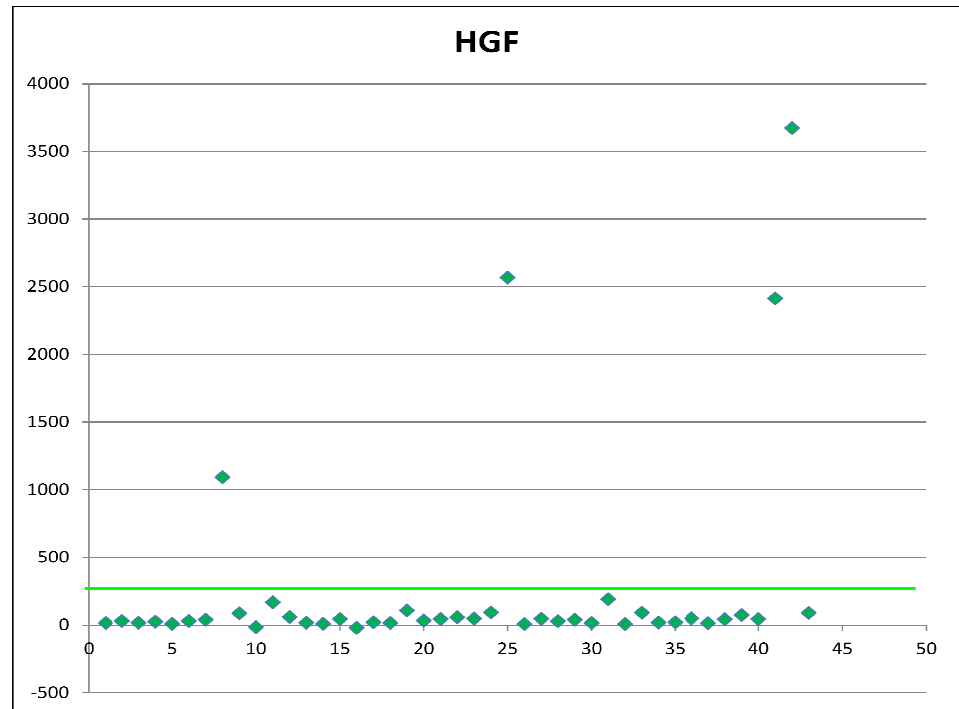


Figura 42 Concentración de HGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 43 pacientes. El valor medio fue de 266,96 y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **NGF** fueron determinados en 33 pacientes, 12 hombres y 19 mujeres, con una media de edad de $47,8 \pm 11,38$ años (rango entre 29 y 87 años). El promedio de NGF fue de $15,31 \pm 78,46$ pg/ml (rango entre -27,42 y 388,21 pg/ml).

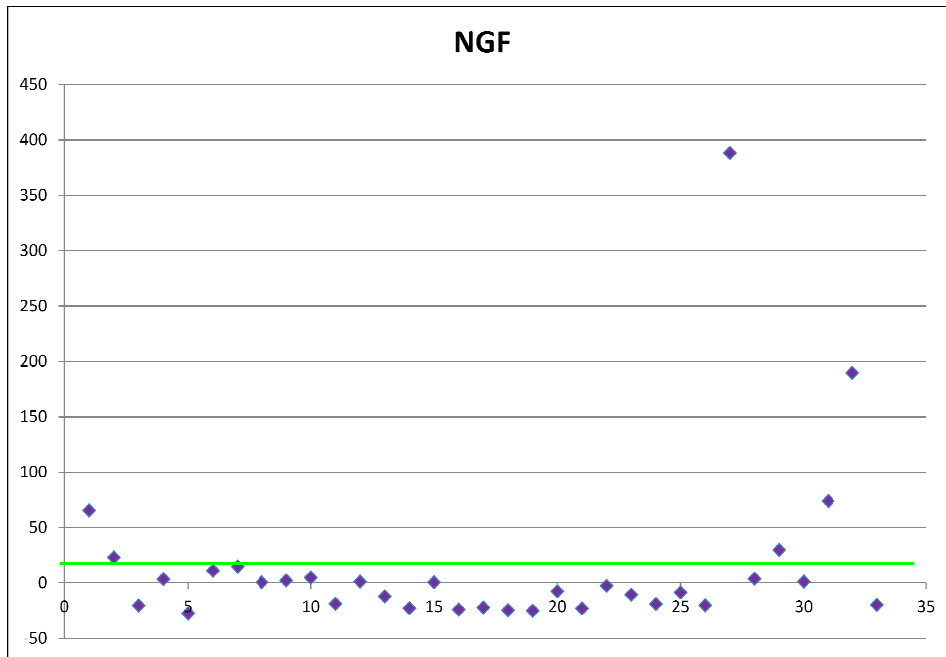


Figura 43 Concentración de NGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 33 pacientes. El valor medio fue de 15,31 pg/ml y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **PDGF** fueron determinados en 42 pacientes, 12 hombres y 30 mujeres, con una media de edad de $57,17 \pm 14,88$ años (rango entre 23 y 84 años). El promedio de PDGF fue de $14331,13 \pm 5028,69$ pg/ml (rango entre 1282,07 y 27350,71 pg/ml).

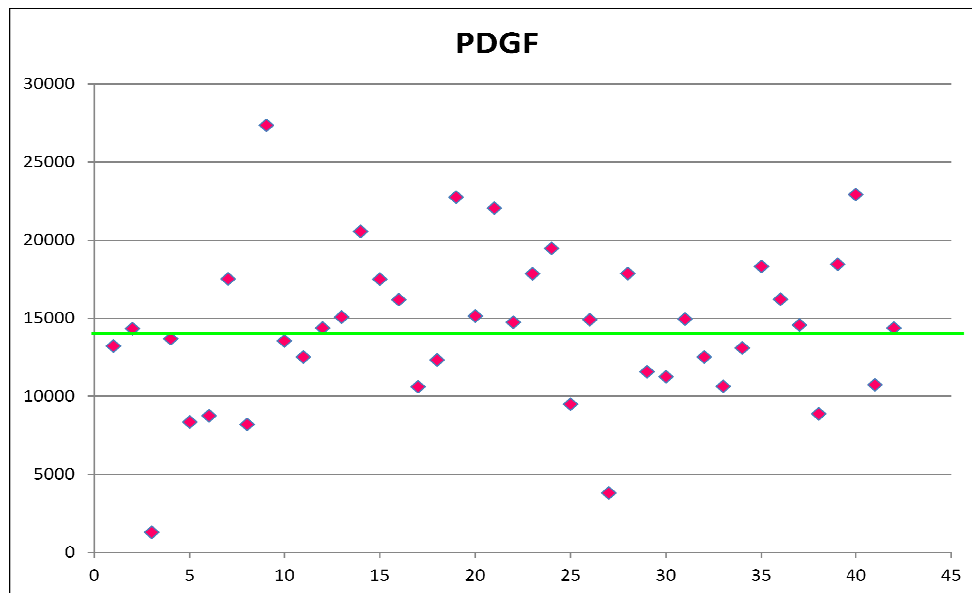


Figura 44 Concentración de PDGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 42 pacientes. El valor medio fue de 14.331,13 pg/ml y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **VEGF** fueron determinados en 43 pacientes, 13 hombres y 30 mujeres, con una media de edad de $57,17 \pm 14,88$ años (rango entre 23 y 84 años). El promedio de VEGF fue de $126,85 \pm 128,35$ pg/ml (rango entre -13,21 y 563,46 pg/ml).

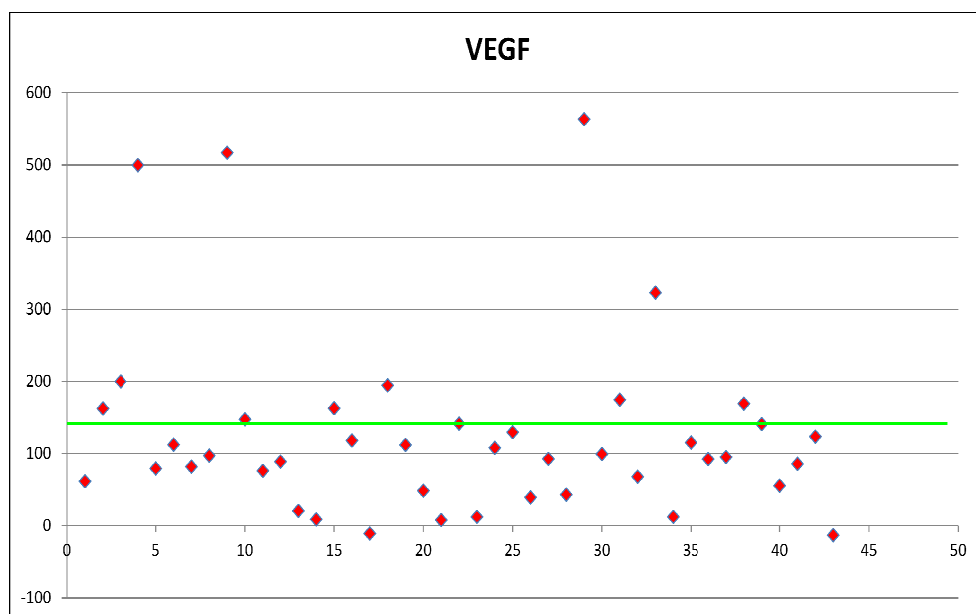


Figura 45 Concentración de VEGF (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 42 pacientes. El valor medio fue de 126,85 pg/ml y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **TGF- β 1** fueron determinados en 14 pacientes, 3 hombres y 11 mujeres, con una media de edad de $65,07 \pm 16,39$ años (rango entre 23 y 84 años). El promedio de EGF fue de $16790,21 \pm 6160,84$ pg/ml (rango entre 3700 y 25820 pg/ml).

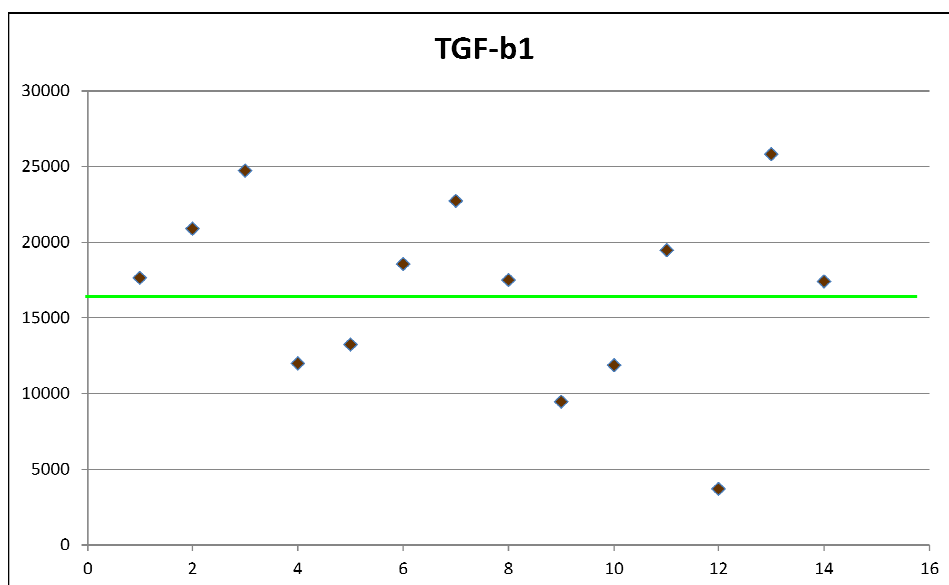


Figura 46 Concentración de TGF- β 1 (pg/ml) en el PRGF sin diluir.

Los datos corresponden a 14 pacientes. El valor medio fue de 16.790,21 pg/ml y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

Los valores de **Albúmina** fueron determinados en 14 pacientes, 3 hombres y 11 mujeres, con una media de edad de $64,66 \pm 15,87$ años (rango entre 40 y 91 años). El promedio de albúmina fue de $3,4 \pm 0,36$ g/dl (rango entre 2,4 y 3,8).

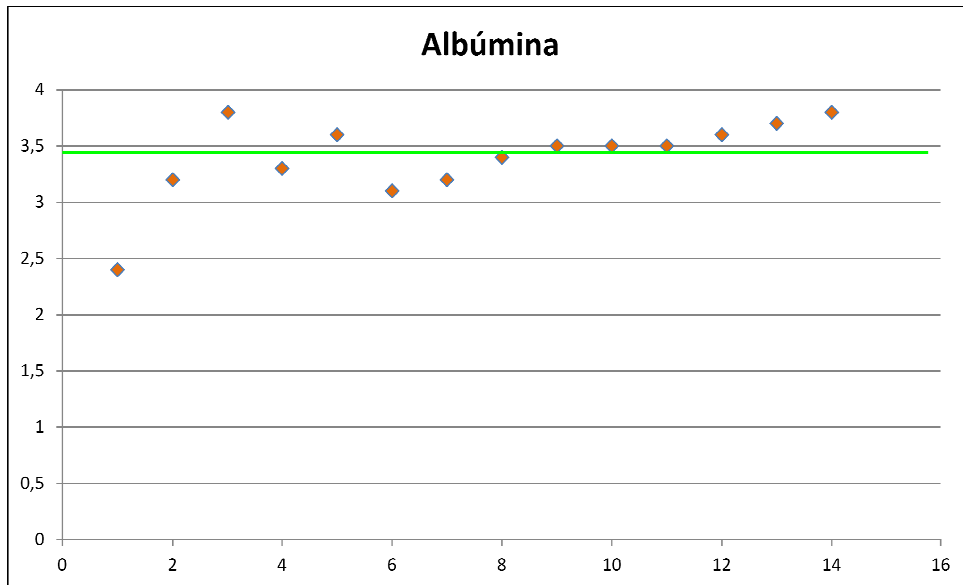


Figura 47 Concentración de albúmina (g/dl) en el PRGF sin diluir.

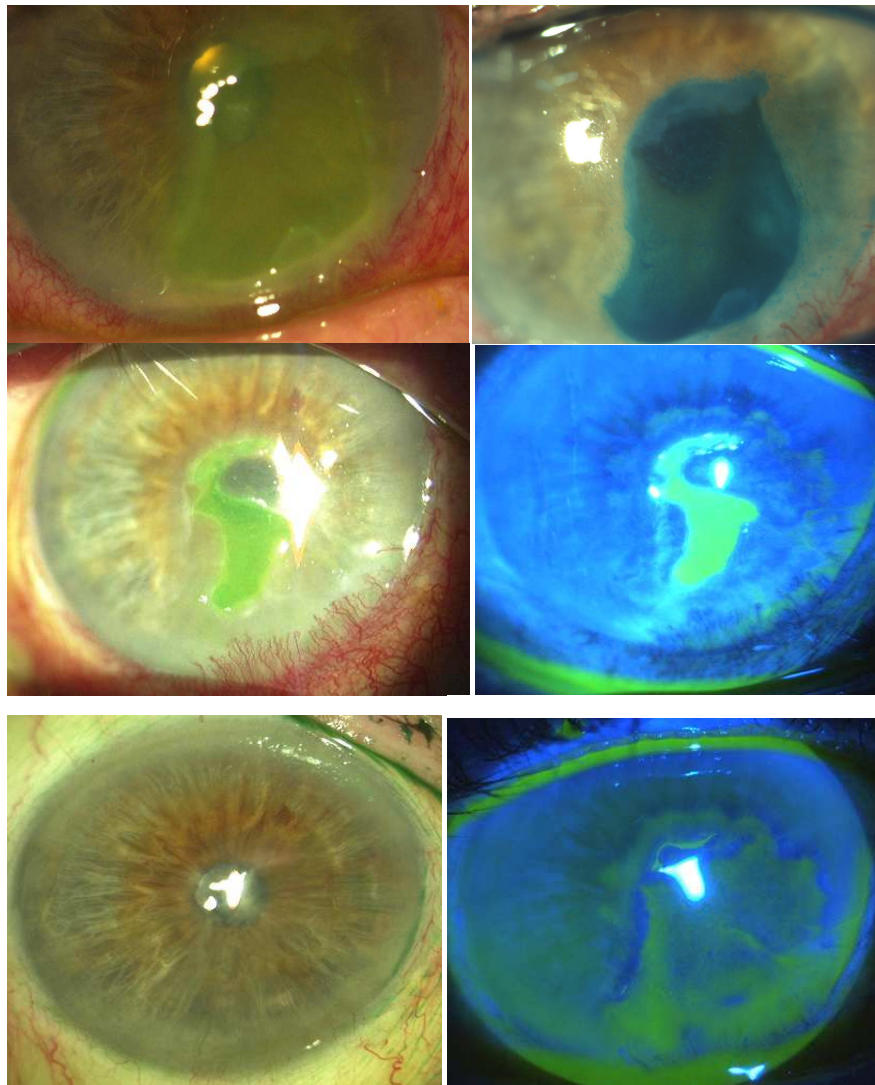
Los datos corresponden a 14 pacientes. El valor medio fue de 3,4 g/dl y aparece representado en el gráfico por la línea de color verde.

4.4 ANEXO: Imágenes

CASO Nº15 DEP

Varón, 83 años, con DEP neurotrófico no herpético OD. Presentaba un ectropión palpebral moderado. Había sido tratado previamente con antiviricos tópicos(aunque carecía de antecedentes herpéticos), lágrimas artificiales y tira tarsal.

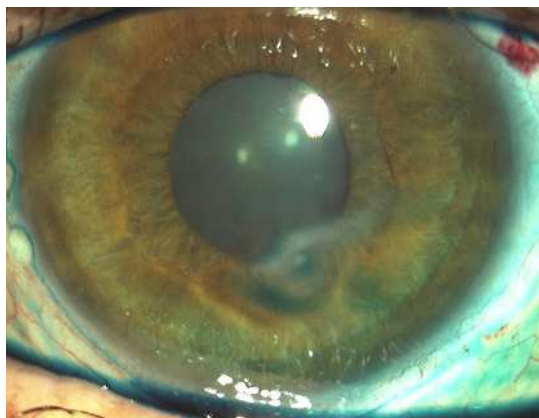
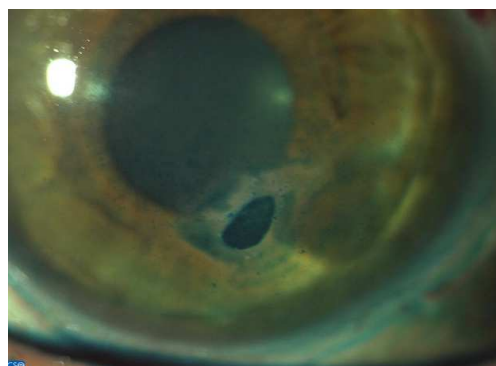
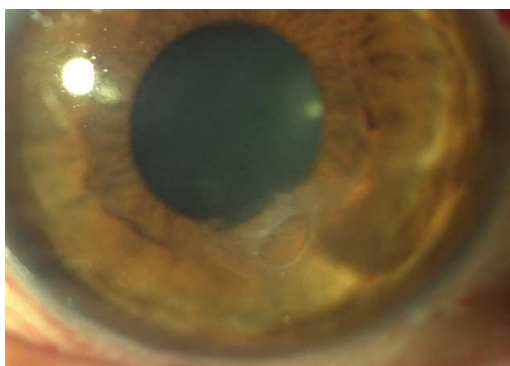
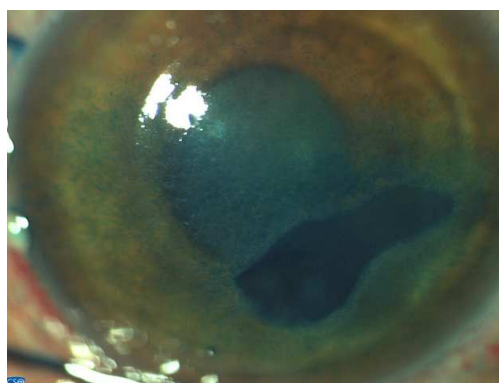
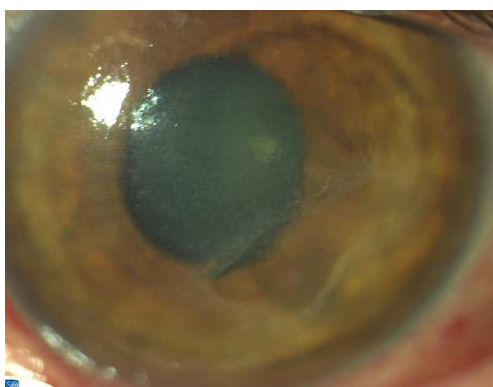
Ante la ausencia de mejoría en 2 semanas, se pautó PRGF 50% como tratamiento único, lográndose la epitelización en 6 semanas.



CASO Nº13 DEP

Varón, 45 años, con DEP iatrogénico OI secundario a vitrectomía por DR. Destacaba además el antecedente de cirugía LASIK miópico con anestesia corneal bilateral y valores de Schirmer I de 0 mm.

El tiempo de evolución previo fue de 3 semanas y una vez instaurado el colirio de PRGF al 50%, se produjo el cierre en 4 semanas. El PRGF fue administrado como tratamiento único.



CASO Nº 5 DEP

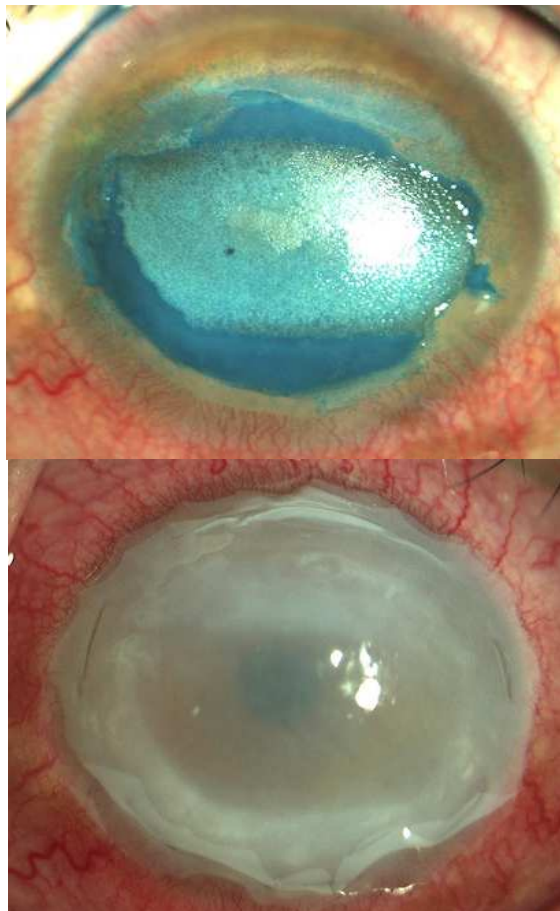
Varón 47 años, con DEP traumático OD postcausticación por álcali, grado III según la clasificación de Hughes.

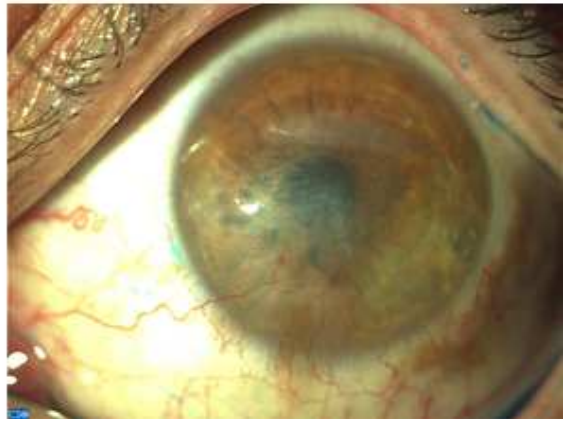
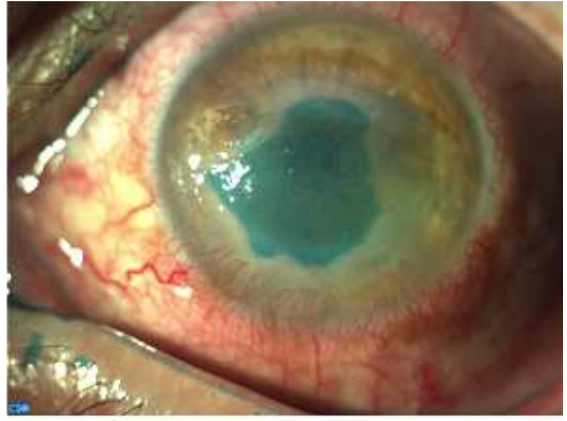
Fue remitido a nuestro centro tras ausencia de resolución tras TMA, suero autólogo, y antibioticoterapia y corticoterapia tópica.

Tras un TMA a modo de lente de contacto, como vemos en las imágenes, iniciamos el tratamiento con PRGF al 50%. El tiempo de evolución hasta entonces era de 10 semanas.

El colirio de PRGF se administró junto con antibiótico tópico. A las 39 semanas se consiguió la epitelización completa.

El leucoma residual requirió la realización de una queratoplastia lamelar anterior.



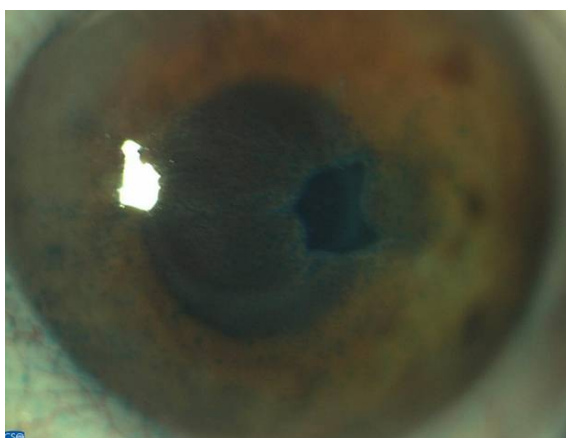
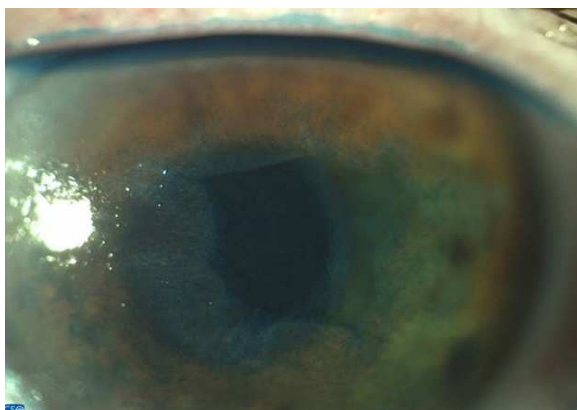


CASO N°19 DEP

Mujer, 64 años, con DEP neurotrófico herpético OI puesto de manifiesto tras la realización de una vitrectomía para pelado de membrana epirretiniana.

No presentaba antecedentes personales oftalmológicos de interés (ausencia de episodios herpéticos previos) ni patología general significativa, por lo que fue diagnosticada inicialmente de DEP iatrogénico. Ante la ausencia de respuesta al tratamiento con lente de contacto terapéutica, lágrimas artificiales, antibiótico y corticoides sin conservantes, se realizó un TMA. Sin embargo, pese a la mejoría inicial de la úlcera tras el TMA, a medida que ésta se fue reabsorbiendo, el DEP volvió a empeorar. Por ello, a las 8 semanas y al objetivar una ausencia de sensibilidad corneal, se sospechó una neurotrofia herpética subyacente.

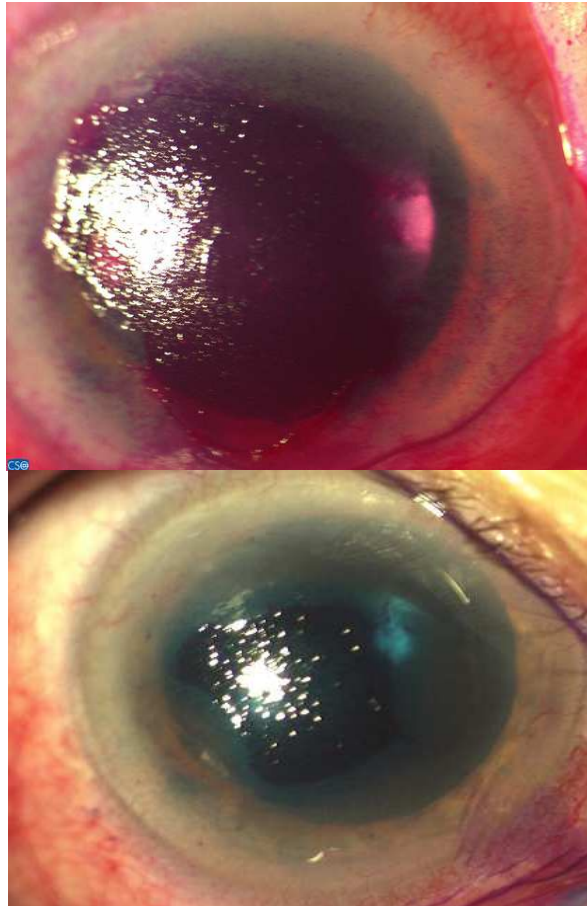
Se instauró tratamiento con aciclovir tópico y PRGF colirio al 50%, lográndose la resolución del DEP en 2 semanas.

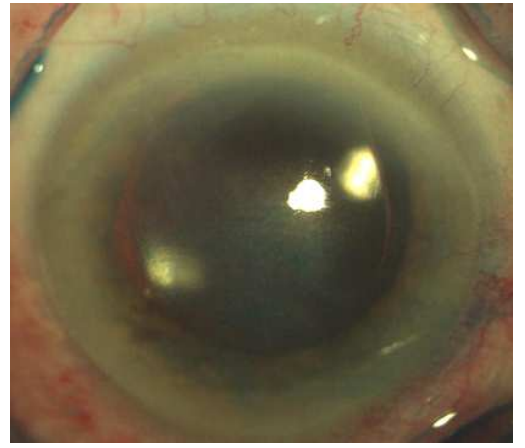
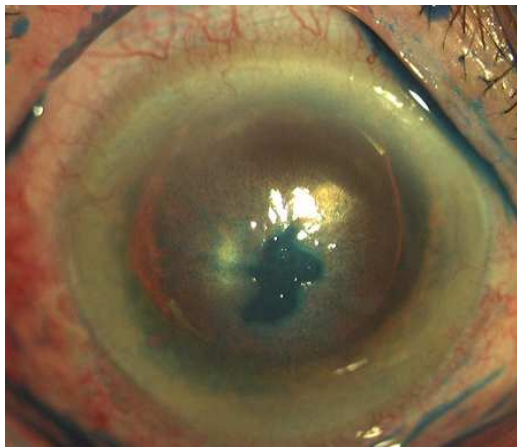
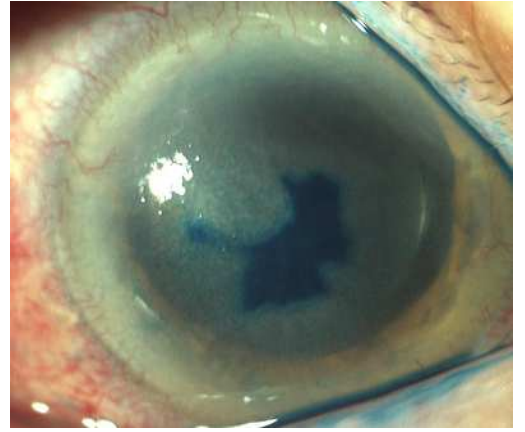
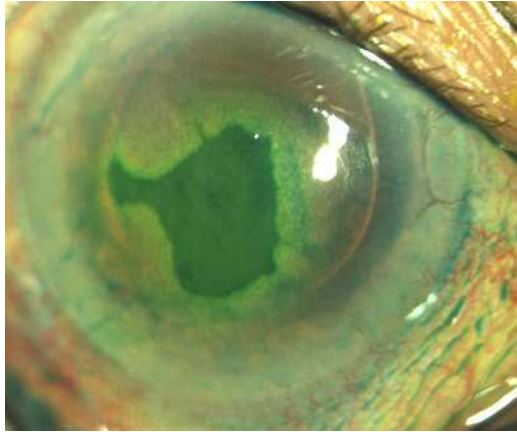


CASO Nº 17 DEP

Mujer, 84 años, con DEP neurotrófico OD secundario a la electrocoagulación del ganglio de Gasser.

Con un tiempo de evolución de 22 semanas y ausencia de respuesta a múltiples tratamientos médicos, incluido el suero autólogo, se instauró el tratamiento de forma exclusiva con PRGF al 50%, lográndose el cierre del DEP a las 7 semanas.



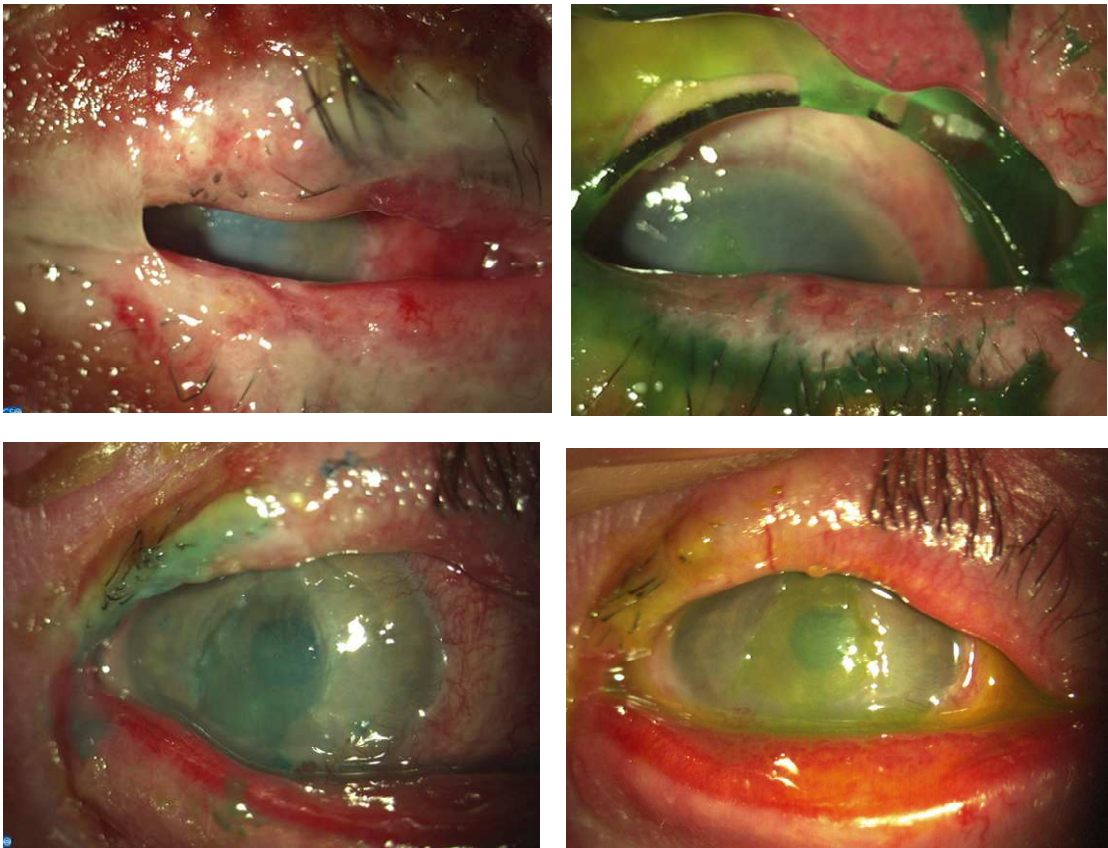


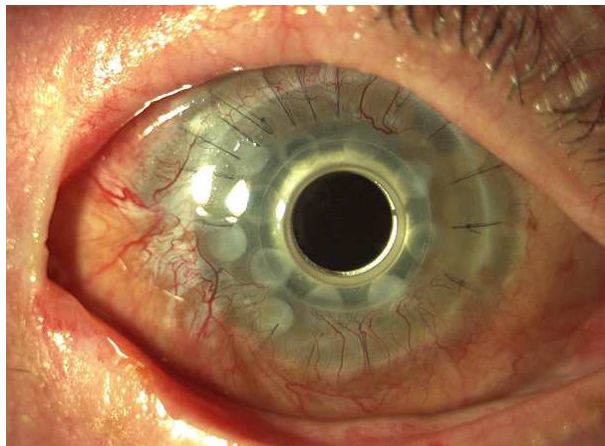
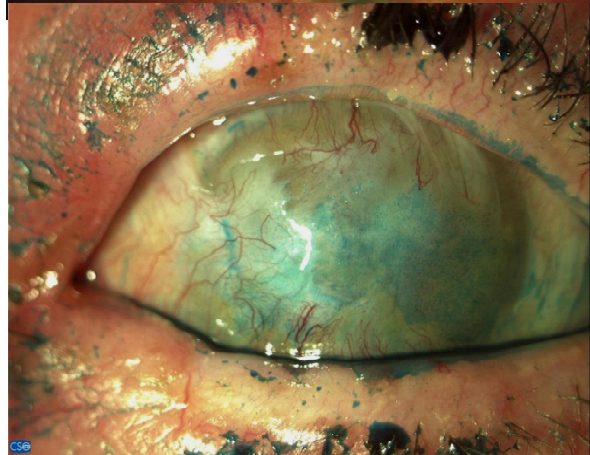
CASO Nº12 DEP

Varón, 55 años, con DEP traumático OD postcausticación con Zinc a 1000°C, grado IV según la clasificación de severidad de Hughes.

Remitido a la semana de su diagnóstico y en tratamiento hasta entonces con corticoides y antibióticos tópicos, lágrimas artificiales y ciclopléjico, se procedió a realizar TMA de urgencia con reconstrucción de fondos de saco y mantenimiento de los mismos con conformador+ tarsorrafia y se comenzó, una vez reabsorbida la MA, con PRGF al 50%+ antibióticos tópicos.

A las 10 semanas se produjo la epitelización completa aunque con una conjuntivalización y opacificación corneal totales secundaria a la insuficiencia límbica 360°, precisando posteriormente una queratoprótesis para la rehabilitación visual.

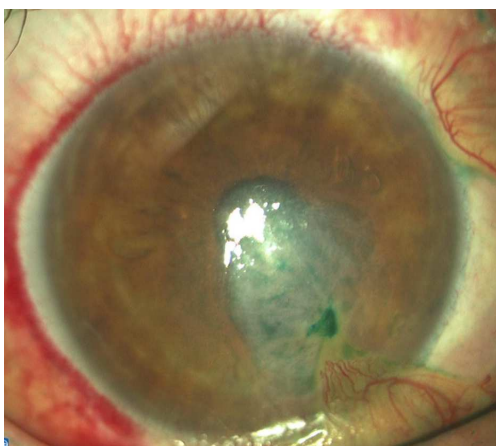
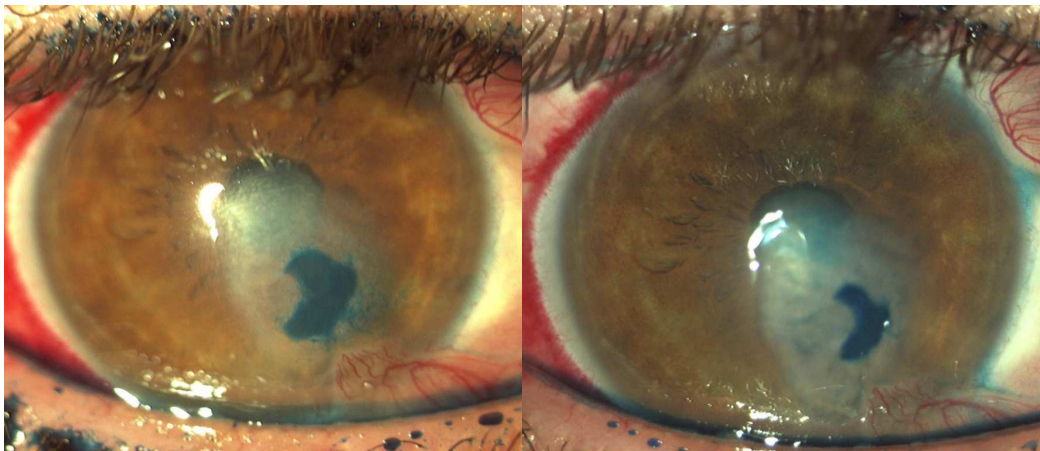
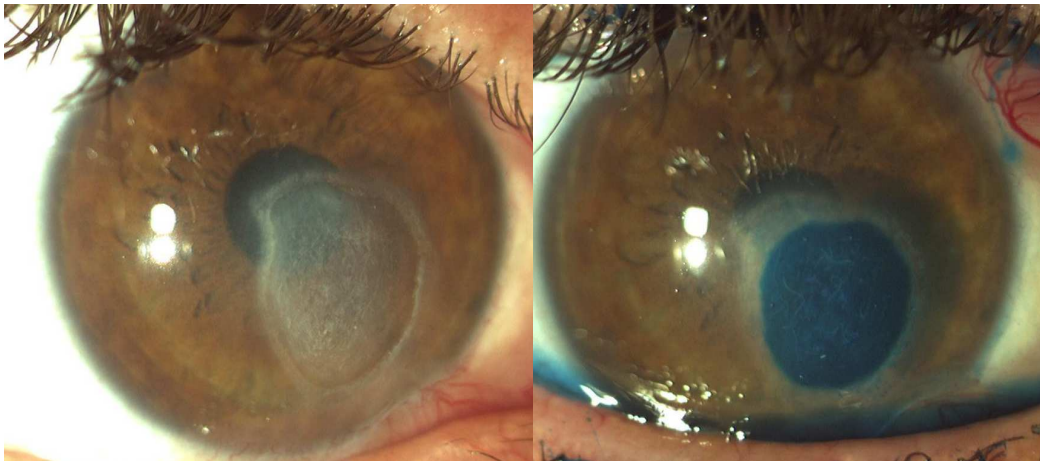




CASO Nº 27 DEP

Varón, 35 años, con DEP traumático OD postcausticación con ácido. Presentaba un DEP de 12 semanas de evolución, con insuficiencia límbica nasal inferior asociada. Los tratamientos previos incluían lágrimas artificiales, antibióticos tópicos y corticoides tópicos.

Se inició el tratamiento con PRGF al 50%, asociando un TMA a las 2 semanas, y consiguiendo una epitelización completa a las 9 semanas.



CASO N°18 DEP

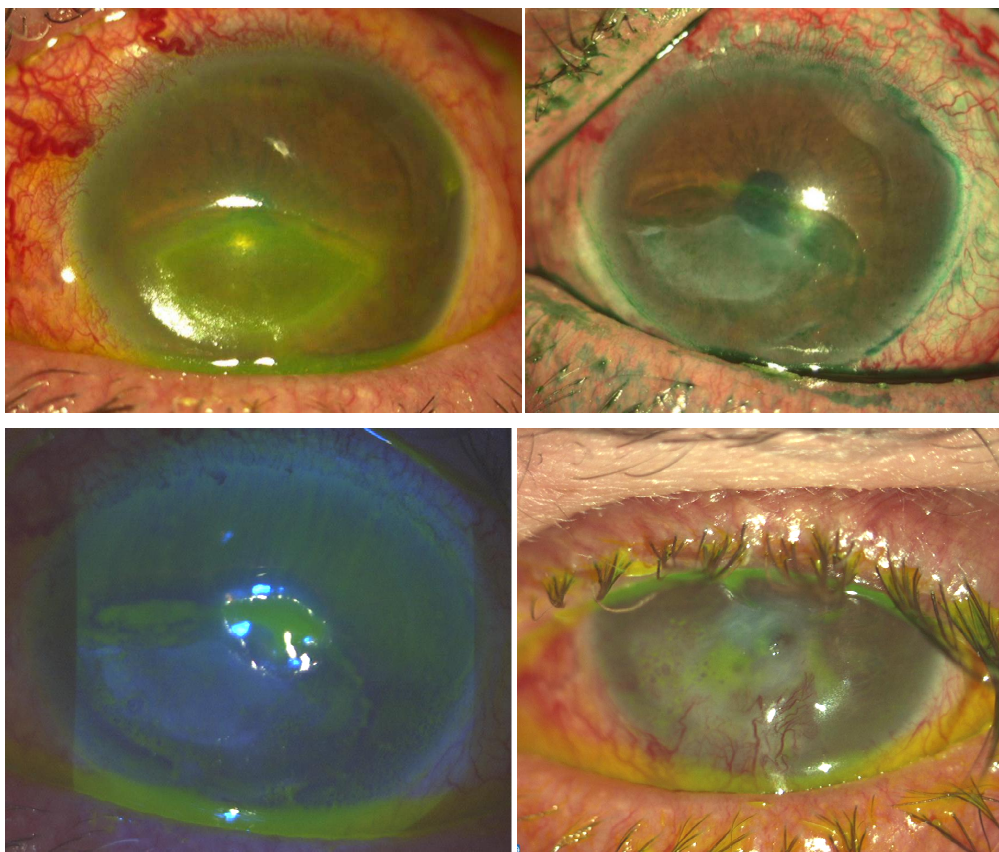
Varón, 61 años, con DEP yatrogénico OI (postfacoemulsificación). A destacar un tratamiento previo con radioterapia por tumoración parotídea izquierda y la anestesia corneal presente.

La exploración del fondo de ojo revelaba una retinopatía postradioterapia sin isquemias presentes angiográficamente.

El tratamiento previo con antibióticos tópicos, lágrimas artificiales y suero autólogo no había tenido éxito y el tiempo de evolución era de 2 semanas.

Tras 2 semanas de tratamiento con PRGF al 50%, el DEP no mejoraba y el paciente refería mala tolerancia al mismo, lo que coincidía con un aumento de la hiperemia y quemosis, por lo que se realizó un TMA y se suspendió el PRFGF.

Una vez reabsorbida la MA el DEP persistía y finalmente, pese a un nuevo TMA sin éxito se produjo una perforación espontánea del mismo y se optó finalmente por el recubrimiento conjuntival.



5. DISCUSIÓN

5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Para la realización de nuestro estudio escogimos un modelo observacional prospectivo no comparativo principalmente por dos razones.

La primera de ellas, es la dificultad de utilizar en el ojo seco y los defectos epiteliales persistentes el diseño de tipo casos y controles, mucho más adecuado para el establecimiento de la eficacia de un tratamiento y la comparación entre ésta y la de otros tratamientos.

Dicha dificultad radica, por un lado, en la complejidad de establecer un grupo de casos homogéneo por la gran diversidad etiopatogénica concurrente en ambas patologías, lo que conlleva en muchas ocasiones la necesidad de un abordaje terapéutico multidisciplinar y no único. A ello se le añaden los problemas éticos que plantea el establecimiento en el caso de los DEP de un grupo control tratado con placebo, a causa de la gravedad del cuadro y potenciales consecuencias sobre la visión e integridad del globo ocular, así como la imposición de un tratamiento cerrado que pudiera impedir o retrasar la adopción de medidas de rescate si éstas fueran necesarias.

La segunda de las razones que nos llevaron a la elección de este diseño de estudio es que los objetivos de nuestro trabajo van encaminados al análisis preliminar de la seguridad y eficacia del PRGF, como posible nuevo tratamiento para estas dos patologías con mala respuesta a los tratamientos convencionales y no al establecimiento de la superioridad de dicho tratamiento respecto a otras terapias alternativas.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, consideramos que las ventajas del diseño escogido superan las limitaciones inherentes al mismo.

POSIBLES SESGOS

El hecho de haber incluido en nuestro trabajo una muestra heterogénea de pacientes inevitablemente trae aparejada una mayor dispersión de datos y por tanto una menor potencia de los resultados obtenidos en cada uno de los grupos. Por el contrario, permite sortear el impacto de los sesgos derivados de una errónea clasificación etiopatogénica de los pacientes y hace que las conclusiones obtenidas representen de forma más fidedigna al perfil de los pacientes que encontramos en nuestra práctica clínica con ojo seco moderado-grave no respondedor al tratamiento y DEP.

La clasificación etiopatogénica del ojo seco es compleja en determinados pacientes, puesto que se trata de una patología cambiante en función de su evolución. A ello se le añade la diversidad de pruebas disponibles para su clasificación y que éstas pueden resultar notablemente influidas por el modo en que se realicen. De modo que, como ejemplo, tendríamos: la obtención del tiempo de rotura lagrimal en condiciones ambientales más o menos adversas, la realización de las tinciones vitales antes o tras el test

de Schirmer o la región de la superficie ocular en la que se registre la osmolaridad.

Lemp ya describe dichas dificultades y cifra la imposibilidad de una correcta clasificación en casi el 30% de los pacientes de ojo seco (65/224)

¹²³

Nosotros seguimos los mismos criterios de clasificación que Lemp, con la única diferencia de considerar como ojo seco acuodeficiente los valores de Schirmer ≤ 10 mm en lugar de ≤ 7 mm y aunque a priori, no nos encontramos con dicha dificultad, aún en caso de que se hubiesen producido errores en la clasificación de algunos pacientes, la presentación conjunta de los datos correspondientes al grupo de ojo seco permitiría superar dicho sesgo.

Como test de medición del componente subjetivo del ojo seco decidimos emplear el cuestionario SiDEQ en lugar del OSDI, ante la experiencia previa de problemas para su compleción en pacientes de avanzada edad, en los que la capacidad de conducción, trabajo con el ordenador, etc. no suelen ser buenos indicadores de calidad visual funcional.

El cuestionario SiDEQ nos ha permitido valorar la evolución de los pacientes tras el tratamiento con PRGF. Sin embargo, presenta la evidente limitación de no incluir ningún parámetro que permita ver el impacto de dicha mejoría en la calidad de vida del paciente. Aun así, consideramos que el hecho de haber registrado la calificación por parte de los pacientes de su mejoría como: importante, moderada o leve, nos permite valorar la trascendencia de la misma en su vida cotidiana.

El estudio no fue planteado a doble ciego debido a que los pacientes tuvieron que firmar un consentimiento específico previo a su inclusión y tratamiento con PRGF. En consecuencia, podría existir cierto efecto placebo derivado del carácter innovador del tratamiento, con el consiguiente sesgo en los resultados subjetivos obtenidos. No obstante, el hecho de haber incluido un número elevado de pacientes minimiza el efecto de tal sesgo.

Como test de medición de signos objetivos, seleccionamos el test de verde lisamina, el test de Schirmer y la citología de impresión, que se encuentran entre los parámetros más repetidamente analizados en los estudios precedentes de ojo seco. Dejamos fuera, sin embargo, el TBUT, considerado una de las mediciones con mejor correlación clínico-patológica ^{109, 124} por la falta de exactitud y variabilidad en su determinación al menos en nuestra experiencia clínica.

Una limitación importante e insorteable al analizar un producto autólogo es que su calidad está intrínsecamente relacionada con factores individuales, entre los que destacan la edad y el estado de inmunocompetencia ^{67 68}. La variabilidad en la calidad del PRGF obtenido obviamente genera una variabilidad en su potencial terapéutico. Nuevamente, la amplitud de la serie de pacientes analizados sería la clave para hacer frente a tal limitación.

Finalmente, la coadministración del PRGF con el resto de tratamientos considerados adecuados en cada caso puede sesgar el beneficio

obtenido en ambos grupos de pacientes. Ambas patologías requieren, sin embargo, un abordaje frecuentemente multidisciplinar y de ello depende una evolución clínica positiva. Además en el caso de los DEP es un sesgo difícilmente sorteable por las cuestiones éticas que mencionábamos con anterioridad.

De todos modos, como ventaja del diseño no cerrado de nuestro estudio, pudimos constatar la necesidad relativamente baja de asociar tratamientos, puesto que 61 de los 106 pacientes del grupo de ojo seco y 15 de los 53 pacientes del grupo de DEP fueron tratados de modo exclusivo con colirio de PRGF.

5.2 CARACTERIZACIÓN DEL PRGF

La finalidad del PRGF, así como del resto de los productos enriquecidos en plaquetas, es lograr una concentración óptima de los factores de crecimiento contenidos en sus gránulos α con fines regenerativos. Para ello, buscan concentrar las plaquetas e inducir su activación de modo que se produzca una liberación máxima de los mismos al plasma.

Por tanto, a priori, ello los debiera hacer superiores al suero autólogo, *gold standard* de los hemoderivados en oftalmología, puesto que en el suero autólogo la serie plaquetaria es desechada una vez coagulada la muestra sanguínea y la liberación de su contenido al plasma es parcial y limitada, al no ser objeto primordial del proceso de elaboración sino efecto colateral del mismo.

En este trabajo hemos analizado la presencia en el PRGF de algunos de los factores más importantes en los procesos de regeneración y remodelación de los epitelios corneo conjuntivales en una muestra de pacientes, concretamente: EGF (53 pacientes), FGF (48 pacientes), HGF (43 pacientes), NGF (33 pacientes), PDGF (42 pacientes), VEGF (43 pacientes), TGF- β 1 (14 pacientes) y albúmina (14 pacientes).

Las cifras obtenidas para cada uno de ellos son altamente concordantes con los resultados que obtuvimos en un estudio preliminar sobre 16 voluntarios sanos⁶¹, con la única salvedad de la obtención en este trabajo de niveles de HGF superiores y niveles de PDGF algo más bajos.

Vemos que, pese a que la edad media de nuestra muestra supera a la edad media del estudio anterior ($57,78 \pm 5,41$ versus $44,25 \pm 9,22$ años) y que, posiblemente, el estado de salud de nuestros pacientes no sea tan bueno como el del grupo de voluntarios sanos, los datos en cuanto a la cuantificación de factores de crecimiento son considerablemente reproducibles.

Así encontramos en nuestro estudio con respecto al realizado con voluntarios sanos de: EGF: $500,45 \pm 147,05$ vs $489,12 \pm 95,48$ pg/ml, FGF: $60,68 \pm 175,89$ vs $58,27 \pm 41,25$ pg/ml, VEGF: $126,68 \pm 128,35$ vs $124,60 \pm 79,64$ pg/ml, HGF: $266 \pm 96 + 759,02$ vs $83,74 \pm 79,42$ pg/ml y PDGF: $14,33 \pm 50,28$ vs $15,58 \pm 4,65$ ng/ml.

En el presente trabajo no hemos realizado un análisis comparativo en la cuantificación de factores entre el PRGF y otros productos

hemoderivados. No obstante, dicha comparación sí fue objeto del estudio de nuestro grupo al que hacíamos referencia. Para ello se elaboraron a partir de cada uno de los 16 voluntarios sanos reclutados tres hemoderivados: SA (1000g x 15min), PRP (protocolo del grupo de Alio) y PRGF. De los tres productos, el PRGF resultó ser el más rico de los tres en EGF y el SA, el más rico en HGF y VEGF ($p < 0,05$). El PRP, por su parte no superaba de forma significativa a los otros dos preparados en la cuantificación de ninguno de los factores analizados; a cambio, era el que obtenía los valores más bajos de VEGF ($p < 0,05$).⁶¹

Por otro lado, la caracterización del PRGF nos permitió conocer que el PRGF es más alcalino que la lágrima natural, con valores de pH mayores o iguales a 8, aunque sin superar el dintel de tolerabilidad del ojo humano. Dichas diferencias se suavizan al diluir el PRGF con solución salina balanceada (BSS).

El PRGF también es hipoosmolar en relación a la lágrima natural, con valores de en torno a 275 mg/dl, lo que se suaviza al diluirlo con BSS a cifras en torno a 285-290 mg/dl, aún hipoosmolares, pero más similares a las de la lágrima natural.

La dilución con BSS del PRGF, por lo tanto, permite obtener un producto más similar a la lágrima natural en cuanto a pH y osmolaridad. Por el contrario, tiene un efecto negativo sobre la concentración de factores de crecimiento aportados con cada aplicación de PRGF.

CONCENTRACIÓN

Si bien los hemoderivados ricos en plaquetas son utilizados sin diluir en otras áreas de la medicina, en el caso de la oftalmología, por las condiciones especiales de avascularidad y transparencia corneales, surge la duda de si la instilación de dichos productos al 100% puede provocar una regeneración epitelial acompañada de un aumento de la neovascularización y fibrosis corneales con la consiguiente pérdida de estas características diferenciales y por ende alteración de la funcionalidad corneal.

Al carecer de antecedentes de la aplicación del PRGF a nivel oftalmológico, decidimos tomar como referencia la experiencia con el hemoderivado de referencia en oftalmología, el suero autólogo, empleándolo así al 20%, en el ojo seco y al 50%, en el caso de los DEP, donde priman los fines regenerativos y existen también algunas publicaciones más recientes del suero autólogo^{118 119 120}.

Dichas recomendaciones están basadas en la observación inicial por parte de Tsubota de valores desproporcionadamente elevados de TGF- β 1 en el suero autólogo obtenido mediante su protocolo de elaboración. Al estar el TGF- β 1 relacionado con propiedades antiproliferativas y promotoras de la diferenciación e incluso estimulación de la fibrosis, recomendó diluir el suero al 20% con solución salina balanceada.

No obstante este hallazgo, no se mantiene en estudios posteriores de otros grupos, como el de Geerling, que encuentra valores similares de

TGF- β 1 para distintas velocidades de centrifugación^{68 69}, y siempre notablemente inferiores a los de Tsubota.⁶⁴

La medición de la concentración de TGF- β 1 realizada en 14 pacientes de nuestro trabajo, determinó cifras de $16,79 \pm 6,16$ ng/ml, que son cifras similares a las obtenidas por Geerling en un grupo de edad media similar (media de edad 59 años) para preparaciones del suero autólogo de 10 pacientes a dos velocidades diferentes ($21,08 \pm 6,1$ ng/ml para velocidad de 500 g y $13,31 \pm 4,85$ ng/ml para velocidad de 3000g).

Por su parte, el grupo de Anitua sí obtiene cifras de TGF- β 1 muy elevadas en el PRGF de un único donante (edad media desconocida, sólo lo describe como “un donante sano joven”), incluso superiores a las de Tsubota (63 ng/ml versus 33 ng/ml). Sin embargo, muestran en estudios in vitro, que pese a ello, el PRGF inhibe e incluso revierte la diferenciación de los queratocitos corneales a miofibroblastos¹¹⁷. No obstante, la extrapolación de los resultados obtenidos in vitro al comportamiento in vivo ha de ser efectuado con precaución.

Hasta la fecha, carecemos de estudios al respecto en ojos humanos, si bien existe un trabajo en ratones del grupo de Anitua en los que se observa una cicatrización con menor *haze* en el grupo de ratones tratado con PRGF tras una queratectomía con respecto al grupo placebo¹²⁵.

La ausencia de efectos promotores de fibrosis y neovascularización en nuestros pacientes con dichas concentraciones de PRGF nos llevó a la aplicación del PRGF al 100% en los últimos pacientes reclutados (12/106 de ojo seco y 14/53 de DEP), eso sí, con una frecuencia de administración reducida, de 1/12h, sin que igualmente se observaran dichos efectos adversos.

Por otro lado, la concentración empleada para los distintos hemoderivados en oftalmología, también debiera basarse en los hallazgos derivados de estudios in vitro sobre la capacidad de estimular la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales.

Los primeros estudios comparativos entre el SA y los preparados ricos en plaquetas orientan a que estos últimos tienen una mayor eficacia in vitro sobre la capacidad de proliferación y migración de las células epiteliales corneales y menor en cuanto a su diferenciación^{117 140}.

Liu y cols¹²⁶ comparan la capacidad epiteliotrópica del suero autólogo, el plasma fresco congelado (PFC) y un concentrado rico en plaquetas sobre cultivos de células humanas corneales inmortalizadas (SV-40), con los siguientes resultados: el concentrado plaquetario (CP) es el que produce una mayor proliferación celular, que se acentúa al aumentar las concentraciones de los tres hemoderivados. Por el contrario, la migración y diferenciación celular son menores para el CP, siendo esta diferencia también mayor al no diluir los preparados.

Los autores del trabajo explican dichos resultados por un lado por los efectos inhibitorios sobre la proliferación celular de sustancias desconocidas con efecto antiproliferativo tanto en el SA como en el PFC y la presencia en mayor o menor proporción en cada uno de los preparados de determinados factores de crecimiento. Así, la proliferación sería mayor

en el CP debido a que en éste encuentran concentraciones mayores de EGF, PDGF y FGF. Al contrario, la mayor cantidad de fibronectina presente en el SA con respecto a los CP, sería vital en la mayor estimulación de la migración celular para el SA. La diferenciación celular sería inversamente proporcional al grado de proliferación y apoyada por una mayor presencia de calcio y vitaminas A y E en el SA.

Hartwig y cols⁷⁰ encuentran resultados similares en su estudio, estableciendo que con el suero autólogo al 12'5% se obtiene la mayor capacidad de proliferación del SA, aunque esta es menor que la de CP al 100%. Observan a su vez que con el SA al 25% y CP al 65-100%, se obtienen resultados similares en cuanto a migración y diferenciación celular y solamente ligeramente inferiores en cuanto a proliferación celular.

Sin embargo, en estudios que comparan el PRGF y el SA, se ha observado una capacidad similar entre ambos¹⁷ o superior para el PRGF¹¹⁷ en cuanto a capacidad proliferativa y migracional, con una mayor estimulación de la diferenciación celular corneal por parte del PRGF. El PRP obtiene peores resultados que el SA y el PRGF en cuanto a potencial epiteliotrópico.

La principal diferencia entre el PRGF y PRP del grupo de Alió reside en el modo en que se activan las plaquetas. De este modo, en los tratamientos con PRGF, se consigue una estimulación fisiológica y controlada de las plaquetas mediante la adición de cloruro cálcico, mientras que en el caso del PRP se procede a una activación plaquetaria por lisis tras congelación- descongelación de las mismas. Este proceso hace que en el PRP resultante permanezcan libres tanto los restos de las membranas plaquetarias lisadas (conocidas por sus efectos proinflamatorios) así como de enzimas lisosómicos responsables de su degradación. Ello pudiera ser responsable de unas peores eficacia y tolerancia del PRP con respecto al PRGF, aunque debe ser confirmado por investigaciones no disponibles hasta la fecha.

Por último, resaltar que en este estudio no hemos encontrado diferencias clínicas significativas entre las distintas concentraciones de PRGF analizadas (20%, 50% y 100%) con respecto a sus efectos terapéuticos ni efectos adversos. Ello nos impide, por el momento, estandarizar de un modo no arbitrario la concentración idónea en el ojo seco y los DEP.

Podríamos, mientras tanto, basarnos en cuestiones de orden práctico para poder recomendar el uso de una u otra concentración dependiendo del caso a tratar.

En este sentido, consideramos que la administración del colirio de PRGF sin diluir ofrece la posibilidad de poder aplicarlo con menos frecuencia, con una pauta estándar (modificable en función de la necesidad) de 1/12h. Ello se traduce en una mayor comodidad para el paciente, que ya no sería tan dependiente de un sistema de refrigeración para su conservación.

Sin embargo, como desventaja fundamental de no diluir el PRGF estaría el hecho de que en el caso de tratamientos largos o incluso crónicos,

especialmente en el caso del ojo seco, se requerirían extracciones más frecuentes que en el caso de emplear concentraciones menores del mismo producto.

Si atendemos a la finalidad del tratamiento con PRGF, podríamos recomendar concentraciones más altas en el caso de los DEP, donde prima la regeneración celular y concentraciones más bajas en el ojo seco, donde el objetivo del PRGF es actuar como sustituto biológico de la lágrima deficitaria. Todo ello, teniendo presente la variabilidad interindividual en la concentración de GF del PRGF obtenido.

La pauta de administración más frecuente, esto es, de 1 gota cada 6h, asociada a las concentraciones inferiores de PRGF lograría una mejor lubricación de la superficie ocular e incluso podría hacer innecesario el uso de lágrimas artificiales de forma concomitante.

En resumen, y sin que exista evidencia en cuanto a los beneficios terapéuticos finales de una u otra concentración, podríamos proponer concentraciones altas (50-100%) para los DEP y más bajas, o adaptables en función de la comodidad del paciente, en el caso del síndrome de ojo seco.

5.3 EFICACIA DEL PRGF EN EL OJO SECO

El ojo seco es una condición en la que existe una alteración multifactorial de la película lagrimal, lo que conlleva una alteración de la superficie ocular y la presencia de síntomas que pueden afectar a la función visual y a la calidad de vida del paciente.

Los tests objetivos de los que disponemos en la práctica clínica con frecuencia no permiten correlacionar adecuadamente los síntomas y el grado de afectación de la superficie ocular. Por ello, ambos parámetros deben ser tenidos en cuenta tanto durante el diagnóstico como durante la selección del tratamiento óptimo.

Puesto que distintos tipos de ojo seco pueden estar asociados con los mismos síntomas, es necesario identificar correctamente los principales factores etiopatogénicos involucrados, para así poder administrar los tratamientos más apropiados.

De este modo, el uso de tapones lagrimales, esteroides tópicos, inmunosupresores, mucolíticos, secretagogos, etc. serán más o menos apropiados dependiendo de la naturaleza de cada caso. No obstante, la base y esencia del tratamiento, común a todos los casos, será siempre la sustitución de la lágrima deficitaria por un producto lo más similar posible a la lágrima natural. Y es aquí precisamente donde reside la principal limitación terapéutica del ojo seco puesto que actualmente no existe un sustituto ideal de la misma.

Disponemos de una notable variedad de lágrimas artificiales: sueros fisiológicos, productos sintéticos (vinilos y carbómeros), mucílagos (carmelosa, hipromelosa, HPGuar), mucopolisacáridos(ácido hialurónico), con base lipídica (vaselinas, carbómeros de alto peso molecular) y más recientemente, combinaciones de mucopolisacárido con sustancias

osmoprotectoras como el eritritol, glicerina, trehalosa, etc Existe abundante bibliografía que apoya su empleo, siendo su comportamiento biofísico lo que determinará su utilización en cada tipo y nivel de gravedad del ojo seco^{127 128 129 130} .

Sin embargo, y según concluye el DEWS en 2007, el conjunto de las lágrimas artificiales no debiera recibir dicha denominación puesto que distan mucho de ser sustitutos de la lágrima natural. De hecho, el DEWS establece que la revolución del tratamiento del ojo seco con las lágrimas artificiales no radica en sus principios activos sino en la retirada de los conservantes de su composición. Así, hoy en día la mayoría de las lágrimas artificiales se presentan como formulaciones monodosis o bien como formulaciones multidosis con filtros aislantes como el ABAK o COMOD o sustancias estabilizadoras como el purite o el polyquad. Pese a que dichos estabilizadores teóricamente se volatilizan al contactar con la superficie ocular debieran ser manejados como sustancias potencialmente tóxicas y más ante la necesidad de instilaciones frecuentes, debido a que en el ojo seco coexisten: una menor dilución, un aclaramiento lagrimal reducido y una predisposición a la epitelopatía.

En el ojo seco leve, la función lubricante de las lágrimas artificiales puede ser suficiente para recuperar la homeostasis de la superficie ocular, no así en el ojo seco moderado-severo, donde se va a producir un incremento de la osmolaridad celular con la consiguiente inflamación y lesión de las células corneocconjuntivales.

Por ello, el DEWS recomienda a partir de grado 2 de gravedad de ojo seco el empleo de antiinflamatorios, ya sean tópicos como los corticoides administrados en pulsos cortos¹³¹ o la ciclosporina al 0'05%¹³² u orales, como la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados¹³³ o las tetraciclina¹³⁴.

También para este mismo nivel de afectación recomienda medidas que aumenten la permanencia lagrimal, como la oclusión puntal¹³⁵ y los fármacos secretagogos¹³⁶.

Para niveles de gravedad grado 3 y/o cuando no han tenido éxito los tratamientos anteriores, el DEWS recomienda el tratamiento con suero autólogo. Se basa para ello en que el suero autólogo, en base a sus similitudes de composición con la lágrima natural, actúa como fuente de gran parte de los componentes esenciales presentes en la misma y que en estos casos se encuentran deplecionados. Estos componentes son vitales en el mantenimiento de la nutrición y metabolismo de los epitelios corneo-conjuntivales y por tanto, en su conservación y regeneración así como en el desempeño de las funciones defensivas de la superficie corneal frente a agresiones externas.

Así, en el suero, al igual que en la lágrima, están presentes diversos factores de crecimiento críticos para la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales corneales y conjuntivales como el EGF, FGF α y β , PDGF, HGF, TGF- β , sustancia P, IGF-1, NGF; vitaminas, como la vitamina A; proteínas de matriz, como la fibronectina; antiproteasas séricas, como la α -2-macroglobulina; proteínas con acción antibacteriana, como la lisozima, lactoferrina e inmunoglobulina A, etc.

Algunas de estas sustancias son más abundantes en el suero que en la lágrima, como es el caso de la vitamina A, el TGF- β , IGF-1, NGF, fibronectina y lisozima pero otras, por el contrario, presentan concentraciones superiores en la lágrima con respecto al suero, como la IgA, HGF y vitamina C¹³⁷.

Ahora bien, hoy en día no sólo conocemos que la calidad del suero autólogo obtenido es dependiente de factores individuales como la edad o el estado de inmunocompetencia del paciente, sino también y de forma no menos importante de los procesos de elaboración seguidos para su obtención. Dichos conocimientos hacen obligada nuestra actualización permanente en el tema, siguiendo la estela de grupos, como el de Geerling, que desde el 2005 están trabajando en el desarrollo y estandarización de un protocolo optimizado para poder lograr un suero autólogo de la máxima calidad posible^{68 69 137}.

De forma paralela, estamos asistiendo a una corriente en auge del empleo de hemoderivados autólogos enriquecidos en plaquetas con fines regenerativos en otras campos de la medicina.

En el caso concreto de la oftalmología esta corriente se ha visto un tanto frenada precisamente por la gran aceptación y generalización desde hace casi dos décadas del empleo del colirio de suero autólogo en diversas alteraciones de la superficie ocular. No obstante, ello no debiera ser un obstáculo a la valoración de los hemoderivados enriquecidos como potencial sustituto biológico alternativo y tal vez superior al SA de la lágrima deficitaria.

En el presente estudio, hemos obtenido resultados preliminares acerca de la eficacia de uno de los hemoderivados ricos en factores de crecimiento derivados de las plaquetas, el PRGF, para el tratamiento del ojo seco no respondedor a los tratamientos convencionales.

Nuestra serie de 106 pacientes es una de las más amplias analizadas, o al menos publicadas, al respecto. Este grupo de pacientes, que incluyen los distintos tipos etiopatológicos de ojo seco, son una buena representación de la población general, con la salvedad de una mayor prevalencia del subtipo de ojo seco acuodeficiente en nuestra muestra.

Así, mientras que estudios clínicos en poblaciones de EEUU y Europa, como el de Lemp¹³⁸, encuentran como subtipo predominante el ojo seco evaporativo con un porcentaje que asciende prácticamente al 50%, seguido del mixto (35'84%) y finalmente el acuodeficiente puro, nosotros nos encontramos con una predominancia del ojo seco acuodeficiente (55'66%), seguido del mixto (29'25%) y finalmente del evaporativo puro (15'09%).

Consideramos que la mayor presencia del ojo seco acuodeficiente en nuestra población a estudio, en el que se encuentra representado el síndrome de Sjögren, está motivada por una mayor gravedad de síntomas y ausencia de respuesta de este subgrupo de pacientes de ojo seco a los tratamientos convencionales.

Teniendo en cuenta que la aplicación del PRGF fue realizada en la mayoría de los pacientes a la concentración del 20% y que no obtuvimos

diferencias al comparar la aplicación del PRGF al 20% y al 100%, discutiremos los datos resultantes en conjunto.

Nuestros resultados indican que el PRGF es un tratamiento eficaz en el tratamiento sintomático de los pacientes con ojo seco no repondedor a las terapias tradicionales, al producirse una mejora subjetiva en el 75% de los pacientes, considerada por la mayoría de ellos (61/106) como importante o al menos moderada. Además, en los 42/106 pacientes en los que se realizó el cuestionario mSiDEQ pre y post tratamiento se obtuvo una reducción media de la puntuación del 36,24%, siendo la diferencia entre los valores medios pre y post tratamiento estadísticamente significativa ($19,73 \pm 6,52$ vs $12,60 \pm 7,84$, $p < 0,01$).

En general, existe una gran concordancia entre los resultados que hemos obtenido en nuestra serie y la bibliografía correspondiente para el suero autólogo.

Así, Tsubota publicaba en 1999 una serie de 12 pacientes con ojo seco tipo Sjögren tratados con SA al 20%, encontrando tras 4 semanas una mejora sintomática estadísticamente significativa, con una reducción de los valores medios del 34,17% ($7,9$ vs $5,2$, $p < 0,05$), medidos mediante test subjetivos basados en escala de caras.⁶⁴

Otros grupos, como es el caso de Tananuvat y cols⁶⁵ sin embargo, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el suero autólogo y lágrimas artificiales (solución salina) en un grupo de 12 pacientes con ojo seco severo tratando con suero autólogo un ojo y con lágrima artificial el otro durante 2 meses.

Noble y cols¹³⁹ observan una mejoría sintomática tras 3 meses de tratamiento con suero autólogo al 50% en 10 de sus 16 pacientes (62,5%) de ojo seco (6 del subtipo S.Sjögren). Obtienen valores medios pretratamiento de 1,45 (puntuación subjetiva según una escala facial ponderada mediante análisis de Rasch) versus 0,60 tras suero autólogo ($p < 0,01$).

Kojima y cols¹⁴⁰ realizan un estudio de 37 casos (de los cuales 20 tenían síndrome de Sjögren) y controles comparando suero autólogo y lágrimas artificiales encontrando una reducción media de los síntomas en el grupo de SA del 25,71% (puntuación mediante escala de dolor de 70 ± 20 vs 52 ± 24 , $p < 0,05$).

Urzua y cols en un ensayo clínico cruzado doble ciego con 12 pacientes con ojo seco severo a los que tratan dos semanas con SA al 20% y 2 semanas con lágrimas artificiales encuentran una reducción del 50% en la escala de OSDI vs 22% a favor del SA ($p = 0,002$).¹⁴¹

Celebi y cols¹⁴² realizan un ensayo clínico cruzado doble ciego con 20 pacientes comparando 1 mes de tratamiento con SA al 20% y lágrimas artificiales y encuentran mejoras significativas del 38,65% en el test subjetivo de OSDI ($26,5$ vs $43,2$, $p < 0,01$) a favor del SA.

Hussain¹⁴³ y cols encuentran una mejoría sintomática media del 19,59% con el empleo del SA al 50% en un grupo de 63 pacientes con ojo seco de diversa etiopatogenia (OSDI: $54,1$ vs $43,5$, $p < 0,03$) y hacen referencia a

que emplean la concentración del 50% porque concentraciones inferiores no les reportaban buenos resultados.

La comparación de nuestros resultados con los de los trabajos anteriormente mencionados presenta obvias limitaciones: son poblaciones etiopatogénicamente muy variadas (en algunos casos exclusivamente del subtipo síndrome de Sjögren), de tamaños muy diferentes, en los que el SA se obtuvo mediante distintos protocolos de centrifugación (1500 rpm durante 5 minutos en las series de Tsubota y Kojima, 4200 rpm durante 15 minutos en la de Tananuvat, desconocido en el estudio de Noble, 4000 rpm (2600 g) durante 10 minutos en la de Celebi, 1400 rpm durante 15 minutos en la de Hussain) y se aplicó a diferentes concentraciones y durante tiempos variables (entre las 2 semanas y los 3 meses).

A pesar de ello, vemos que la mejoría subjetiva secundaria a la aplicación del PRGF durante 3 meses se aproxima al rango más alto de la mejoría descrita para el suero autólogo.

Asimismo, consideramos un hecho a destacar la respuesta positiva al tratamiento con PRGF de 9 pacientes, que previamente habían sido tratados con suero autólogo sin éxito.

En cuanto a los signos objetivos, en nuestro trabajo se obtuvieron mejoras en todos los parámetros analizados, esto es: tinción verde lisamina, grado de metaplasia escamosa y test de Schimer, si bien sólo los dos primeros alcanzaron significación estadística.

Con respecto a la mejoría en la tinción con verde lisamina, encontramos una reducción media de un 38'40% ($p < 0'01$) tras tres meses de tratamiento con PRGF, valor similar al obtenido en la serie de Kojima (reducción del 40,47%; valores medios pre y posttratamiento de: $2'5 \pm 2'0$ vs $4,2 \pm 2,5$, $p < 0,05$) y algo inferior al de Tsubota (reducción del 55,35%; valores medios pre y posttratamiento de: 5,6 vs 2,5, $p < 0,01$). No obstante, vemos como muchos de los autores o no midieron la evolución de la tinción de la superficie ocular con colorantes vitales o no encontraron reducciones estadísticamente significativas en las mismas, como es el caso de Celebi y cols, Urzua y cols, Tananuvat y cols y Noble y cols.

Nuestros resultados en cuanto a la mejoría del grado de metaplasia escamosa son equivalentes a los obtenidos por la serie de Noble, que al igual que nosotros, observa una mejora del grado de la misma en la mitad de los pacientes. En el caso de la serie de Noble el sistema empleado para la graduación de la metaplasia escamosa es inverso al nuestro y va del 0 a 3, siendo el 0: metaplasia escamosa total y el 3: epitelio conjuntival normal, obteniendo una media del grado de metaplasia escamosa pre tratamiento con SA de 0,56 y post de 1,375 ($p < 0,02$). La reducción que obtienen en los valores medios antes y después del tratamiento con SA es por tanto, superior a la nuestra, con una mejoría del 59,27% ($p < 0,02$), en comparación con la reducción del 43,85% ($p = 0'02$) obtenida en nuestro estudio.

Cabe destacar que en nuestro grupo de pacientes con ojo seco previamente al tratamiento sólo un caso (4,34%) presentaba ausencia de

metaplasia escamosa mientras que posttratamiento dicho porcentaje ascendía al 42%.

Al igual que en la práctica totalidad de estudios de SA, nosotros tampoco encontramos una mejoría significativa en el test de Schirmer pre y posttratamiento. Sólo Hussain y cols encuentran mejoría significativa en el test de Schirmer (6,6 vs 10,7, $p < 0,03$). En nuestra serie los valores medios pre y post tratamiento (datos correspondientes a 96 pacientes) fueron de $4,21 \pm 6,12$ y $4,76 \pm 5,85$ respectivamente ($p = 0,16$).

Las distintas correlaciones analizadas entre mejoría sintomática y etiopatogenia, citología de impresión, sexo y edad no permitieron mostrar resultados concluyentes.

Hasta la fecha, existe muy escasa bibliografía acerca de la aplicación de productos ricos en plaquetas en el ojo seco y ésta se limita a 3 publicaciones: la del grupo de Alió⁵⁹, la de nuestro propio grupo⁷² y la de Pezzotta y cols¹⁴⁴. Las tres emplean diferentes derivados plasmáticos enriquecidos, en concreto: E-PRP en el caso de Alió y cols, PRGF en el nuestro y PRGD (plasma rico en factores derivados de plaquetas) en el grupo de Pezzotta. El PRP y PRGD serían PRPs similares con velocidades de centrifugación imposibles de comparar al conocer sólo el dato en rpm en lugar de g (1400 rpm versus 900 rpm) durante el mismo tiempo y con el mismo sistema de activación plaquetaria. Además Alió emplea el PRP al 100% y Pezzotta al 30%, mientras que nosotros describíamos la aplicación del PRGF al 20%.

Por si ello no limitase suficientemente la confrontación de resultados, nos encontramos con que en la serie de ojo seco del grupo de Pezzotta sólo se incluye el subtipo de ojo seco severo secundario a enfermedad de injerto contra huésped. La muestra analizada en el estudio de Alió y cols sin embargo presenta una gran similitud en cuanto a heterogenicidad nosológica con la nuestra.

Los resultados de nuestro actual trabajo en cuanto a mejoría sintomática son similares a los de estos tres estudios. Alió y cols tras la aplicación del colirio de PRP al 100% durante un mes, obtiene una mejoría sintomática en el 89% de los pacientes, incluyendo mejoría en una línea de agudeza visual en 5 de los 18 pacientes. Pezzotta y cols recogen en su serie una mejoría subjetiva en el 82,6% de los pacientes (19/23) a los 6 meses de tratamiento, mientras que nosotros, tras 3 meses de tratamiento con PRGF observábamos una mejoría sintomática en el 87,5% de los 16 pacientes estudiados.

La tinción con verde lisamina no es analizada por el grupo de Alió y no alcanza significación estadística en el nuestro. Por su lado Pezzotta y cols refieren una mejoría de la misma en el 82,6% de los pacientes ($p < 0,01$).

Lo mismo sucede con el test de Schirmer. Tampoco el grupo de Pezzotta encuentra diferencias significativas, al igual que nosotros primero en la serie de 16 pacientes y posteriormente en los 96 pacientes analizados de esta serie.

Con respecto a la citología de impresión, Alió y cols se centran en la medición de la densidad de células caliciformes en conjuntiva bulbar

superior e inferior para el análisis del impacto del tratamiento con PRP y obtienen diferencias estadísticamente significativas sólo en la conjuntiva bulbar superior (45 células/mm² vs 60 células/mm², p=0,04). No refiere cuantos de los pacientes mejoran, por lo que no podemos compararlo con nuestros resultados.

Como hallazgo interesante debemos mencionar que, si bien la mejoría en el grado de metaplasia escamosa observada en nuestra primera publicación no alcanzaba valores estadísticamente significativos (1,94±0,93 vs 1,19±1,17, p=0,052), el hecho de haber incrementado la muestra de 16 a 22 pacientes ha permitido que se alcanzasen dicha significación.

Nuestra muestra de ojo seco supera ampliamente en número de pacientes a las anteriormente mencionadas. Es probable, en consecuencia, que los resultados que hemos obtenido sean más representativos y extrapolables a la población general de ojo seco no respondedor.

Por último, consideramos un hecho a destacar que en muchos casos el tratamiento con PRGF no sólo llevó a una mejoría sintomática y a una reducción de la tinción con verde lisamina y el grado de metaplasia escamosa sino que se asoció asimismo a una reducción de la necesidad de empleo de tratamientos asociados, como los corticoides y la ciclosporina tópica, permitiendo ser administrado como tratamiento exclusivo en el 57,54% (61/106).

Posiblemente esto se deba no sólo a una reducción indirecta de la inflamación mediante la disminución de la osmolaridad de la lágrima deficitaria y la dilución de factores proinflamatorios presentes en la misma, sino también debido a la presencia en el PRGF, como sucede con el suero autólogo, de inhibidores potenciales de la inflamación y apoptosis y otros importantes factores de crecimiento, conocidos a su vez por su implicación en la reepitelización corneal, como el EGF^{145 146 147}.

Asimismo, el hecho de que muchos pacientes continuasen con el tratamiento, tras un primer ciclo de tres meses, y que a fecha de conclusión de este estudio casi una quinta parte de los pacientes siguieran indefinidamente con el mismo, es altamente sugestivo del papel terapéutico del PRGF en el ojo seco moderado-severo.

5.4 EFICACIA DEL PRGF EN LOS DEP

Los defectos epiteliales persistentes constituyen una de las patologías más severas de la superficie ocular puesto que su evolución natural es la progresión hacia la perforación y pérdida de visión. A pesar de tener distintos mecanismos etiopatogénicos, los DEPS tienen en común la incapacidad de la córnea para cicatrizar su epitelio lesionado y su tratamiento se convierte en un reto en la práctica clínica diaria^{80 82 81 85 88}.

Se ha descrito que las formas de DEP con peor pronóstico son las asociadas a ojo seco severo y a las úlceras neurotróficas⁸⁰. En el caso de ojo seco, el déficit de lágrima resulta en una privación de factores de

crecimiento, mientras que en el caso de las úlceras neurotróficas, están ausentes ciertos factores necesarios para el metabolismo nervioso, como la sustancia P y el NGF.

La ineficacia de los distintos tratamientos disponibles, como las lágrimas artificiales, los antiinflamatorios tópicos, las tetraciclinas orales, las lentes de contacto terapéuticas o la tarsorrafia, para la resolución de los DEPS ha llevado en las últimas décadas a la búsqueda de nuevas alternativas.

De este modo, han sido estudiados los efectos de la aplicación individual de distintos factores de crecimiento sintéticos, factores neurogénicos y extractos naturales ricos tanto en factores de crecimiento como factores neurogénicos¹⁴⁸. Entre los factores de crecimiento empleados para estimular la epitelización se encuentran el EGF¹⁴⁹, el FGF¹⁴⁸, PDGF⁹¹, NGF⁹⁴ y la fibronectina^{88 89}, una proteína relacionada con la matriz extracelular.

Sin embargo, pese a haberse obtenido buenos resultados preliminares en animales, a día de hoy los resultados en humanos siguen siendo contradictorios.

Entre los factores neurogénicos analizados para el tratamiento de los DEP se encuentra la sustancia P. Se trata de un neurotransmisor liberado por el sistema nervioso autónomo periférico y presente a altas concentraciones en las terminaciones nerviosas de la córnea. Actúa de forma sinérgica con el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y el NGF^{92 93 94}. Existe aún una escasa experiencia con su aplicación en humanos. Recientemente, se ha publicado un trabajo con resultados prometedores sobre el uso de tetrapéptidos derivados de la sustancia P y el IGF-1¹⁵⁰.

El NGF, por su parte, ha sido empleado en las úlceras neurotróficas desde 1998, con resultados prometedores; sin embargo, el NGF aún no ha sido aprobado para su uso en humanos. Aun así, la limitación principal de estos tratamientos radica en el hecho de que, por su mecanismo de acción, son sólo aplicables a los DEPs de origen neurogénico.

Como resultado del amplio espectro de etiologías de los DEPs, el tratamiento ideal debiera ser aquel que aporte la mayor cantidad y variedad de factores de crecimiento.

La búsqueda de extractos naturales ricos en estas sustancias se remonta a 1940, con la aplicación de la membrana amniótica para el cierre de defectos conjuntivales⁸⁶.

La membrana amniótica ha sido empleada desde entonces con un éxito notable en el tratamiento de los DEPs. Sin embargo, tiene ciertas desventajas. Por un lado, conlleva el empleo de un procedimiento quirúrgico, con todos los inconvenientes que ello implica tanto para el oftalmólogo como para el paciente, especialmente en casos crónicos y que precisan tratamientos de larga duración. Por otro lado, desconocemos la supervivencia exacta de los factores de crecimiento tras el proceso de criopreservación implícito en esta técnica. Además, la membrana amniótica presenta la desventaja de no ser un tejido autólogo,

por lo que presenta el riesgo potencial de transmisión de patógenos indetectables con las técnicas actuales de screening ⁸⁷.

El suero autólogo, en cambio, obtenido de la propia sangre del paciente, carece de dichas desventajas. En 1999, fue propuesto no sólo para el tratamiento del ojo seco sino también para los defectos epiteliales persistentes ^{66 80 82}.

Más recientemente, se ha descrito también la posibilidad de emplear el suero de cordón umbilical ⁹⁵. Los resultados son alentadores, sin embargo, como en el caso de la membrana amniótica, presenta el inconveniente de tratarse de una sustancia de origen heterólogo.

En los últimos años, los derivados plasmáticos ricos en plaquetas, entre ellos el PRGF, están siendo evaluados para su aplicación con fines regenerativos. Se dispone de una amplia experiencia en la aplicación del PRGF para reparar lesiones de membranas mucosas, piel y úlceras en la cirugía oral, maxilofacial y ortopédica ^{15 20 21}.

En nuestra experiencia, la aplicación de PRGF, tanto al 50% como al 100%, ha resultado ser un tratamiento eficaz para DEPS de diversa etiopatogenia con una tasa de cierre del 92,53%.

Existen escasas publicaciones acerca de la aplicación de los preparados ricos en plaquetas en los DEP y éstas se limitan a: dos por parte del grupo de Alió ^{96 151}, una del grupo de Kim ¹⁵² y una de nuestro propio grupo. ⁷⁵

Los grupos de Alió y Kim emplean PRP, si bien, con distintos parámetros de centrifugación (1400 rpm x 10 min vs 200g x 11 min) y distintas concentraciones (100% vs 20%), mientras que en nuestra publicación empleamos el PRGF a una concentración constante del 50%.

Alió y cols tratan con colirio de PRP al 100% un grupo de 26 DEP de etiopatogenia variada (12 neurotróficos, 9 herpéticos y 5 inmunológicos) obteniendo una mejoría en el 92% de los pacientes, aunque sólo en un 50% de los casos se logra la completa resolución del DEP.

Posteriormente, publican otra serie de 11 DEPs ya evolucionados a perforación corneal tratados con PRP a modo de coágulo sujeto bajo una membrana de fibrina suturada a conjuntiva. En este caso, obtiene una completa cicatrización en el 100% de los pacientes.

Kim y cols, por su parte comparan los efectos del SA y PRP en un grupo 28 pacientes con DEPs postinfecciosos y encuentran una tasa de cierre superior en el grupo de PRP (70,58% vs 100% respectivamente), con una velocidad de cicatrización estadísticamente significativa a favor del PRP ($0,48 \pm 0,08 \text{ mm}^2 / \text{día}$ vs $0,95 \pm 0,27 \text{ mm}^2 / \text{día}$, $p = 0,037$). Asimismo, correlacionan sus hallazgos con la presencia significativamente más elevada de EGF en el PRP en comparación con el SA ($860,66 \pm 141,92$ vs $248,96 \pm 43,93$, $p = 0,018$).

Nuestro grupo publicaba la aplicación del PRGF en 18 DEPs de diversa etiopatogenia. En nuestro caso se logró una resolución del 85% de los defectos epiteliales.

Sin embargo, en el presente trabajo hemos observado una tasa de cierre del 92,53%, superior por lo tanto, a la que observábamos en nuestra primera publicación y a la que observan Alió y cols para el colirio de PRP. No obstante, nuestra tasa de éxito es levemente inferior a la obtenida por el grupo de Kim y para el coágulo de PRP del grupo de Alió.

Hemos medido la concentración de algunos de los principales factores de crecimiento presentes en el PRGF de cara a establecer una correlación entre su presencia y la eficacia en el cierre de los DEPs.

Sin embargo, la elevada variabilidad interindividual de los factores de crecimiento, y que afecta especialmente al NGF, VEGF, TGF- β 1, FGF y HGF, ha imposibilitado en nuestro caso el establecimiento de una correlación entre la concentración de los mismos y el tiempo de cierre.

De todos modos, teniendo en cuenta que el efecto de los factores de crecimiento no sólo depende de su concentración sino también de la cantidad y sensibilidad de sus receptores de membrana, regulables por las propias células, cualquier correlación en este sentido debiera ser tomada con cautela.

Cabe destacar que el PRGF resultó eficaz incluso en casos en los que el tratamiento previo con SA había resultado ineficaz, como ocurría con 9 casos (17%) de nuestro estudio.

Consideramos que la relevancia y distinción entre nuestro tratamiento y el SA puede residir en la mayor presencia de factores de crecimiento en el PRGF debido a la concentración y activación plaquetaria.

El modo de activación de las plaquetas también podría resultar clave, como comentábamos anteriormente en el apartado de la discusión "Caracterización del PRGF", motivando diferencias de efectividad y tolerancia entre los distintos hemoderivados ricos en plaquetas.

El PRGF también debiera ser considerado desde el punto de vista costo-efectividad ya que evita o al menos disminuye la frecuencia de tratamientos quirúrgicos que los DEP habitualmente requieren, y que en nuestro caso resultaron necesarios sólo en una cuarta parte de los pacientes.

La diversidad de los tipos clínicos de DEP incluidos en nuestro estudio (edad, etiología, severidad, tratamientos previos y tratamientos asociados) dificulta el análisis más detallado de la eficacia clínica del PRGF.

Las diferencias en cuanto a la etiología y características clínicas así como la necesidad de otras terapias adicionales en algunos casos, limitan la homogeneidad de nuestro grupo de estudio. Por esta razón, no ha sido posible en nuestro estudio establecer una correlación entre la etiopatogenia de los DEPs y su respuesta al tratamiento con PRGF.

Aún con ello, el hecho de que nuestra muestra de pacientes sea tan heterogénea y que la cicatrización ocurriera claramente en la mayoría de los casos tratados indica que el PRGF es un agente terapéutico eficaz y prometedor para el tratamiento de un amplio grupo de DEPs.

En un futuro, sería interesante poder determinar en qué subtipos de DEP podría resultar más eficaz el tratamiento con PRGF así como los tratamientos adyuvantes más efectivos en cada caso.

5.5 SEGURIDAD Y TOLERANCIA

La tolerancia del colirio de PRGF fue buena en la gran mayoría de los casos, con tolerancia regular-mala en sólo 5 de los 159 pacientes tratados, dos de los cuales abandonaron el tratamiento por este motivo. No nos fue posible relacionar dicha intolerancia con una concentración concreta de PRGF, puesto que estos 5 casos recibieron PRGF al 20%, 50% y 100%. Tampoco existía una patología subyacente común con la que relacionar la peor aceptación subjetiva del tratamiento.

Cabe destacar que en uno de los casos de tolerancia regular, el factor causal fue la temperatura y no el propio colirio, puesto que la paciente manifestaba una alta sensibilidad local al frío y al administrar el PRGF a temperatura ambiente, de motu proprio, percibió una mejora subjetiva clara.

Por otro lado, el PRGF muestra una elevada seguridad para su aplicación a modo de colirio, habiéndose registrado efectos adversos atribuibles al mismo en sólo 2 casos de 159, esto es, en un 1'25%.

Dichos efectos adversos ocurrieron ambos en el grupo de DEP. El primero de los casos, en los que se empleó el PRGF al 50%, consistió en una reacción local con hiperemia y quemosis reversibles al suspender el tratamiento.

En el otro caso se desarrollaron infiltrados subepiteliales durante el curso del tratamiento con PRGF al 100%. Se trataba de un varón en tratamiento inmunodepresor por presentar enfermedad de Crohn. Dicha enfermedad no se encuentra entre las patologías autoinmunes descritas clásicamente en la literatura como potenciales formadoras de inmunocomplejos a nivel local, sin embargo, no existiendo factores concurrentes y al haber sido descritos de forma anecdótica el desarrollo de los infiltrados con la aplicación del suero autólogo en pacientes con artritis reumatoide, estos fueron atribuidos al tratamiento con PRGF.

Ello abre la puerta a una discusión en auge: ¿debemos aplicar los hemoderivados autólogos en los pacientes con patologías de origen autoinmune? Existen algunas publicaciones que alertan sobre el uso del suero autólogo en patologías con una fuerte base autoinmune como el penfigoide ocular cicatricial y la queratoconjuntivitis atópica argumentando que éste puede exacerbar el cuadro por el aporte local de inmunoglobulinas y factores proinflamatorios.¹⁵³ Otras sin embargo, impulsan el empleo del suero autólogo en casos eminentemente autoinmunes, como las úlceras de Mooren¹⁵⁴.

En cualquier caso, no existe una contraindicación absoluta para el uso de hemoderivados autólogos en dichas patologías atendiendo a la escasez de efectos adversos publicados pese a la amplia experiencia en la utilización de suero autólogo en éstas y demás patologías de la superficie

ocular en los últimos 20 años. Lo que sí es recomendable con relación a este subgrupo de pacientes es una vigilancia más estrecha, para poder suspender el tratamiento lo antes posible en caso de que exista una reacción adversa al mismo.

En nuestro estudio, hemos incluido varios pacientes con ojo seco tipo Sjögren secundario a artritis reumatoide y un caso de ojo seco secundario a enfermedad de injerto contra huésped crónica, y en todos ellos se han obtenido buenos resultados en cuanto a eficacia y seguridad. La mayoría fueron tratados con PRGF al 20%(1 caso al 100%).

Es posible, sin embargo, que con la extensión del empleo de los productos plasmáticos enriquecidos a concentraciones del 100% puedan aumentar los efectos adversos y la intolerancia y con ello surja la necesidad de establecer protocolos para, bien proceder a la dilución del PRGF o a la inactivación del complemento e inmunoglobulinas mediante calentamiento, como recientemente publica el grupo de Anitua¹⁵⁵, en este subgrupo de pacientes.

No observamos ningún caso de infección, como sí se han descrito ocasionalmente por contaminación del SA administrado de modo domiciliario⁶⁹.

Tampoco observamos en ningún caso un incremento de neovascularización o fibrosis corneal secundarios a la aplicación del PRGF.

En resumen, en este estudio queda establecida la seguridad y tolerancia de la aplicación del PRGF a tres concentraciones distintas: 20%, 50% y 100%.

5.6 APLICABILIDAD CLÍNICA Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El PRGF representa una alternativa terapéutica eficaz para el tratamiento del ojo seco resistente a los tratamientos convencionales y de los defectos epiteliales persistentes. Constituye a priori además una alternativa terapéutica eficiente; fácil de aplicar en la práctica ambulatoria y hospitalaria y con la capacidad potencial de reducir costos en cuanto al número de consultas y procedimientos quirúrgicos requeridos por el paciente.

No obstante, quedan por dilucidar varios puntos para la optimización de su utilización.

En primer lugar, queda pendiente establecer la concentración y pauta idónea de PRGF no sólo en función de la patología ocular a tratar sino también teniendo en consideración aquellos factores individuales que pudieran afectar a la composición del mismo, como la edad, estado salud general del paciente, etc.

En segundo lugar, sería interesante la asociación del PRGF a determinados vehículos y/o presentaciones que permitiesen aumentar su permanencia en la superficie ocular.

En tercer lugar, para el futuro queda la posibilidad de desarrollar un PRGF recombinante, esto es, enriquecido mediante la adición al mismo de ciertos factores de crecimiento, matrices biológicas o incluso células madre.

Por último pero no menos importante, es preciso el análisis comparativo mediante ensayos clínicos prospectivos de su efectividad y eficiencia con respecto al SA, por tratarse del producto hemoderivado autólogo ya consolidado en oftalmología así como con los demás hemoderivados emergentes ricos en plaquetas.

6. CONCLUSIONES

1. El PRGF es una alternativa terapéutica eficaz en el tratamiento de los defectos epiteliales persistentes, con una tasa de cierre superior al 90%.
2. El PRGF es eficaz en la mejoría sintomática del síndrome de ojo seco resistente a los tratamientos convencionales. La mejoría subjetiva se produjo en tres cuartas partes de los pacientes y fue calificada por la mayoría de ellos como moderada o importante.
3. El PRGF es eficaz en el tratamiento de los signos clínicos derivados del síndrome de ojo seco, con una mejoría estadísticamente significativa en dos de las tres determinaciones llevadas a cabo a tal efecto: el grado de metaplasia escamosa y la tinción con verde lisamina. Se observó igualmente una mejoría en el test de Schirmer; sin embargo, ésta no alcanzó significación desde el punto de vista estadístico.
4. El PRGF administrado en forma de colirio muestra un elevado perfil de tolerancia y seguridad. Sólo se registraron dos casos de efectos adversos: uno de hiperemia y quemosis local y otro de aparición de infiltrados corneales subepiteliales(ambos en DEP), mientras que la suspensión del tratamiento a causa de una mala tolerancia resultó ser un hallazgo anecdótico.
5. El tratamiento con PRGF permite reducir la tasa de tratamientos asociados en ambos grupos de pacientes. De hecho, en el grupo de ojo seco la aplicación exclusiva de PRGF obtuvo resultados satisfactorios en más de la mitad de los casos, eliminando incluso la necesidad de uso de lágrimas artificiales. En el caso de los DEP el porcentaje de casos en los que no hizo falta la asociación de tratamientos, desciende a una cuarta parte, dato notable teniendo en cuenta la gravedad del cuadro.
6. El PRGF, tanto puro como diluido, muestra un pH y osmolaridad adecuados para la aplicación oftalmológica, tendente en el caso de administrarse puro a valores levemente más alcalinos e hipoosmolares que la lágrima natural.
7. El PRGF contiene abundantes factores de crecimiento. Existe una elevada variabilidad interindividual de los niveles de los mismos, siendo los valores de EGF y albúmina los más reproducibles.

7. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

1. López-Plandolit S, Morales C, Durán de la Colina JA. Aplicación del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) en el tratamiento de los defectos epiteliales persistentes. Proyecto becado por la Fundación Gangoiti, Bilbao 2006-2008 (prorrogado hasta 2009).
2. Durán JA, Acera A, Rocha G, López-Plandolit S. Epithelial defects with Plasma Rich in Growth Factors. ARVO 2007. Epub.
3. López-Plandolit S, Durán de la Colina JA. Uso del PRGF en los defectos epiteliales persistentes. 84 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, Sevilla 2008.
4. Durán JA, López-Plandolit S, Freire V, Morales C. Characterisation of different plasma-derived preparations used as corneal reepithelialization inductors. ARVO 2009. Epub.
5. López-Plandolit S, Morales C, Freire V, Durán de la Colina JA. Nuestra casuística en el empleo de PRGF en los defectos epiteliales persistentes. VII Reunión anual del GESOC, Madrid 2009.
6. Freire V, López-Plandolit S. Valoración del Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF) como tratamiento para el ojo seco. 86 Congreso de la Sociedad Española de Oftalmología, Madrid, 2010.
7. Grau A, López-Plandolit S, Morales C, Freire V, Durán de la Colina JA. Efficacy of topical Plasma Rich in Growth Factors in the treatment of dry eye. 6th International Conference on the Tear Film and Ocular Surface, Florence, Italy, 2010.
8. López-Plandolit S, Morales C, Durán JA. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) as a therapeutic agent for severe persistent epithelial defects. *Cornea* 2010; 29: 843-8.
9. López-Plandolit S, Morales C, Freire V, Grau A, Durán JA. Efficacy of Plasma Rich in Growth Factors for the treatment of dry eye. *Cornea* 2011; 30: 1312-17.
10. López-Plandolit S, Morales C, Durán de la Colina JA. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología (Capítulo 15). Ponencia SEO 2011.
11. López-Plandolit S. ¿Qué aportan los derivados plasmáticos? V Simposium internacional sobre superficie ocular, Bilbao, 2012.
12. López-Plandolit S. Hemoderivados en el ojo seco. Ojo seco 2015. San Sebastián, 2015.

Plasma Rich in Growth Factors as a Therapeutic Agent for Persistent Corneal Epithelial Defects

Silvia López-Plandolit, MD,*† María-Celia Morales, DSci, PhD,* Vanessa Freire, Pre-PhD,*
Jaime Etxebarria, MD,*‡ and Juan A. Durán, MD, PhD*§

Objective: To evaluate the efficacy of topically applied autologous plasma rich in growth factors (PRGF) as a treatment for persistent epithelial defects (PEDs) of the cornea.

Methods: A series of prospective noncomparative cases.

Participants: Twenty eyes from 18 patients with PED with various underlying etiopathologies: neurogenic, iatrogenic, associated with burning or secondary to severe dry eye. Patients were treated with a PRGF eyedrop solution. Serial photographs of the cornea were taken until epithelialization was complete. We had previously characterized the levels of a panel of growth factors (platelet-derived growth factor, epithelial growth factor, vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, fibroblast growth factor, and nerve growth factor) in the PRGF of 11 of these patients. The following variables were additionally recorded: (1) duration of PED before treatment, (2) previous treatments, (3) time for complete epithelialization, and (4) treatments required concomitantly with PRGF.

Results: Epithelial defects healed in 17 of 20 cases (85%), with a mean therapeutic time of 10.9 weeks (range 2–39 weeks). Mean progression time before treatment was 26.7 weeks (range 2–104 weeks). Growth factor concentrations were platelet-derived growth factor 12645.9 ± 1690.0 pg/mL, epithelial growth factor 468.9 ± 97.6 pg/mL, vascular endothelial growth factor 204.5 ± 119.4 pg/mL, hepatocyte growth factor 149.5 ± 173.5 pg/mL, fibroblast growth factor 82.6 ± 95.9 pg/mL, and nerve growth factor 37.7 ± 18.6 pg/mL.

Conclusion: PRGF, when applied as eyedrops, is a highly effective therapeutic agent for the treatment of a broad etiopathological spectrum of corneal PEDs.

Key Words: persistent epithelial defect, neurotrophic corneal ulcer, growth factor, plasma rich in growth factors

(*Cornea* 2010;29:843–848)

Persistent epithelial defect (PED) of the cornea is defined as a lesion that measures more than 2 mm in diameter, persists for more than 2 weeks, and is resistant to conventional treatments.^{1,2} The etiopathology of PED can be very variable, but the 2 principal causes are alterations in the tear surface and neurogenic dysfunctions.^{1,2} Other causes include burns because of chemical agents, immunological alterations, dystrophies of the epithelium and basal membrane, metabolic alterations, iatrogenia, trauma, and infections.^{1–3}

Not infrequently, PEDs do not respond to the application of conventional treatments such as artificial tears, therapeutic contact lenses, antiinflammatory agents, oral antibiotics, inhibitors of collagenolytic enzymes, or tarsorrhaphy. Resistant PEDs continue to degenerate, in many cases toward progressive stromal lysis and subsequent perforation; therefore new therapeutic alternatives are urgently being sought. Many of these consist of natural preparations, which are rich in growth factors or of these factors alone, derived by synthetic processes. Among the topically applied natural preparations, autologous serum has been used in recent years for the treatment of PED and dry eye with satisfactory results in most cases.^{1,2}

More recently, a novel treatment has been proposed, consisting of plasma rich in growth factors (PRGF).^{4–6} This treatment involves the application of autologous platelet protein extracts, which are rich in growth factors. However, the use of PRGF has been limited up to now to the repair of lesions of the skin, mucous membranes, and subcutaneous tissue in oral, maxillofacial, and orthopedic surgery. Thus, the objectives of the present article are to (1) describe the manner of preparation of PRGF, (2) characterize PRGF in terms of its levels of a panel of growth factors, and (3) analyze the clinical response of PED to PRGF treatment, thereby evaluating the possibility that this treatment may serve as a new efficacious and safe alternative to enhance reepithelialization.

MATERIALS AND METHODS

Patients

This study included 18 patients (20 eyes) diagnosed with PED, studied between 2004 and 2007 at the Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología (Bilbao, Spain). The mean age of patients was 61.2 years (range 33–88 years). Thirteen were men and 5 were women.

All patients gave their written consent after being informed about the treatment. Our study was approved by the Ethics Committee of the Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, and the principles of the Helsinki Declaration

Received for publication December 18, 2008; revision received March 11, 2009; accepted March 30, 2009.

From the *Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Bilbao, Vizcaya, Spain; †San Eloy Hospital, Baracaldo, Vizcaya, Spain; ‡Cruces Hospital, Baracaldo, Vizcaya, Spain; and §Basque Country University, Bilbao, Vizcaya, Spain.

Reprints: Silvia López-Plandolit, MD, Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Virgen de Begoña 34, E-48006 Bilbao, Vizcaya, Spain (e-mail: splandolit@crn.es).

Copyright © 2010 by Lippincott Williams & Wilkins

Cornea • Volume 29, Number 8, August 2010

www.corneajml.com | 843

were complied with. The etiopathology of the epithelial defects was varied: neurotrophic ulcers (9; 6 nonherpetic and 3 herpetic), iatrogenic (6 cases; after ocular surgery), secondary to chemical burn (3), and secondary to severe dry eye (2).

The criterion for inclusion was PED with no improvement after conventional treatments, the latter including both medical (artificial tears, topical steroids and antibiotics, oral antibiotics or antiviral agents, therapeutic contact lenses, autologous serum, and so on) and surgical (amniotic membrane patch and eyelid surgery) treatments. Among the 20 eyes included in our study, 18 eyes (90%) had been receiving medical treatment consisting of artificial tears and an association of topical antibiotics and topical steroids. Two cases had also been treated with contact lenses and 2 with topical antiviral agents. Six patients had previously been treated with 20% autologous serum but without success. Surgical treatment had also been performed in 6 cases. Surgical approaches included lateral tarsorrhaphy, amniotic membrane patch, and lateral pexia of the inferior eyelid. Cases involving active corneal infection were excluded.

We decided that the application of PRGF did not need to preclude the use of other concomitant treatments (such as tarsorrhaphy, punctal occlusion, oral tetracyclines, antibiotics, antiinflammatory agents, and so on) when they were considered necessary. In addition, we included in the protocol the possibility of carrying out amniotic membrane transplant if at the end of a fortnight of treatment no objective improvement of the ulcer could be observed or if clinical features deteriorated at any stage.

PRGF Preparation

PRGF is a natural extract, which is obtained from the patient's own blood. The preparation process involves a 2- to 3-fold concentration of platelets found in patient blood by centrifugation, resulting in a liquid, which can be used as eyedrops for surface application. Fifty milliliters of whole blood was collected by venipuncture in 5-mL sterile tubes containing 0.5 mL of 3.8% sodium citrate. Samples were centrifuged at 460g for 8 minutes at room temperature. The upper fraction immediately above the erythrocyte pellet was then transferred to a sterile tube. Platelet activation and fibrin matrix formation were induced by adding calcium chloride to a final concentration of 22.8 mM, and clots were allowed to retract for 2 hours at 37°C. The released supernatant is rich in growth factors. This supernatant (PRGF) was diluted 1:1 with 0.9% sodium chloride, and 2.5 mL of this diluted PRGF were transferred into 5-mL sterilized eyedrop bottles. All procedures were carried out under highly sterile conditions, operating inside a laminar flow hood. Before initiating treatment, patients were instructed to keep the bottles at -20°C until required; the bottle in use was to be stored at 4°C and discarded after 5 days.⁴

PRGF Treatment Regime

A period of clearing before initiating PRGF treatment was not employed. PRGF was administered at a 1:1 dilution, initially at 1 drop every 2 hours (during daytime) for the first 3 days. Subsequently, the treatment regime was personalized as a function of the clinical evolution of each epithelial defect.

Ophthalmologic Evaluation

Visual parameters were not recorded for this study.

Measurement of Growth Factors in PRGF

The concentration of a panel of growth factors, which could be considered to be potentially therapeutic, was measured in the PRGF of 11 patients. Platelet-derived growth factor (PDGF), epithelial growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF), and nerve growth factor (NGF) were measured in undiluted PRGF using commercially available Quantikine colorimetric sandwich ELISA kits (R&D, Minneapolis, MN), according to the manufacturer's instructions. All enzyme-linked immunosorbent assays were performed in triplicate.

Evaluation Parameters

The following variables were analyzed: duration of PED progression before PRGF treatment; previous treatments (medical and/or surgical); duration of treatment until complete epithelialization; need for PRGF-associated treatments (medical and/or surgical); levels of PDGF, EGF, VEGF, HGF, FGF, and NGF in the PRGF of these patients. Means and standard deviations were calculated using Windows NT Excel software.

RESULTS

PRGF was characterized in terms of the concentration of the growth factors indicated in Table 1. The most abundant growth factor was PDGF, and the least abundant one was NGF.

The mean duration of PED progression before PRGF treatment was 26.7 weeks (range 1-104 weeks, with a median of 9 weeks). The epithelial defect was restored in 85% of cases (17 of 20 eyes), with a mean epithelialization time of 10.9 weeks (range 2-39 weeks, median of 5 weeks). Table 2 summarizes the relevant characteristics of the patients.

For the 3 cases in which the epithelial defect did not heal, follow-up time was 10, 12, and 22 weeks. In these cases, the etiopathology was neurotrophic; 1 was iatrogenic (case 9), and 2 were nonherpetic (posttrigeminal ablation, case 6 and postradiotherapy, case 18). Two cases required conjunctival flap (cases 9 and 18), and another was treated with a Boston keratoprosthesis (case 6).

PRGF was applied alone to 4 eyes (20% of cases). In the remaining cases, other medical and/or surgical treatments were employed during follow-up: topical antibiotics, topical corticoids, oral antiviral agents, oral tetracyclines, topical antiviral agents, amniotic membrane transplant, and lateral tarsorrhaphy.

The aim of the treatment with PRGF was epithelialization; once it was achieved, the treatment was discontinued except in cases 1, 2, and 3. Cases 2 and 3 correspond to PED associated with severe dry eye; when the PED was resolved, PRGF treatment was maintained in a prophylactic manner at concentration of 20%. In case 1, PED was secondary to surgical damage to both facial and trigeminal nerves; after various episodes of PED successfully treated with PRGF, we finally decided to maintain treatment continuously at a concentration of 20%.

TABLE 1. Concentrations of Growth Factors in Undiluted PRGF

Growth Factor	PDGF	EGF	VEGF	HGF	FGF	NGF
PRGF	12645.9 ± 1690.0	468.9 ± 97.6	204.5 ± 119.4	149.5 ± 173.5	82.6 ± 95.9	37.7 ± 18.6

Concentrations expressed as picograms per milliliter.

No change in corneal sensation was reported, except for patient 12, for whom anesthesia before PRGF treatment was replaced by a hypesthesia once epithelialization was complete. No differences were found regarding Schirmer test measures.

PRGF tolerance was good in 95% of cases (19 of 20). In case 18, PRGF had to be discontinued because of the patient's discomfort (redness and itching). No other complications associated with its use were detected. In particular, we had examined for the presence of overt infection and neovascularization because of the high content of VEGF in PRGF.

Slit-lamp images of representative cases are shown in Figures 1 and 2. A nonherpetic neurotrophic PED was observed in an 83-year-old man (case 15); the duration of the defect before PRGF treatment was 2 weeks. The defect measured 5.6 × 4.4 mm. Time to complete healing was 6 weeks, with PRGF being applied in the absence of other treatments (Fig. 1). An 84-year-old woman (case 17) developed a posttrigeminal ablation PED. The duration of the defect was 22 weeks. Time to complete healing was 7 weeks. PRGF was applied in conjunction with a topical antibiotic (Fig. 2).

DISCUSSION

PED is a serious eye condition because it frequently progresses to perforation of the cornea and can eventually lead to irreversible loss of vision. Despite having various causes, these defects share in common the incapacity of the cornea to close its damaged epithelium and thus constitute an important therapeutic challenge in daily clinical practice.^{1,2,7,8} The forms of PED with worse prognosis have been reported to be those associated with severe dry eye and neurotrophic ulcers.¹ In the case of dry eye, the lack of tears results in growth factor deprivation; in the case of neurotrophic ulcer, factors necessary for neural metabolism, such as substance P and NGF, are absent.

The inefficacy of different treatments, such as artificial tears, topical antiinflammatories, oral tetracyclines, bandage contact lenses, or tarsorrhaphy, for the treatment of PED has driven the search in recent decades for new therapeutic approaches. Thus, the effects of individually applied synthetic growth factors, neurogenic factors, and natural extracts rich in both growth and neurogenic factors have been studied.⁹ The growth factors used to favor epithelialization include EGF,¹⁰ FGF,⁹ PDGF,¹¹ NGF,⁹ and fibronectin, a protein associated

TABLE 2. Characteristics of Patients With PED

Eye	Age	Sex	Diagnosis	Duration Before PRGF (Wk)	Time to Complete Healing (Wk)	Associated Treatments
1	33	M	Petic neurotrophic	29	23	AB, TS
2	53	F	PED associated with dry eye	78	11	AB, TS, OT
3	53	F	PED associated with dry eye	78	4	OT
4	88	M	Iatrogenic	3	10	AB, TS
5	47	M	Chemical burn	10	39	AB, TS, AMT
6	69	M	Petic neurotrophic	33	No epithelialization	AB, OT, AMT
7	60	M	Petic neurotrophic	104	2	No
8	60	M	Petic neurotrophic	104	2	No
9	60	F	Iatrogenic	11	No epithelialization	AB, TS, OAV, AMT
10	68	M	Postherpetic neurotrophic	2	5	AB, TS, OT
11	68	M	Postherpetic neurotrophic	20	2	No
12	55	M	Chemical burn	1	10	AB, TS, AMT, LT
13	45	M	Iatrogenic	3	4	No
14	40	M	Iatrogenic	1	2	No
15	83	M	Petic neurotrophic	2	6	No
16	60	M	Traumatic	3	1	AB
17	84	F	Petic neurotrophic	22	7	AB
18	61	M	Iatrogenic	2	No epithelialization	AB, TS, OT, AMT, LT
19	64	F	Postherpetic neurotrophic	8	2	TAV
20	63	F	Iatrogenic	20	10	No

AB, topical antibiotics; AMT, amniotic membrane transplantation; F, female; LT, lateral tarsorrhaphy; M, male; OAV, oral antiviral; OT, oral tetracycline; TS, topical steroid; TAV, topical antiviral.

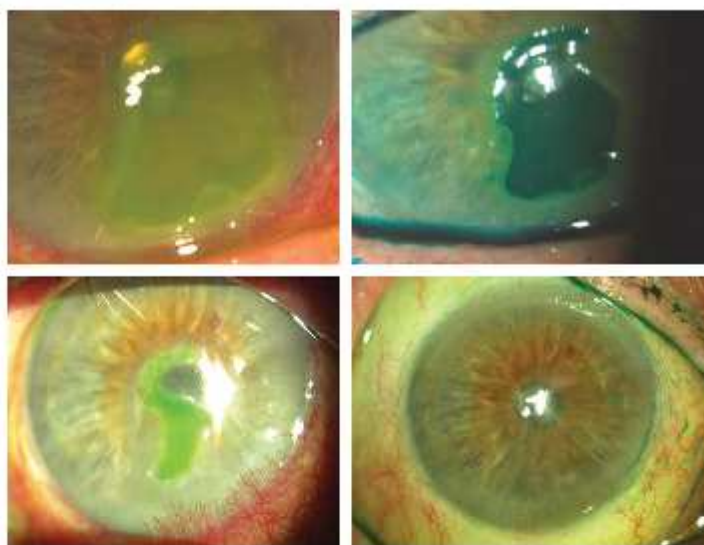


FIGURE 1. Slit-lamp images before and during treatment of the right eye of an 83-year-old man with a nonherpetic neurotrophic PED (case 15).

with the extracellular matrix.¹²⁻¹⁴ Despite having achieved good initial results in animals, results in human patients have been somewhat contradictory and controversial to date.

One neurogenic factor that has been explored for PED therapy is substance P. This is a neurotransmitter, which is liberated by the peripheral autonomous nervous system and is present at high levels in nerve endings in the cornea. It acts in synergy with insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and NGF.¹⁵⁻¹⁸ Results from experiments with substance P applied with IGF-1 in humans are scarce. Recently, a study has been published reporting promising findings regarding the use of tetrapeptides derived from substance P and IGF-1.¹⁹ NGF has been used in neurotrophic ulcers since 1998, with quite promising results; however, NGF treatment has still not yet been approved for use in humans. Nevertheless, the essential limitation of these treatments is that because of their mechanism of action, they are only applicable to PEDs of neurogenic origin.

As a result of the wide range of etiologies of PEDs, an ideal treatment would be that which provides the largest quantity and variety of growth factors. The search for natural extracts that are rich in these substances began as early as in 1940, with the application of amniotic membrane for conjunctival defects.²⁰ Amniotic membrane has since then been used for the treatment of PED with notable success. However, it has a number of disadvantages; on the one hand, it involves a surgical procedure, with all of the inconveniences that this implies for both the ophthalmologist and the patient, particularly when cases are chronic and involve long-term treatments. On the other hand, it is unknown if growth factors survive the process of cryoconservation implicit in this technique. Moreover, because amniotic membrane is

not an autologous tissue, it also has the risk of being a source of currently undetectable pathogens.²¹

In contrast, autologous serum, obtained from the patient's own blood, has none of the aforementioned disadvantages. The use of autologous serum for the treatment of dry eye was reported in 1984. In 1999, it was proposed for the treatment of PED and dry eye, with satisfactory results.^{1,2,22,23} More recently, the use of serum from fetal umbilical cord has also been reported.^{3,24} The results are encouraging, but the technique presents the same disadvantages as amniotic membrane because such serum is a heterologous substance.

In more recent times, a novel treatment based on PRGF is being examined for its therapeutic potential. The technique involves the use of autologous platelet protein extracts, which are rich in growth factors.⁴⁻⁶ However, it has been applied only to the repair of lesions of mucous membranes, skin, and subcutaneous ulcers in oral, maxillofacial, and orthopedic surgery. Our group reported the first case of PRGF application in ophthalmology,²⁵ and Alió et al⁶ reported the use of a similar treatment, which was called autologous plasma rich in platelets. The principal difference between both treatments resides in platelet activation. Thus, in PRGF treatments, the physiological activation of platelets is achieved by adding calcium, whereas a controlled activation of platelets is not induced in treatments based on autologous plasma rich in platelets; instead, the platelet extract is frozen. After defreezing, platelets will lyse, releasing their growth factors. However, these are accompanied by lysosomal enzymes responsible for their degradation. We have measured the concentration of some growth factors in PRGF to attempt to correlate their presence with PED improvement. PDGF and EGF were found to be the most stable between patients; other factors were also

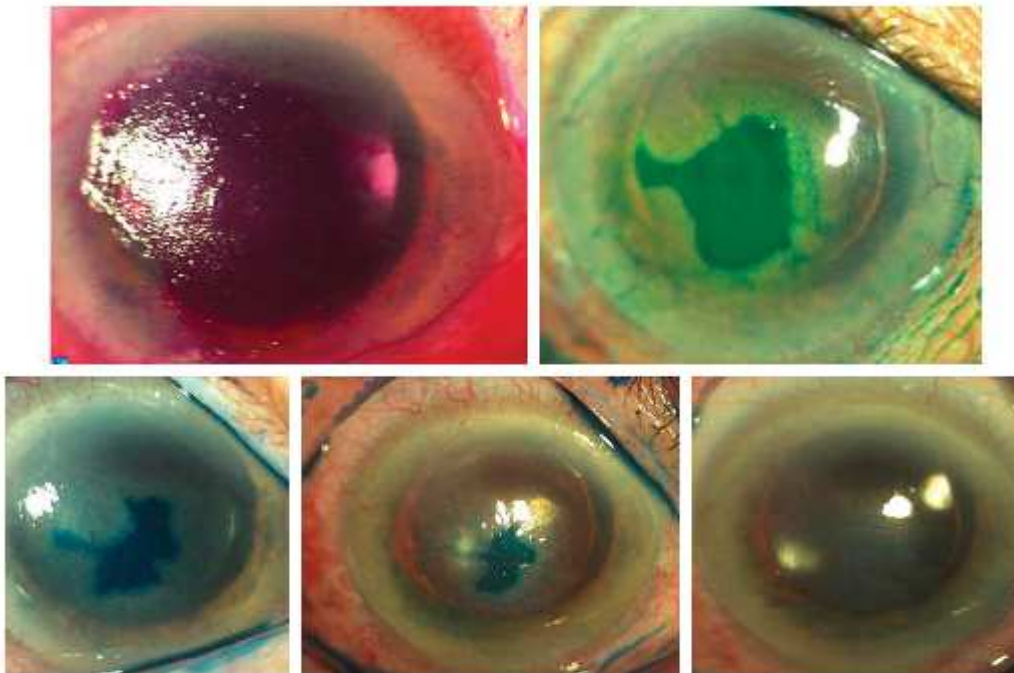


FIGURE 2. Slit-lamp images of an 84-year-old woman with a posttrigeminal ablation PED (case 17).

found to be present, but at highly variable levels (some factors were even undetectable in some patients), making their association with the therapeutic effect somewhat more difficult to correlate.

In our experience, the application of 50% PRGF is effective as a treatment for the reestablishment of the corneal epithelial surface in patients with PED of various etiologies, even in cases in which prior treatment with autologous serum was ineffective, as occurred with 6 patients in our study. PRGF can also be considered to be a cost-effective treatment because it avoids or at least diminishes the frequency of surgical interventions, which PEDs often require. Infection (mainly because of manipulation of the product by the patient) and neovascularization are 2 of the potential side effects of PRGF, but in our hands, neither of these was detected.

PRGF healing appears to be because of the presence of elements, which contribute to epithelial closure. Liu et al²⁷ quantified a variety of substances in different blood derivatives and concluded that the concentration of growth factors is higher when platelets are activated. Platelet activation may thus be the relevant difference between our treatment and that based on autologous serum. In our study, the concentration of growth factors in the extracts was found to be highly variable among patients, with HGF and FGF presenting most variation

(Table 2). Despite the theoretical importance of this finding, its significance remains to be determined.

The diversity of the clinical types of PED involved in our study (such as age, etiology, severity, prior treatments, and associated treatments) makes it difficult to analyze in more detail the clinical efficacy of PRGF. Differences in etiology and clinical characteristics and the need for other additional therapeutic interventions in some cases, limited the homogeneity of our study group. For this reason, it is not possible in our study to establish a correlation between the etiopathology of the PEDs and their response to PRGF treatment. For the same reason, it is not possible to compare results among different treatments, as has been shown in previous studies.²⁸

Nevertheless, the fact that our sample of patients was so heterogeneous and that healing took place in the majority of treated cases clearly indicates that PRGF is a promising and effective therapeutic agent for the treatment of a wide range of PEDs in ophthalmology.

REFERENCES

1. Tsubota K, Goto E, Shimman S, et al. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999; 106:1984-1989.

2. López-García JS, García-Leonano I, Rivas L, et al. Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2007;82:9-20.
3. Vajpayee RB, Mukeji N, Tandon R, et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol*. 2003;87:1312-1316.
4. Anitua E, Andia I, Ardanza B. Autologous platelets as a source of protein for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004;91:4-15.
5. Anitua E, Andia 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 Orthop Res*. 2005;23:281-286.
6. Marx RE. Platelets rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:489-496.
7. Cavanagh HD, Colley AM. The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol*. 1989;192(Suppl):115-134.
8. Nishida T, Chikama T, Morishige N, et al. Persistent epithelial defects due to neurotrophic keratopathy treated with a substance P-derived peptide and insulin-like growth factor I. *Jpn J Ophthalmol*. 2007;51:442-447.
9. Tripathi BJ, Kunit PS, Tripathi RC. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea*. 1990;9:2-9.
10. Pastor JC, Calonge M. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea*. 1992;11:311-314.
11. Muali S, Hardten DR, De Martelaz S, et al. Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Curr Eye Res*. 1994;13:357-362.
12. Nishida T, Ohashi Y, Awata T, et al. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcers. *Arch Ophthalmol*. 1983;101:1046-1048.
13. Phan TM, Foster CS, Borsoff SA. Topical fibronectin in the treatment of persistent corneal epithelial defects and trophic ulcers. *Am J Ophthalmol*. 1987;104:494-501.
14. Gordon JF, Johnson P, Musch DC, et al. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent defects in the corneal epithelium. *Am J Ophthalmol*. 1995;119:281-287.
15. Brown SM, Lamberts DW, Reid TW. Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and IGF-1. *Arch Ophthalmol*. 1997;115:926-927.
16. Nakamura M, Kawahara M, Nakata K, et al. Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-2 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:2937-2940.
17. Bonini S, Lambiase A, Rama P. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 2000;107:1347-1352.
18. Lambiase A, Rama P, Bonini S. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Eng J Med*. 1998;338:1174-1180.
19. Yamada N, Matsuda R, Morishige N, et al. Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from substance P and insulin-like growth factor I for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br J Ophthalmol*. 2008;92:896-900.
20. De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol*. 1940;23:522-525.
21. Kruse FE, Rohrschneider K, Volcker HE. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology*. 1999;106:1504-1510.
22. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, et al. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology*. 2004;111:1115-1120.
23. Poon AC, Geerling G, Dart JK, et al. Autologous serum eye drops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol*. 2001;85:1188-1197.
24. Yoon KC, You IC, Im SK, et al. Application of umbilical cord serum eye drops for the treatment of neurotrophic keratitis. *Ophthalmology*. 2007;114:1637-1642.
25. Rocha G, Acem A, Durán JA. Laser in situ keratomileusis flap necrosis after trigeminal nerve palsy. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:1423-1425.
26. Alió J, Alm DM, Ariola A, et al. Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology*. 2007;114:1286-1293.
27. Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. Corneal epitheliotrophic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2438-2444.
28. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88:1467-1474.

Efficacy of Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Dry Eye

Silvia López-Plandolit, MD, María-Celia Morales, DSci, PhD, Vanesa Freire, PhD, Arturo E. Grau, MD, and Juan A. Durán, MD, PhD

Purpose: To evaluate the efficacy of plasma rich in growth factors (PRGF) for the treatment of moderate/severe dry eye.

Methods: PRGF treatment was administered to 16 patients who had moderate/severe dry eye diagnosed and who had not responded previously to other standard treatments. We quantified several growth factors present in the PRGF of each patient and obtained quantitative registers of the symptoms (modified score dry eye questionnaire), both before and after PRGF treatment. We also performed impression cytology to determine the degree of squamous metaplasia before and after PRGF treatment.

Results: PRGF treatment was associated with a statistically significant improvement in score dry eye questionnaire values ($P < 0.001$). Results from impression cytology corroborated this improvement, but the reduction in the degree of squamous metaplasia was not statistically significant. In 75% of patients treated with PRGF, no further treatments were required, whereas in the remaining 25% other ocular treatments could be reduced.

Conclusions: PRGF led to symptom improvement in patients with moderate/severe dry eye. Surprisingly, the symptoms recorded in the dry eye questionnaire do not always agree with the degree of squamous metaplasia measured by impression cytology.

Key Words: dry eye, plasma, growth factors, questionnaire, impression cytology, squamous metaplasia

(*Cornea* 2011;30:1312–1317)

Dry eye is one of the most common ocular pathologies and frequently motivates the patient to seek clinical advice. However, despite advances in our understanding of its pathophysiology and in therapeutic options, the treatment of dry eye continues to be somewhat unsatisfactory because of essentially 3 reasons: first, the multifactorial etiology of dry eye; second, the lack of correspondence between symptoms reported by the patient and observable clinical parameters; and

third, the commercial unavailability of a tear substitute that is ideal in terms of its composition and duration of effect.^{1,2}

Tear film is a dynamic and complex solution with specific antimicrobial, mechanical, and optical properties. It includes a range of growth factors like epidermal growth factor, transforming growth factor beta, nerve growth factor, and others, as well as fibronectin and vitamins that promote the proliferation, migration, and differentiation of the corneal and conjunctival epithelium.³ Ideal artificial tears should emulate the physicochemical properties of natural tears, in addition to having the highest possible retention capacity. They should also allow the addition of biological agents, which may be necessary for the metabolism of the cells of the ocular surface.

The initial reports of the efficacy of autologous serum for the treatment of dry eye promoted interest in the search for an ideal tear substitute.⁴ The ensuing research not only corroborated the efficacy of autologous serum for the treatment of a variety of pathologies of the ocular surface⁵⁻⁸ but also stimulated new applications for blood derivatives in ophthalmology. In recent years, further progress has been made by including factors derived from platelets in the composition of a novel blood derivative, that is, plasma rich in growth factors (PRGF).⁹ This product is being successfully applied in a variety of medical areas, such as maxillofacial surgery, traumatology, and so on.^{10,11} More recently, its application in ophthalmology for the treatment of persistent epithelial defects has been reported.^{12,13}

This study represents a first approach to evaluate the efficacy of PRGF for the treatment of different dry eye forms in terms of the resolution of symptoms, which were evaluated subjectively by means of a questionnaire about dry eye symptoms. We also measured the efficacy in terms of improvements in specific clinical parameters. Because previous studies have indicated that impression cytology is one of the objective methods that best correlates with symptoms perceived by the patient,¹⁴ we used this test as a principal objective marker.

PATIENTS AND METHODS

Patients

We studied 16 patients (15 women and 1 man) who presented with moderate/severe dry eye at the Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología (Bilbao, Spain). The mean age of the population was 64.63 ± 12.21 years. We evaluated both the severity of the perceived symptoms and the gravity of the clinical features. All these patients had presented a weak or null

Received for publication October 21, 2010; revision received December 21, 2010; accepted December 26, 2010.

From the Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Bilbao, Vizcaya, Spain.

The authors declare no financial disclosures or conflicts of interest.

Reprints: María-Celia Morales, Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, C/Virgen de Begoña nº 34, E-48906 Bilbao, Vizcaya, Spain (e-mail: mc_morales@icqo.es).

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

1312 | www.corneajrnl.com

Cornea • Volume 30, Number 12, December 2011

response to conventional treatments, which had been applied previously. Following the recommendations of the Helsinki Declaration and approval by the Instituto Clinico-Quirúrgico de Oftalmología Ethical Committee, we obtained the informed consent of these patients before commencing the study.

The pathophysiological classification of patients according to the type of dry eye is represented in Table 1. In summary, the population consisted of patients with non-Sjögren-type aqueous tear-deficient dry eye syndrome (n = 5), Sjögren syndrome (Sjögren-type aqueous tear-deficient dry eye syndrome) (n = 4), meibomian gland dysfunction (n = 4), and mixed pathology (non-Sjögren-type aqueous tear-deficient dry eye syndrome plus meibomian gland dysfunction) (n = 3). This population could be considered to be a representative sample of the distinct pathologies, which can be found in the clinical practice.

PRGF Preparation and Treatment Regime

Whole blood was collected (30 mL) by venipuncture in 5-mL sterile tubes containing 0.5 mL of 3.8% sodium citrate. Samples were centrifuged at 460g for 8 minutes at room temperature. The resulting plasma was recovered, and platelets were activated with 22.8-mM calcium chloride as reported elsewhere.⁹ After the formation of a clot and the liberation of the growth factors, the supernatant was recovered and diluted to 20% with 0.9% sodium chloride. This diluted PRGF (2.5 mL) were transferred into 5 mL sterilized eyedrop bottles. All procedures were performed under highly sterile conditions, operating inside a laminar flow hood.

Before initiating the treatment, the patients were instructed to keep the bottles at -20°C for a maximum of 3 months; the bottle in use was to be stored at 4°C and used for 5 to 7 days. The solution was to be applied 4 times per day.

Measurement of Growth Factors in PRGF

The concentration of a panel of growth factors that could be considered to be potentially therapeutic was measured in the PRGF of patients. Platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor, and fibroblast growth factor were measured in undiluted PRGF using commercially available Quantikine colorimetric sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kits (R&D, Minneapolis, MN), following the manufacturer's instructions. All enzyme-linked immunosorbent assays were performed in triplicate. Means and SDs were calculated using Windows NT Excel software (Microsoft, Redmond, WA).

Clinical Follow-up of Patients

We evaluated patient discomfort using a questionnaire based on the score dry eye questionnaire (SDEQ)¹³ modified according to the demographic characteristics of the region, both before PRGF treatment and 3 months later. In this questionnaire, the patient evaluated each of the following dry eye symptoms using a scale of 0 to 4: dryness, sensation of foreign body, stinging, pain, itchiness, photosensitivity, blurred vision, and redness (total 32 points). We have defined moderate/severe dry eye based on the SDEQ (score >10) and on the absence of improvement with conventional previous treatments (unpreserved artificial tears, punctal plugs, lid hygiene, systemic tetracycline, and/or unpreserved topical steroid). We also performed a biomicroscopic exploration including staining with Lissamine green (van Bijsterveld scheme¹⁴) and the Jones test, both at the beginning and end of the first treatment with PRGF.

Conjunctival Impression Cytology Follow-up/Monitoring

We performed impression cytology on the first visit and after 3 months of PRGF treatment. These analyses were

TABLE 1. Etiopathological Characteristics, Previous Treatments, Effects of Treatments on Symptoms, and the Degree of Squamous Metaplasia in Each of the Patients Included in This Study

Patient Number	Age (Yr)	Sex	Diagnosis	Previous Treatment	Symptom Test		Squamous Metaplasia	
					Pretreatment	Posttreatment	Pretreatment	Posttreatment
1	72	M	MGD	T, TC, OT, CS	22	4	0	0
2	69	M	MGD	T	26	22	2	2
3	69	M	MGD	T, TC, OT, H	18	8	2	1
4	63	M	MGD	T, TC, H, OT	16	17	1	0
5	86	M	Non-SS ADDE	T	18	4	3	2
6	58	M	Non-SS ADDE	T	31	16	3	3
7	82	M	Non-SS ADDE	T, TP	20	15	1	1
8	69	M	Non-SS ADDE	T, TC	11	12	2	2
9	63	M	Non-SS ADDE	T	13	6	1	0
10	77	M	SS ADDE	T, TC, LP, OT	18	12	1	1
11	63	M	SS ADDE	T, TC	23	16	3	3
12	68	M	SS ADDE	T	16	15	2	0
13	45	M	SS ADDE	T, TC	24	11	3	3
14	41	V	Non-SS ADDE + MGD	T	11	1	3	0
15	55	M	Non-SS ADDE + MGD	T	13	9	2	1
16	54	M	Non-SS ADDE + MGD	T, TC, H, OT	14	5	2	0

CS, conjunctival surgery; H, hygiene of the eyelids; MGD, meibomian gland dysfunction; Non-SS ADDE, non-Sjögren-type aqueous tear-deficient dry eye syndrome; OT, oral tetracycline; SS ADDE, Sjögren-type aqueous tear-deficient dry eye syndrome; T, tear; TC, topical corticosteroids; TP, tear plug.

TABLE 2. Concentrations of Growth Factors in Undiluted PRGF

Growth Factor	PDGF	EGF	VEGF	HGF	FGF
PRGF	15,097.7 ± 3299.4	479.8 ± 113.9	91.5 ± 44.5	36.0 ± 17.3	32.6 ± 27.3

Concentrations expressed as picograms per milliliter.

EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

independent from the SDEQ results. Samples were obtained by instilling a drop of topical anesthetic (0.1% tetracaine chlorhydrate + 0.4% oxybuprocaine chlorhydrate) and a small strip of filter paper (Millipore HAWP304 de 5 × 5 mm, Millipore Corporation, Billerica, MA) was placed on the superior, inferior, temporal, and nasal bulbar conjunctiva, applying light pressure for 3 seconds. These strips containing samples were then fixed in absolute ethanol and stained following the protocol described.¹⁷ Photographs of ocular surface samples were taken at ×200 magnification.

Although the process of squamous metaplasia is continuous, we divided it into different degrees. We used the criterion proposed by Oroza¹⁸ to diagnose 4 degrees of squamous metaplasia in the samples obtained by impression cytology. This scale of 0 to 4, with degree 0 representing normal, coincides with the clinical grading proposed by Murube,¹⁹ in which degree 1 denotes slightly altered, 2 represents moderately altered, 3 represents severely altered, and 4 denotes completely degenerated and keratinized.

Statistical Analysis

Means and SDs of all variables were calculated using Windows NT Excel software (Microsoft). Scoring on the questionnaire and the degree of pretreatment and posttreatment squamous metaplasia were compared using the paired 2-tailed Student *t* test to determinate the degree of statistical significance.

RESULTS

A summary of the clinical characteristics of the patients and the treatments that they had received before inclusion in this study is represented in Table 1. PRGF was administered as a single treatment in 12 patients (75%). In 2 patients, it was combined with palpebral hygiene and in 2 others it was combined with tear plugs.

Regarding the duration of PRGF treatment, 13 of the 16 patients were administered only 1 treatment cycle (3 months). The remaining 3 patients continued with the treatment for

a mean of 10.66 ± 4.04 months (range, 7–15 months). Of the 13 patients who received only 1 cycle of PRGF treatment, 2 had to be retreated because of worsening of symptoms after having finalized the first cycle of treatment.

The concentrations of growth factors in undiluted PRGF of each patient were quantified. The corresponding mean and SD values are shown in Table 2.

PRGF treatment led to an improvement in the symptoms of dry eye in the majority of patients in this study (Table 1). Thus, these patients had reduced scores in the modified SDEQ 3 months after PRGF treatment, indicating symptom improvement after treatment. The mean questionnaire score before treatment (18.38 ± 5.68) was significantly different ($P < 0.001$) from the mean score after treatment (10.81 ± 5.84) (Fig. 1A).

Improvements, as measured in the questionnaire, could be classified as minimal or without change (<25% score reduction), moderate (score reduction between 25% and 50%), or substantial (reduction >50%). The improvement was minimal in 25% of patients, moderate in 31.25%, and substantial in 43.75% of patients.

Regarding biomicroscopic exploration tests, the mean value of the Jones test (Schirmer with anesthesia at 5 minutes) was 4.67 ± 5.14 before treatment and 6.91 ± 6.36 after PRGF treatment. The mean obtained with lissamine green dye according to the van Bijsterveld scale was 3.31 ± 2.96 before treatment and 3.07 ± 2.60 after PRGF treatment.

We found no cases of poor tolerance or undesirable effects that could be attributed to the use of PRGF. Conjunctival samples analysis by impression cytology revealed a mean squamous metaplasia grade of 1.94 ± 0.93 before treatment and 1.19 ± 1.17 after treatment, but this difference was not statistically significant (Fig. 1A). We found that, in general, reduced symptoms reported by patients were associated with a reduction in the grade of squamous metaplasia after PRGF treatment (Fig. 1B), but this association was not statistically significant either. Thus, in 8 of 16 patients

FIGURE 1. Effect of PRGF as a treatment for moderate/severe dry eye. A, Mean ± SD of the degree/grade of symptoms expressed by the patient in the modified SDEQ and of the degree of squamous metaplasia before and after treatment. B, Correlation between symptomatology and squamous metaplasia before and after PRGF treatment.

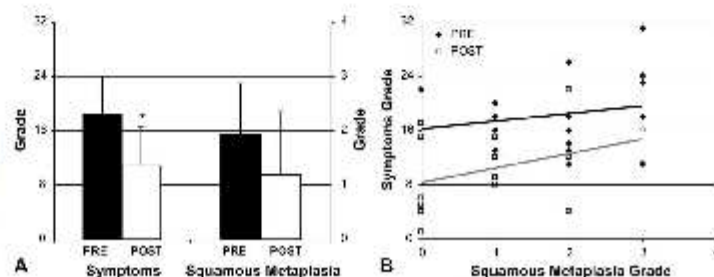
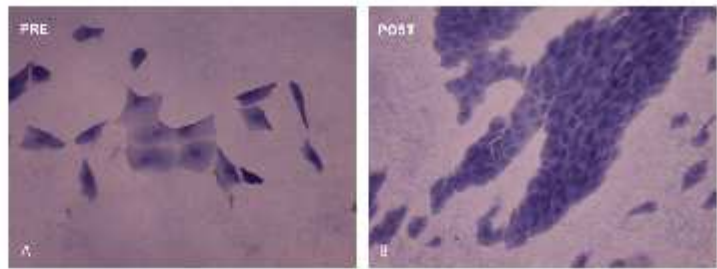


FIGURE 2. Conjunctival impression cytology of a 41-year-old man with non-Sjögren-type aqueous tear-deficient dry eye syndrome plus meibomian gland dysfunction. The improvement expressed in the evaluation of symptoms (from 11 to 1) corresponds with the reduction observed in the degree of squamous metaplasia from 3 (A) to 0 (B) after PRGF treatment.



(50%), symptom reduction was found to be directly proportional to the observed reduction in metaplasia (Table 1). However, in the other 50% of patients, a direct correlation was not found; 3 of the 16 patients had improved symptoms but in the absence of an improvement in metaplasia grade, whereas 5 of the 16 patients reported symptoms that did not correspond with the low grade of metaplasia observed in the impression cytology. In Figures 2 to 4, the 3 situations described are shown.

DISCUSSION

Dry eye is a condition involving a multifactorial alteration of the tear film, leading to an alteration of the ocular surface and the presence of symptoms that may affect visual function and the quality of life of the patient.²⁰ Objective tests that are currently at the disposal of the clinical practitioner frequently do not establish a correlation between damage to the ocular surface and symptoms.^{21–23} Thus, both of these parameters should be kept in mind during the diagnosis and when deciding the optimal therapeutic approach.

Because different types of dry eye often can be associated with the same symptoms, it is necessary to correctly identify the principal etiopathogenic factors involved, to administer the most appropriate treatment. Thus, the use of tear plugs, topical steroids and immunosuppressors, mucolytics, secretagogues, and so on will be more or less appropriate, depending on the nature of each case, but the essence of therapy, common to all cases, will always be the substitution of the defective tear with a product that is as similar as possible to the natural tear. Herein lies the principal

therapeutic limitation; currently, such an ideal substitute for the tear does not exist.

A number of artificial tear-related pharmaceutical products are available (carboxymethylcellulose, hyaluronic acid, polyvinyl alcohol, and so on). Despite the fact that currently these rarely include chemical preservatives, another class of compound known as conservation stabilizers is invariably present, making them potentially toxic for the ocular surface. In addition, tissue growth and repair factors and antimicrobial properties are absent from these artificial tears.²⁴

The principal revolution in the search for a substitute for the natural tear came when Fox et al⁴ reported the application of autologous serum for the treatment of dry eye. Subsequent publications motivated more extensive clinical use of autologous serum as a therapeutic agent for cases of severe or very symptomatic dry eye, as well as for cases of persistent epithelial defects and other pathologies of the ocular surface. These studies demonstrated the superior capacity of autologous serum to maintain the integrity of the corneal and conjunctival epithelial cells, as well as to regenerate the ocular surface, because of its contribution of growth factors, whose presence in these diseases of the ocular surface are very much diminished.

In early 2000, a deeper understanding of platelets as a principal source of the growth factors present in plasma promoted growing interest in the elaboration of autologous blood derivatives, which are rich in platelet factors.^{25–27} In vitro studies demonstrated that the growth of corneal epithelial cells is stimulated more by such blood derivatives than by autologous serum.²⁵ Among the blood derivatives, which

FIGURE 3. Conjunctival impression cytology of a 45-year-old woman with Sjögren type aqueous tear-deficient dry eye syndrome. The metaplasia grade before PRGF treatment was three (A). The improvement expressed in the modified SDEQ (from 24 to 11) did not correlate with the metaplasia grade observed after PRGF treatment (B), which remained fixed around 3.

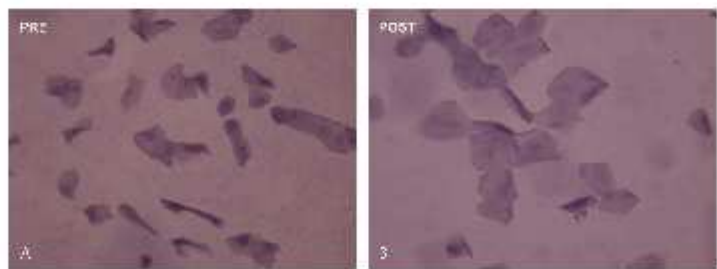
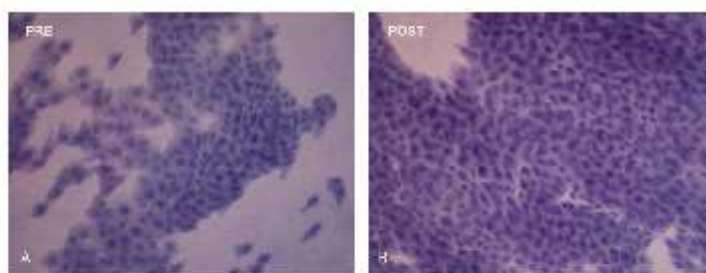


FIGURE 4. Conjunctival impression cytology of a 72-year-old woman with meibomian gland dysfunction. The intensity of symptomatology improved substantially after treatment (22 pretreatment vs. 4 post-treatment), but the metaplasia grade does not correspond with observations because metaplasia is unaltered not only after treatment (B) but also before treatment (A). Thus, the symptomatology expressed by the patient before treatment is not consistent with the images obtained by impression cytology.



include platelet factors, PRGF could be singled out because this plasma is enriched in growth factors, which are liberated from the platelets during the process of preparation of the plasma.¹¹ PRGF is now being successfully applied in multiple fields of regenerative medicine, with maxillofacial surgery and traumatology being the pioneer fields.^{9,10} In light of all this, our group became interested in evaluating the potential application of PRGF for our field of ophthalmology. Thus, we successfully applied PRGF for the treatment of post-laser in situ keratomileusis flap necrosis in 2007.¹² In a subsequent study, we demonstrated its efficacy for the treatment of persistent epithelial defects of different origin.¹³

In the present study, we obtained preliminary results concerning the efficacy of PRGF as a treatment for dry eye. To this end, we studied a group of patients with dry eye of various etiologies in whom previous conventional treatments had not been efficacious. The group of patients, which represents different etiopathological types, comes from the general population. The prevalence of Sjögren-type dry eye syndrome in this group is higher because of the symptom severity and the absence of response of these patients to conventional treatments. Thus, the data that we present here could reasonably be extrapolated to the general population of patients with moderate to severe dry eye who do not respond to conventional treatment.

The results indicate that PRGF is an efficacious therapeutic agent for the treatment of patients who present with moderate to severe dry eye, not only because we observed symptom improvement in the majority of patients but also because in 62.5% of patients the signs of squamous metaplasia after treatment, observed by impression cytology, were absent or very light. The efficacy and good tolerance of PRGF are also corroborated by the fact that patients often request continued use of PRGF.

It is also important to underline the fact that in many cases, PRGF treatment not only leads to symptom improvement and reduced squamous metaplasia but also leads to the reduction of associated therapies, such as topical corticoids and cyclosporine. This is likely because of an indirect reduction of inflammation on reducing tear osmolarity and the dilution of proinflammatory factors, which are present in the ocular surface. It also may be because of the presence in PRGF, as in autologous serum, of potential inhibitors of inflammation, such as the interleukin-1 receptor antagonist and inhibitors of metalloproteinases¹⁰ and other important growth factors, which

are known to participate in corneal reepithelialization, such as epidermal growth factor (Table 2).

The results of this study allow us to conclude that PRGF is an interesting therapeutic alternative for the treatment of moderate to severe dry eye when compared with other commercially available agents. Because experience with the application of this blood derivative accumulates, more specific guidelines regarding the concentrations and treatment protocols will be required. In comparison to other similar plasma derivatives, our results show that PRGF is most enriched in growth factors, thus conferring additional value on this therapeutic proposal.²⁸ However, there are some limitations in the study. In this preliminary study, we included patients with different pathologies. In an ongoing study, we are evaluating the role of topical PRGF in the treatment of the specific types of dry eye.

REFERENCES

- Pflugfelder SC, Solomon A, Stern ME. The diagnosis and management of dry eye: a twenty five year review. *Cornea*. 2000;19:644-649.
- Theng SC, Teubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*. 1997;124:825-835.
- 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.
- Teubota 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.
- Poon AC, Geerling G, Dart JK. Autologous serum eye drops for dry eye and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol*. 2001;85:1188-1197.
- Tanavuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea*. 2001;20:802-806.
- Kojima T, Ishida R, Dogru M, et al. The effect of autologous serum eye drops in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *Am J Ophthalmol*. 2005;139:242-246.
- 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, Andia I, Ardagna B, et al. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004;91:4-15.
- Anitua E, Andia 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 Orthop Res*. 2005;23:281-286.

12. Rocha G, Acera A, Durán JA. Laser in situ keratomileusis flap necrosis after trigeminal nerve palsy. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:1423-1425.
13. López-Pandolfi S, Morales MC, Freire V, et al. Plasma rich in growth factors (PRGF) as a therapeutic agent for severe persistent corneal epithelial defects. *Cornea*. 2010;29:843-848.
14. García-Catalán MR, Jerez-Olivera E, Benítez del Castillo JM. Dry eye and quality of life. *Arch Soc Esp Ophthalmol*. 2009;34:451-458.
15. Begley CG, Caffery B, Chalmsen RL, et al. Use of the dry eye questionnaire to measure symptoms of ocular irritation in patients with aqueous tear deficient dry eye. *Cornea*. 2002;21:664-670.
16. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol*. 1969;82:10-14.
17. Rivas L. Diagnosis through other assays. In: Murube J, Rolando M, eds. *Dry Eye: A Systematic Approach to Therapy*. Ciba Vision. Ocular Surface Diseases Study Group; 1999:101-114.
18. Orom MA. *Estudio Inmunohistoquímico y Morfológico En ojos de Pacientes con Síndrome de Sjögren* [doctoral thesis]. Madrid, Spain: Complutense University; 2000.
19. Murube J. Clasificación clínica del ojo seco. In: Murube J, ed. *Ojo Seco-Dry Eye*. Madrid, Spain: Teosimedia Editorial; 1997:39-44.
20. Lemp MA. The definition and classification of dry eye disease: report of the definition and classification subcommittee of the international dry eye workshop. *Ocul Surf*. 2007;5:75-92.
21. Pflugfelder S, Tseng S, Sanabria O. Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. *Cornea*. 1998;17:38-56.
22. Schein O, Tiesch J, Muñoz B. Relationship between signs and symptoms of dry eye in the elderly. A population-based perspective. *Ophthalmology*. 1997;104:1395-1401.
23. Tomlinson A, Thai I, Doane M. Reliability of measurements of tear physiology. *Adv Exp Med Biol*. 2002;506:1097-1105.
24. Adams J, Wilcox M, Tavendale M. Morphologic and physiologic effects of artificial tear formulations on corneal epithelial derived cells. *Cornea*. 1992;11:234-241.
25. Harwig D, Harhoff S, Liu I, et al. Epithelotropic 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.
26. Aijo JL, Colecha JR, Pastor S, et al. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res*. 2007;39:124-129.
27. 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.
28. Durán JA, López-Pandolfi S, Freire V, et al. Characterization of different plasma-derived preparations used as corneal reepithelization inductors. Poster presented at: ARVO Annual Meeting May 3-7, 2009, Fort Lauderdale, FL.

8. BIBLIOGRAFÍA

NOTAS

- 1 Marx RE, Carlson ER et al. Platelet-rich plasma: Growth Factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Maxillofac Surg* 1998;85(6):638-46.
- 2 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.
- 3 Tischler M. Platelet rich plasma. The use of autologous growth factors to enhance bone and soft tissue grafts. *N Y State Dent J* 2003;68:22-4.
- 4 Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp L. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review: *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003;18:93-103.
- 5 Anitua E, Andía I, Ardanza B. Autologous platelets as a source of protein for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4-15.
- 6 Harrison P, et al. Platelet alpha-granules. *Blood Rev* 1993;7(1):52-62.
- 7 George JN. Platelets. *Lancet* 2000;29;355:1531-39.
- 8 Rendu F et al. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001;12(5):261-73.
- 9 Marx RE. Platelet rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;91:4-15.
- 10 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.
- 11 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;55:1294-5.
- 12 Man D, Plosker H., Winland-Brown JE. The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 2001;107(1):229-37.
- 13 Ehrenfest DM, Bielecki T, Sammartino G, et al. 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;95:1280-2.
- 14 Dohan DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* 2009;27:158-67.
- 15 Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, Vaccaro F, et al. Platelet-rich plasma intraarticular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: single- versus double-spinning approach. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012;20(10):2082-91.
- 16 Anitua E. Un enfoque biológico a la Implantología, Editado por Team Work Media. 2008; Capítulo 3:57-66.
- 17 Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales C. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(9):5571-8.
- 18 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. *I J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(1):118-23.
- 19 Anitua E The use of plasma-rich growth factors (PRGF) in oral surgery. *Pract Proced Aesthet Dent.* 2001 Aug;13(6):487-93.
- 20 Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, 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 Feb;84(2):415-21.

-
- 21 Sánchez M, Anitua E, Orive G, Mujika I, Andia I. Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* 2009;39(5):345-54.
 - 22 Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Andía I, Padilla S. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*. 2007 Feb;35(2):245-51.
 - 23 Sánchez M, Anitua E, Azofra J, Aguirre JJ, Andia I. Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin Exp Rheumatol*. 2008 Sep-Oct;26(5):910-3
 - 24 Mandel, M.A. Minimal suture blepharoplasty: closure of incisions with autologous fibrin glue. *Aesthetic Plast Surg* 1992;16:269.
 - 25 Tayapongsak P, O'Brien D, Monteiro C. Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *J Oral Maxillofac Surg* 1994;52:161-6.
 - 26 Assoain R, Grotendost G, Muller D, et all. Celular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature* 1984;509:804-16.
 - 27 Antoniadis H, Galanopoulos T, Neville-Golden J. Expression of growth factor and receptor mRNA in skin epithelial cells following acute cutaneous injury. *Am J Pathol* 1993;142:1099-110.
 - 28 Brewer DB. Max Schultza(1865), G.Bizzozero(1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol* 2006;133(3):251-8.
 - 29 Lennox A. Alfred Francois Donne(1801-1878), discoverer of *Trichomonas Vaginalis* and of leukaemia. *Br J Vener Dis* 1974;50:377-380.
 - 30 Izaguirre Ávila. Historia de la Medicina: el descubrimiento de las plaquetas. *Rev Biomed*1997;8:197-208
 - 31 Martínez-Carpio P. El factor de crecimiento epidérmico 40 años después de su descubrimiento: de la bioquímica a la clínica. *Endocrinol nutr* 2003;50(8):334-44.
 - 32 Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, Forrellat-Barríos M. Espectro funcional de las plaquetas: de la hemostasia a la medicina regenerativa. *Rev Cubana Hematol Inmunol hemoter* 2012;28(3):200-216.
 - 33 Monteiro MC, O'Connor J.E, Martínez M. La citometría de flujo en el análisis funcional de las plaquetas: (I) Aspectos estructurales y funcionales de las plaquetas. *Rev Diagn Biol* 2001;50(3): 111-136.
 - 34 Alan D Michelson. *Platelets* 2nd Edition, Capitulo 15: Platelet Secretion: 309-18.
 - 35 Eppley B, Pietrzak W, Blanton M. Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery. *Plastic Reconstr Surg* 118:147-159.
 - 36 Fu-Shin X, Jia Yin K, Huang J. Growth factors and corneal epithelial wound healing. *Brain Res Bull* 2010; 81(2-3): 229-35.
 - 37 Anitua E, Andia I, Ardanza B. Autologous plateletes as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 2004;91:4.
 - 38 Martinez J, Cano T, Gonzalo J et al. Do ambulatory use Platelet-rich Plasma(PRP) concentrates present risks? *Med Oral* 2002;7: 375-90.
 - 39 Anitua E, Sánchez M. Un nuevo enfoque biológico de la cirugía ortopédica y la medicina del deporte. 2012:60-62.
 - 40 Anitua E, Alonso R, Girbau C, et al. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) against *Staphilococcus Aureus* and *Staphilococcus Epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol* 2012;37(6):652-7.
 - 41 Anitua E, Andía I, Sánchez M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendón cells in cultura. *J Orthop Res* 2005;23:281-6.
-

-
- 42 Anitua E, Sánchez M, Nurden A, et al. Reciprocal actions of platelet secreted TGF- β 1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:950-9.
 - 43 Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, et al. Platelet-released growth factors enhance the secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by sinovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology* 2007;46:1769-72.
 - 44 Anitua E, Sánchez M, Zalduendo M, et al. Fibroblastic response to treatment with three different preparations rich in growth factors. *Cell Prolif* 2009;42:162-70.
 - 45 Anitua E, Sánchez M, de la Fuente M. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and sinovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012;20(9):1657-65.
 - 46 Anitua E, Andía I. Valoración de la regeneración ósea en un modelo animal: utilización del plasma rico en factores de crecimiento (PRGF). *Gaceta Dental* 2001;123:50-3.
 - 47 Alissa R, Esposito M, et al. The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomized clinical trial. *Eur J Oral Implantol* 2010;3:121-134.
 - 48 Rutkowski JL, Johnson DA, et al. Platelet rich plasma to facilitate wound healing following tooth extraction. *J Oral Implantol* 2010;36:11-23.
 - 49 Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Zalduendo M, et al. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A* 2006;77: 285-93.
 - 50 Kajikawa Y, Morihara t, Sakamoto H, et al. Platelet rich plasma enhances the initial mobilization of circulation-derived cells for tendon healing. *J Cell Physiol* 2008;215:837-45.
 - 51 Sánchez M, et al. Ligamentization of tendon grafts treated with an endogenous preparation rich in growth factors: gross morphology and histology. *Journal Arthroscopy* 2010;26(4):470-80.
 - 52 Sánchez M, Anitua E, Guadilla J, Prado R, et al. Autologous PRGF in the ovine ACL-transected knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage* 2008;16:S44.
 - 53 Beca T, Hernandez G, et al. Plasma rico en plaquetas. Una revisión bibliográfica. *Av Periodon Implantol* 2007;19(1):39-52.
 - 54 Setubal M, Freitas C, Neves C, et al. Evaluation of factors that can modify platelet-rich plasma properties. *Oral Surg Oral Med oral Pathol oral Radiol Endod* 2008;105:5-12.
 - 55 Carrasco J, Bonete D, Gomar F. Plasma Rico en Plaquetas versus Plasma rico en factores de crecimiento. *Rev Esp Cir Osteoart* 2009; 239:127-140.
 - 56 Eppley B, Piertzak W, Blanton M. Platelet-Rich Plasma: A Review of Biology and Applications in Plastic Surgery. *Plast Reconstr Surg* 2006;118(6):147-159.
 - 57 Prakash S, Thakur A. Platelet Concentrates: Past, Present and Future. *J Maxillofac Oral Surg* 2011;10(1):45-9.
 - 58 Alió J, Pastor S, Colecha J, et al. Treatment of Ocular Surface síndrome after Lasik with Autologous Platelet-rich Plasma. *J Refract Surg* 2007;23:617-19.
 - 59 Alió J, Colecha J, Pastor S, et al. Symptomatic Dry Eye Treatment with Autologous Platelet-Rich Plasma. *Ophthalmic Res* 2007;39:124-129.
 - 60 Weibrich G, Kleis W, Hitzler W. Growth Factor Levels in the platelet-rich plasma produced by 2 different methods: curasan type PRP kit versus PCCS PRP system. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2002;17(2):184-90.
 - 61 Durán JA, Freire V, Morales C, et al. Characterisation of different plasma-derived preparations used as corneal reepithelialization inductors. *ARVO* 2009. Epub. Abstract.
 - 62 Dragoo J, et al. Comparison of the acute inflammatory response of two commercial platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med* 2012;40(6):1274-81.
-

-
- 63 Fox R, Chan R, Michelson P, et al. beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Reu* 1984;27:459-61.
 - 64 Tsubota K, Goto E, Shimura S, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's Syndrome, *br J Ophthalmol* 1999;83:390-5.
 - 65 Tannanuvant N, Daniell M, McKelvie P, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients. *Cornea* 2011;20:802-6.
 - 66 Poon Ac, Geerling G, Dart JK. Autologous serum eyedrops for dry eye and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1188-97.
 - 67 Harloff S, et al. Epitheliotropic capacity of serum eye drops from healthy donors versus serum from immunosuppressed patients with rheumatoid arthritis. *Klin Monbl Augenheilkd* 2008; 225(3): 200-6.
 - 68 Liu L, Hartwig D, Harloff S, et al. An optimized protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:706-14.
 - 69 Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88:1467-74.
 - 70 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;44:1724-31.
 - 71 Rocha G, Acera A, Durán JA. Laser in situ keratomileusis flap necrosis after trigeminal nerve palsy. *Arch Ophthalmol* 2007;125:1423-5.
 - 72 López-Plandolit S, Morales C, Durán JA, et al. Efficacy of Plasma Rich in Growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea* 2011;30:1312-17.
 - 73 López García JS, Murube J. Suero autólogo y derivados hemáticos en Oftalmología. Ponencia SEO 2011(capítulo 11): 135-41.
 - 74 Anitua E, Sánchez M, Sarabia JJ, et al. Eficacia y seguridad del PRGF en la regeneración cutánea facial. Ensayo clínico, randomizado y controlado con ácido hialurónico. *Revista de la AECEP* 2010;12:23-33.
 - 75 López-Plandolit S, Morales C, Durán JA. Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) as a therapeutic agent for severe persistent epithelial defects. *Cornea* 2010; 29: 843-8.
 - 76 Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth Factors: Importance in Wound Healing and Maintenance of Transparency of the Cornea. *Progr Ret Eye Res* 2000;19(1):113-129.
 - 77 Klenker B, Sheardown H. Growth Factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* 2004;79:677-688.
 - 78 Yu F, Keping J, Huang J. Growth Factors and corneal epithelial wound healing. *Brain res Bull* 2010;81(2-3):229-235.
 - 79 Pastor JC, Calonge M. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea* 1992;11(4):311-14.
 - 80 Tsubota K, Goto E, Shimmura S et al. Treatment of persistent epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999;106:1984-9.
 - 81 Alvarado M, Martínez J, Borrás J, et al. Tratamiento de defectos epiteliales persistente mediante suero autólogo. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004;79:537-42.
 - 82 López García JS, García Lozano I, Rivas L, et al. Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología. *Ach Soc Esp Oftalmol* 2007;82:9-20.
 - 83 Krachmer, Mannis, Holland. Chapter 10: pathogenesis of sterile corneal erosions and ulcerations. *Cornea. Fundamentals, diagnosis and management 2nd Edition* 2005: 151-63.
 - 84 Tervo et al. Plasminogen activator and its inhibition in the experimental corneal wound. *Exp eye Res* 1989;48:445-9.
-

-
- 85 Berman M. The pathogenesis of corneal epithelial defects. *Acta Ophthalmol* 1989;192:55-64.
 - 86 De Roth A. Plastic repair of conjunctival defects with fetal membrane. *Arch Ophthalmol* 1940; 23:522-25.
 - 87 Kruse F, Rohrschneider K, Volcker H. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106: 1504-10.
 - 88 Nishida T, Ohashi Y, Awata T, et al. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1046-8.
 - 89 Gordon JF, Johnson P, Musch DC, et al. Topical fibronectin ophthalmic solution in the treatment of persistent epithelial defects in the corneal epithelium. *Am J Ophthalmol* 1995;119:281-7.
 - 90 Unterlauff JD, Kohlhaas M, Hofbauer I, Kasper K, Geerling G. Albumin eye drops for treatment of ocular surface diseases. *Ophthalmology* 2009;106(10):932-7.
 - 91 Murali S, Hardten DR, De Martelaere S, et al. Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Curr Eye Res* 1994;13:857-62.
 - 92 Brown S, Lamberts D, Reid T. Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and IGF-1. *Arch Ophthalmol* 1997; 115:926-7.
 - 93 Nakamura M, Kawahara M, Nakata K, et al. Restoration of corneal epithelial barrier function and wound healing by substance P and IGF-2 in rats with capsaicin-induced neurotrophic keratopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 2937- 40.
 - 94 Bonini S, Lambiase A, Rama P. Topical treatment with nerve growth factor for neurotrophic keratitis. *Ophthalmology* 2000;107:1347-52.
 - 95 Vajpayee RB, Mukerji N, Tandon R, et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent epithelial defects. *Br J Ophthalmol* 2003;87:1312-6.
 - 96 Alió J, Abad M, Artola A, et al. Use of autologous platelet rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* 2007;114:1286-93.
 - 97 DEWS Definición y clasificación de la Enfermedad del ojo seco: Informe del Subcomité de definición y clasificación del Taller Internacional sobre ojo seco. *Ocul Surf* 2007;5(2):76-95.
 - 98 Viso E, Gude F, Rodriguez-Ares M. The association of meibomian gland dysfunction and other common ocular diseases with dry eye: a population-based study in Spain. *Cornea* 2011;30:1-6.
 - 99 Han S, Hyon J, Woo S, et al. Prevalence of dry eye disease in elderly Korean population. *Arch Ophthalmol* 2011;129(5):633-8.
 - 100 Fuentes-Páez G, Herreras J, Cordero Y, et al. Lack of concordance between dry eye syndrome questionnaires and diagnostic tests. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2011;86(1):3-7.
 - 101 Morales Fernández L, et al. Clinical-histological correlation in patients with dry eye. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2010;85:239-45.
 - 102 Schein OD, Muñoz B, tielsch JM, et al. Prevalence of dry eye among elderly people. *Am J Ophthalmol* 1997;124:723-8.
 - 103 McCarty C, Bansal AK, et al. *Ophthalmology* 1998;105:114-9.
 - 104 McMonnies CW, Ho A. Responses to a dry eye questionnaire from a normal population. *J Am Optom Assoc* 1987;58:588-91.
 - 105 DEWS Manejo y tratamiento de la enfermedad de ojo seco: Informe del Subcomité para el manejo y tratamiento del Taller Internacional sobre ojo seco. *Ocul Surf* 2007;5(2):163-78.
 - 106 Noda-Tsuruya T, Asano-Kato N, Toda I, Tsubota K Autologous serum eyedrops for dry eye after LASIK. *J Refract Surg.* 2006;22(1):61-6.
 - 107 Kojima T, Higuchi A, Goto E, Matsumoto Y, Dogru M, Tsubota K. Autologous serum eye drops for the treatment of dry eye diseases. *Cornea.* 2008;27(1):25-30.
-

-
- 108 Srinivasan S, Joyce E, Jones LW. Tear osmolality and ferning patterns in postmenopausal women. *Optom Vis Sci.* 2007 Jul;84(7):588-92.
 - 109 Rodriguez Torres LA, Porrás- Machado DJ, Villegas Guzmán AE, et al. Relación de índice de enfermedad de la superficie ocular con pruebas objetivas y tratamiento del ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2010; 85(2): 70-75.
 - 110 Shigeru MD, Saki BS, Kazuhide MS, et al. Rebamipide (OPC-2759) in the treatment of dry eye: a randomized double-masked multicenter placebo controlled- Phase II study. *Ophthalmology* 2012; 119:2471-8.
 - 111 Rivas L. Diagnosis through other assays. In: Murube J, Rolando M, eds. *Dry Eye: A Systematic Approach to Therapy*. Ciba Vision. Ocular Surface Diseases-Study Group;1999:101-114.
 - 112 Oroza MA. Estudio Inmunohistoquímico y Morfológico en ojos de pacientes con Síndrome de Sjögren. Tesis Doctoral. Universidad Complutense. Madrid (España).
 - 113 Murube J. Clasificación clínica del ojo seco. *Ojo Seco- Dry Eye*. Madrid (España): Tecnimedia Editorial;1997;39-44.
 - 114 Juhan-Vague I, Vague P. Interrelations between carbohydrates, lipids, and the hemostatic system in relation to the risk of thrombotic and cardiovascular disease. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163:313-315.
 - 115 Wang W, Zhang H, Gao G, et al. Adiponectin inhibits hyperlipidemia-induced platelet aggregation via attenuating oxidative/nitrate stress. *Physiol Res* 2011; 60:347-354.
 - 116 Eckel Rh, Barouch W, Ershow A. Report of the National Heart, Lung and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation* 2002;105:2923-2928.
 - 117 Anitua E, Sanchez M, Merayo-LLoves 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 onhibits and reverts TGF- β 1-induced myodifferentiation. *IOVS* 2011; 52(9):6066-73.
 - 118 Jeng BH, Dupps WJ. Autologous serum 50% eyedrops in the treatment of persistent corneal epithelial defects. *Cornea* 2009; 28: 1104-8.
 - 119 Watson S, Secker g, Daniels J. The effect of therapeutic human serum drops on corneal stromal wound healing activity. *Current Eye Res* 2008; 33: 641-52.
 - 120 Jover Botella A, Márquez Peiró JF, Márques K et al. Effectiveness of 100% autologous serum drops in ocular surface disorders. *Farm Hosp.* 2011;35(1):8-13.
 - 121 López García JS, Murube J. Suero autólogo y derivados hemáticos en Oftalmología. Ponencia SEO 2011(capítulo 14): 167-81.
 - 122 Mc Elhiney L. Compound guide for ophthalmic preparation. American Association 2013.
 - 123 Lemp M, Crews L, Bron A et al. Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study. *Cornea* 2012;31(5):472-8.
 - 124 Schmidl D, Witwoska K, Kaya S et al. The association between subjective and objective parameters for the assessment of dry-eye syndrome. *Invest Ophthlmlol Vis Sci* 2015;56:1467-72.
 - 125 Anitua E, Muruzabal F, Alcalde I y cols. Plasma rich in growth factors(PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Experimental Eye Research* 2013;115:153-161.
 - 126 Liu L, Hartwig D, Harloff S et al. Corneal epitheliotrophic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 2438-44.
 - 127 Christensen M, Cohen S, Rinehart J et al. Clinical evaluation of an HP-Guar gellable lubricant eyedrop for the relief of the dryness of the eye. *Curr Eye Res* 2004;28:55-62.
-

-
- 128 Versura P, Malatrello M, Stecher F, et al. Dry eye before and after therapy with hydroxipropylmethylcellulose. *Ophtalmology* 1989;198: 152-62.
 - 129 Nelson JD, Farris R. Sodium hyaluronate and polyvinyl alcohol artificial tear preparations: a comparison in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:484-7.
 - 130 Houakimyion M et al. Evaluation of protective effects of threalose on desiccation of epithelial cells in three dimensional reconstructed human corneal epithelium. *Curr Eye Res* 2012;37 (11):982-969.
 - 131 Marsh P, Pflugfelder S. Topical nonpreserved methylprednisolone therapy for keratoconjunctivitis sicca in Sjogren Syndroem. *Ophtalmology* 1999:106:811-6.
 - 132 Sall K, Stevenson O, Mundorf T. Two multicenter, randomized studies of the efficacy and safety of cyclosporine ophthalmic solution in moderate to sever dry eye disease. *Ophtalmology* 2000;107:631-9.
 - 133 Sheppard J, McClellan R, Weikert M, et al. Long – term supplementation with N-6 and N-3 PUFAS improves moderate to severe keratoconjunctivitis sicca: a randomized double- blind clinical trial. *Cornea* 2013;32:1297-1304.
 - 134 Aronowicz J, Shine W, oral D, et al. Short term oral minocycline treatment of meibomianitis. *Br J Ophtalmol* 2006;90:856-62.
 - 135 Sainz de la Maza M, Castevilli S, Kabbani o. Nonpreserved topical steroids and punctal occlusion for severe keratoconjunctivitis sicca. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2000;75:751-56.
 - 136 Pappas A, Sherrer Y, Charney M, et al. Succesful treatment of dry mouth and dry eye symptoms in Sjögren´s syndrome patients: a randomized, placebo-controlled, dose-adjustment study. *J Clin Rheumatol* 2004;4:169-77.
 - 137 Geerling D, Maclennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophtalmol* 2004;88:1467-74.
 - 138 Lemp M, Crews L, Brown A, et al. Distribution of aqueous-deficient and evaporative dry eye in a clinic-based patient cohort: a retrospective study. *Cornea* 2012; 31(5): 472-8.
 - 139 Noble B, Loh R, macLennan S et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomized crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 647-52.
 - 140 Kojima T, Ishida R, Dogru M. The effect of autologous serum in the treatment of severe dry eye disease: a prospective randomized case-control study. *AM J Ophtalmol* 2005:139:242-246.
 - 141 Urzua CA, Vasquez D, Huidobro A, et al. Randomized double-blind trial of autologous serum versus artificial tears in dry eye síndrome. *Curr Eye Res* 2012;37:684-688.
 - 142 Celebi A, Ulusay C, Mirza G, et al. The efficacy of autologous serum eye drops for severe dry eye síndrome: a randomized doublé-bliond crossover study. *Graefes Arch Clin Exp Ophtalmol* 2014;25: 619-26.
 - 143 Hussain M, Sthein R, Sugra A, et al. Long-term use of autologous serum 50% eye drops for the treatment of dry eye disease. *Cornea* 2014; 33:1245-51.
 - 144 Pezzota S, Del fante C, Scudeller L y cols. Autologous platelet lysate for treatment of refractory ocular GVHD. *Bone Marrow transplant* 2012;47: 1558-63.
 - 145 Higuchi A, Ueno R, Shimmura et al. Albumin rescues ocular epithelial cells from cell death in dry eye. *Curr Eye Res* 2007;32:83-8.
 - 146 Stenwall P, Bergström M, Seiron P et al. Improving the antiinflammatory effect of serum eye drops using allogenic serum permissive for regulatory T cell induction. *Acta Ophtalmologica* 2015;6: 1-4.
 - 147 Hwang J, Chung S, Jeon S et al. Comparison of clinical efficacies of autologous serum eye drops in patients with primary and secondary Sjögren Syndrome. *Cornea* 2014; 33:663-7.
-

-
- 148 Tripathi B, Kwait P, Tripathi R. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea* 1990; 9: 2-9.
 - 149 Pastor J, Calonge M. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea* 1992; 11: 311-14.
 - 150 Yamada N, Matsuda R, Morishige N et al. Open clinical study of eyedrops 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.
 - 151 Alio J, Rodriguez A, Martinez L et al. Autologous fibrin membrane combined with solid Platelet-Rich Plasma in the management of perforated corneal ulcers. *Jama Ophthalmol* 2013; 131: 745-51.
 - 152 Kim K, Shin Y, Kim H. Effect of autologous platelet- rich plasma on persistent corneal epithelial defect after infectious keratitis. *Jpn J Ophthalmol* 2012; 56: 544- 50.
 - 153 Welder JD, Bakhtiari P, Djalilian A. Limbitis secondary to autologous serum eye drops in a patient with atopic keratoconjunctivitis. *Case reports in Ophthalmol Med* 2011;576521,1-3
 - 154 Mavrakanas N . Autologous serum application in the treatment of Mooren's Ulcer. *Klin Monbl Augenheilkd* 2007; 224:300-2.
 - 155 Anitua E, Muruzabal F, De la Fuente. Effects of heat-treatment on plasma rich in growth factors-derived autologous eye drop. *Exp Eye Res* 2014; 119:27-34.