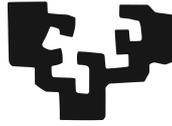


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGIA
Departamento de Biología Celular e Histología

TESIS DOCTORAL

MECANISMOS CELULARES DE LA REGENERACIÓN DEL DEFECTO EPITELIAL CORNEAL TRATADO CON SUERO DERIVADO DE PLASMA RICO EN FACTORES DE CRECIMIENTO (s-PRGF) EN SOLITARIO Y COMBINADO

Jaime Echevarria Ecenarro

Leioa, 2018

Este estudio ha sido realizado gracias a los proyectos Universidad/Sociedad entre Universidad del País Vasco/Instituto Clínico Quirúrgico de Oftalmología (US11/24), Universidad del País Vasco (UF111/44), del programa Saiotek del Gobierno Vasco (S-PE12UN128) y Fundación Mutua Madrilleña (FMM11/02).

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Empecé esta tesis con mucho ánimo y motivación como un reto que completara mi formación. Vengo de una familia en la que siempre se ha dado gran importancia a la investigación básica y yo, médico, pobre de mí, tenía esa faceta de mi vida profesional apenas sin desarrollar y la tesis era una espina que tenía clavada. Y como dicen que el hombre empieza a ser viejo cuando deja de querer aprender, me animé con ella.

Tenía (y tengo) muchísimas ideas sobre las que investigar, pero si algo me ha mostrado esta tesis es que para hacer una buena investigación “traslacional” es necesario un grupo multidisciplinar y mucho tiempo para dedicarse a ello, aparte de financiación. Dicen que la Medicina debe ser una profesión vocacional. Ni qué decir que el investigador básico debe serlo aun más si cabe, teniendo en cuenta el, cada vez menor, apoyo que tiene por parte de las instituciones.

Esta tesis, además, me ha enseñado a ser muy crítico y práctico en mi profesión. Considero que la faceta investigadora enriquece enormemente a los profesionales médicos clínicos, que debería ser una obligación en nuestra formación ya que aporta una rigurosidad que las casas comerciales se encargan de reducir con diferentes estrategias como la novedad, los factores de confusión, etc. en un intento de aumentar sus ventas bajo el paraguas de la información sesgada. Y por desgracia, frecuentemente lo consiguen al encontrarse con un sector médico con un porcentaje alto de personas muy “fascinable” y con poca formación en investigación y lectura crítica, por no decir con, frecuentemente, falta de ética ante evidentes conflictos de intereses.

Tengo tanta gente en la cabeza que, de un modo u otro, han influido en que pueda haber completado esta tesis que no sé por dónde empezar este apartado.

No voy a negar que el *alma mater* de esta tesis ha sido mi amiga y directora, Noelia Andollo. Si no fuera por su entusiasmo, su paciencia conmigo, su empeño, sus ánimos, su rigurosidad en el trabajo, el tiempo dedicado, esta tesis nunca habría visto la luz. Como maestra me deja una gran influencia. Por ello, le estoy y estaré siempre agradecido.

Simultanear un trabajo de experimentación básica y en modelo animal a la vez que uno trabaja en un hospital, en una consulta y tiene una familia numerosa corre el peligro de hacerlo todo mal. Y no niego que a veces que el tema me ha superado. Ha habido muchos momentos en que la tesis ha sido una losa en mi día a día y, muy posiblemente, haya descuidado ciertas obligaciones familiares y/o profesionales. No puedo dejar de agradecer a mi mujer Teresa, a mis hijos Jaime, Lucía y Miguel, por apoyarme en todo momento, y por

comprender que muchas veces no he podido dedicarles todo el tiempo que me hubiera gustado, ¡espero poder devolvérselo! Y confío poder ser un buen ejemplo para vosotros.

En este contexto, tampoco quiero dejar de agradecer a mi Jefa de Servicio, Nerea Martínez Alday, el haberme facilitado y apoyado en la realización de esta tesis en todo momento.

También tengo que dar las gracias a mis compañeros del Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario Cruces, siempre dándome ánimos en esos cafés de primera hora de la mañana intentando motivarme para que siguiera. No quiero dejar pasar la oportunidad para, en especial, agradecer sus “coberturas” a Raquel Feijóo, Alaitz Santamaria, José Antonio Sánchez y residentes que han rotado conmigo durante estos años.

Asimismo, han sido importantes en la motivación de esta tesis compañeros de profesión con los que no he estado en contacto estrecho en el desarrollo de la misma, pero que emocionalmente han sido muy importantes para que esta tesis acabe siendo una realidad. Iñaki Rodríguez Agirretxe ocupa un lugar destacado en este apartado. Compañero de residencia (¡qué gran época!), buen amigo, persona de una capacidad de trabajo encomiable, inspirador de muchas de mis inquietudes oftalmológicas y sobre todo, de un trato humano exquisito. No puedo olvidarme de personas como Sergio Pinar, otro espejo en el que reflejarse a nivel emocional e intelectual; Joseba Artaraz, admirado compañero de trabajo por su rigor intelectual, siempre compatible con su afabilidad, un ejemplo para mí; José Ignacio Recalde, otra persona inspiradora en mí por su optimismo y capacidad de ilusionarse; Arantxa Acera, siempre dispuesta a ayudarme en lo que necesitara y dándome ánimos; Juan Durán, quien me inició en el placer del conocimiento por la Córnea, me promocionó y facilitó el acceso al departamento de Biología Celular e Histología para realizar esta tesis.

Un lugar destacado en este apartado de agradecimientos lo tiene Vanesa Freire, con la que tuve el placer de trabajar en el laboratorio. Su capacidad de trabajo, su sempiterna sonrisa, su buen humor, su humildad, su capacidad de sacrificio, su buen hacer y su generosidad son un ejemplo y han hecho que todo haya sido mucho más fácil. Y como no, Celia Morales, directora de tesis de Vanesa, a la que nunca podré agradecer lo suficiente las horas de su tiempo que ha dedicado a afinar diseños, técnicas y resultados.

También quiero agradecer a Sara Sanz y Carlota Suárez, estudiantes Trabajo Fin de Master en el laboratorio su inestimable ayuda en la experimentación; a Juan Bilbao y Arantza Urkaregi, por su ayuda desinteresada en el análisis estadístico.; a Marta Vicario y Rocío Herrero por facilitarnos el bioadhesivo y enseñarnos la puesta a punto del mismo.

Tampoco me puedo dejar sin mencionar a mis amigos de cuadrilla de Gernika, de Bilbao y de Mundaka, a los que tengo que dar las gracias por todos los ánimos que me han dado, sobre todo en esta última etapa que ha sido la más dura. Y también a mis compañeros de profesión a nivel nacional con los que, aparte de cervezas y buenísimos ratos en los

congresos, comparto la inquietud por la mejora en el tratamiento de los pacientes. Corro el peligro de dejarme alguno en el tintero por lo que no daré nombres, pero ellos saben quienes son y de mi aprecio y agradecimiento.

Por supuesto quiero agradecer muy particularmente a mis hermanos, cuñados y sobrinos, que siguen siendo una parte esencial de mi vida, por vuestros ánimos para poder acabar con esta tesis y por vuestro ejemplo, en el que, sabéis, me miro con frecuencia. Con ellos, mejor que en nadie, toma sentido la frase de Willian A. Ward *“The mediocre teacher tells, the good teacher explains, the superior teacher demonstrates, the great teacher inspires”*. Y como decía Gustav Mahler, cita que gustará especialmente a uno de ellos, “No hay más que una educación y es el ejemplo”.

Reservo para el final a mis padres, a quienes dedico esta tesis, que siempre me apoyaron para que siguiera formándome, por estar siempre disponibles y por haberme dado las herramientas emocionales e intelectuales con las que me manejo hoy en día. “Nunca consideres el estudio como una obligación sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber “. Es una frase de Einstein pero perfectamente podría haberla pronunciado mi padre. Seguro que están orgullosos de la tesis de su hijo pequeño.

Finalmente, gracias a los voluntarios y voluntarias que altruistamente han donado su sangre para poder llevar a cabo los experimentos con hemoderivados humanos. Y gracias al apoyo técnico del equipo del animalario de la UPV/EHU por el cuidado que dieron a los conejos del estudio y al personal de Servicios de Microscopía (SGIker).

Gracias a todos ellos, esta tesis ve la luz... ¡por fin!

ABREVIATURAS

A: absorbancia.

AS: *Autologous serum*. Suero autólogo.

BSA: *Bovine Serum Albumin*. Albúmina de suero bovino.

CCL: *Chemokine (C-C motif) ligand*.

CEBA: Comité Ética de Bienestar Animal.

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

CK: citoqueratina.

Ctrl: Control.

Cx: Conexina.

CXCL: *Chemokine (C-X-C motif) ligand*.

DAPI: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole dihydrochloride*. 4',6-diamino-2-fenilindol.

DEP: Defecto Epitelial Persistente.

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

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

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

FBS: Fetal Bovine Serum Suero bovino fetal .

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

G-CSF: *Granulocyte colony-stimulating factor*. Factor estimulante de colonias granulocíticas.

GM-CSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Factor estimulante de colonias de granulocito y macrófagos

H-E: Hematoxilina-Eosina.

h: horas.

HaNa: ácido hialurónico.

HBSS: *Hanks Balanced Salt Solution*.

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

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

ICAM-1: *Intercellular Adhesion Molecule-1*.

Ig: inmunoglobulina.

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

IL: Interleucina.

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

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

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

LASIK: *Laser Assisted in Situ Keratomileusis*.

MAPK: *mitogen-activated protein-kinasa*.

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

MTT: metiltiazolildifenil-tetrazolio bromuro.

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

NF- κ B: *Nuclear Factor- κ B*. Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

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

OCS: *Open Canalicular System*.

OCT compound: *Optimum Cutting Temperature*.

OD: *Optical density*. Densidad óptica.

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

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

p: probabilidad (nivel de significación estadístico).

PAF: paraformaldehído.

PAI: *Plasminogen Activator Inhibitor*.

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

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

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

PDWHF: *Platelet-Derived Wound Healing Factor*.

PECAM: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*.

PES: polietersulfona.

PKC- α : Protein Kinasa C- subunidad α .

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

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

PRK: *Photorefractive Keratectomy*. Queratectomía fotorrefractiva.

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

RANTES: *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*.

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

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

SBF: Suero bovino fetal.

SD: *Standard deviation*. Desviación estándar.

α -SMA: *Smooth Muscle Actin*. Subunidad α de la actina de músculo liso.

SNAREs : *Soluble NSF Attachment Protein Receptors*.

TGF- α : *Transforming Growth Factor- α* . Factor de crecimiento transformante α .

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β* . Factor de crecimiento transformante β .

TIMP: *Tissue Inhibitor of Metalloprotease*.

Tm: *Melting temperature*. Temperatura de fusión.

TMB: tetrametilbencidina.

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor- α* . Factor de necrosis tumoral- α .

TSP-1: trombospondina-1.

VCAM-1 : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*.

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

VHS: Virus Herpes Simple.

VVZ: Virus Varicela Zoster.

W-H: *Wound Healing*.

\bar{x} : media aritmética.

χ^2 : Chi cuadrado.

ZO-1: *Zonula occludens-1*.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. LA CÓRNEA	3
1.1. Descripción general	3
1.2. Descripción histológica	3
1.3. Inervación corneal	8
1.4. Película lagrimal	9
2. DEFECTO EPITELIAL PERSISTENTE (DEP)	11
2.1. Definición	11
2.2. Etiopatogenia	11
2.3. Tratamientos del DEP	13
3. REGENERACIÓN CORNEAL	13
3.1. Conceptos generales	13
3.2. Factores de crecimiento	21
3.2.1. Factores de crecimiento de la lágrima y su relevancia en el cierre de heridas epiteliales. Relevancia del estroma	22
3.2.1.1. EGF	23
3.2.1.2. TGF- β	24
3.2.1.3. PDGF	25
3.2.1.4. FGF	26
3.2.1.5. KGF	27
3.2.1.6. HGF	27
3.2.1.7. NGF	28
3.2.1.8 IGF-1	29
3.2.1.9. Otros	29
3.3. Nuevas terapias de regeneración corneal	31
3.3.1. Células madre	31
3.3.2. Hemoderivados (PRPs)	32
4. HEMODERIVADOS EN LA REGENERACIÓN CORNEAL	35
4.1. Plaquetas	35
4.2. PRPs en oftalmología	41
OBJETIVOS	45
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. ÉTICA	53
2. CULTIVO CELULAR	53
2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares y recuento celular	53
2.2. Aislamiento y expansión de cultivos epiteliales primarios de conejo (RPCE)	55

2.3. Aislamiento y expansión de cultivos de epitelio corneal humano (HCE)	56
2.4. Aislamiento y expansión de cultivos primarios de queratocitos corneales de conejo	58
3. OBTENCIÓN DEL s-PRGF (suero derivado de Plasma Rico en Factores de Crecimiento)	58
3.1. s-PRGF de conejo	58
3.2. s-PRGF humano	60
4. OBTENCIÓN DEL BIOADHESIVO (ÁCIDO HIALURÓNICO)	61
4.1. Obtención de solución PBS	61
4.2. Obtención de la solución de ácido hialurónico en PBS isotónico pH=7,2	62
4.3. Preparación de las diluciones para los ensayos <i>in vivo</i>	62
5. ESTUDIOS PILOTO	63
5.1. Elección del modelo final de herida corneal	63
5.1.1. NaOH	63
5.1.2. Raspado epitelial + etanol	64
5.1.3. Raspado epitelial	64
5.1.4. Queratectomía estromal superficial anterior	65
5.1.5. Valoración histológica	65
6. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR	66
6.1. Método MTT	66
7. ENSAYOS DE REEPITELIZACIÓN	72
7.1. Reepitelización <i>in vitro</i> (Wound Healing Assay): HCE y RPCE	72
7.2. Reepitelización <i>in vivo</i>	73
8. ENSAYOS DE MIGRACIÓN E INVASIÓN <i>in vitro</i>	77
9. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS CÓRNEAS	78
9.1. Hematoxilina-eosina	78
9.2. Inmunofluorescencia indirecta	80
10. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	84
10.1. Microscopía óptica de contraste de fases	84
10.2. Microscopía óptica de transmisión de luz o de campo claro	84
10.3. Microscopía de fluorescencia	84
10.4. Microscopía laser confocal	85
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	88
12. SINOPSIS DE LA EXPERIMENTACIÓN	89
12.1. Metodología <i>in vitro</i>	89
12.1.1. Ensayo diluciones: Ensayo de proliferación epitelial de RPCE (MTT)	89
12.1.2. Ensayo diluciones: Ensayo de reepitelización epitelial de RPCE (Wound Healing Assay)	90
12.1.3. Ensayo diluciones: Ensayo de migración de queratocitos de conejo	90

12.1.4. Ensayo diluciones: Ensayo de invasión de queratocitos de conejo	90
12.1.5. Ensayo bioadhesivo: Ensayo de proliferación epitelial de HCE (MTT)	90
12.1.6. Ensayo bioadhesivo: Ensayo de reepitelización epitelial de HCE (Wound Healing Assay)	90
12.1.7. Ensayo Albúmina: proliferación epitelial de HCE (MTT)	90
12.1.8. Ensayo Albúmina: reepitelización epitelial de HCE (Wound healing)	91
12.2. Metodología <i>in vivo</i>	91
12.2.1 Estudio piloto para la elección del modelo animal de herida corneal	91
12.2.2. Reepitelización <i>in vivo</i> en el experimento de diluciones de s-PRGF	91
12.2.3. Reepitelización <i>in vivo</i> en el experimento del bioadhesivo	91
12.3. Análisis histológico	91
12.3.1 Hematoxilina eosina	91
12.3.2. Análisis inmunohistoquímico	91
12.3.2.1. En el experimento de diluciones s-PRGF (incluidos en parafina)	91
12.3.2.2. En el experimento del bioadhesivo (incluidos en OCT)	92
RESULTADOS	93
I. ESTUDIO PILOTO DE PRODUCCIÓN DE DEFECTO EPITELIAL CORNEAL.....	95
1. NaOH	95
2. Raspado epitelial + etanol	96
3. Raspado epitelial sin etanol coadyuvante	97
4. Queratectomía estromal superficial anterior	98
5. Valoración histológica	99
II. EFECTO DEL HEMODERIVADO s-PRGF EN LA RESOLUCIÓN DE LA EROSIÓN CORNEAL	101
1. Ensayos <i>in vitro</i>	101
1.1 Proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE	101
1.2. Reepitelización de células epiteliales RPCE (WoundHealing Assay): migración	103
2. Ensayos <i>in vivo</i>	105
2.1. Reepitelización <i>in vivo</i> en modelo animal de conejo	105
2.2. Analisis histológico	107
2.2.1 Hematoxilina-eosina	109
2.2.1.1. Migración e invasión de queratocitos (Ensayo tipo Transwell)	113
2.2.2. Análisis inmunohistoquímico (cortes en parafina)	114
2.2.2.1 Análisis del marcadores CK3/76	114
2.2.2.2. Análisis del marcador ZO-1	115
2.2.2.3. Análisis del marcador CK15	116
2.2.2.4. Análisis del marcador α -SMA	117

III. EFECTO DEL USO COMBINADO DE UN BIOPOLÍMERO ADHESIVO CON EL s-PRGF EN LA RESOLUCIÓN DE LA EROSIÓN CORNEAL	119
1. Ensayos <i>in vitro</i>	119
1.1. Proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE	119
1.2. Proliferación de células de epitelio corneal humano HCE	122
1.3. Reepitelización de células epiteliales RPCE (Wound Healing Assay): migración	125
1.4. Reepitelización de células de epitelio corneal HCE (Wound Healing Assay): migración	128
2. Ensayos <i>in vivo</i>	132
2.1. Reepitelización <i>in vivo</i> en el modelo animal de conejo	132
2.2. Análisis histológico	135
2.2.1 Hematoxilina-eosina	135
2.2.2. Análisis inmunohistoquímico (cortes en OCT)	136
2.2.2.1 Análisis de los marcadores CK3 y CK15	136
2.2.2.2. Análisis del marcador Ki67	138
2.2.2.3. Análisis del marcador Integrina β 4	140
2.2.2.4. Análisis del marcador ZO-1	141
2.2.2.5. Análisis del marcador α -SMA	142
IV. EFECTO <i>in vitro</i> DE LA ALBÚMINA EN COMBINACIÓN O NO CON s-PRGF	145
1. Cuantificación de la Albúmina en el s-PRGF de sujetos sanos	145
2. Experimentación <i>in vitro</i>	146
2.1. Proliferación de células epiteliales HCE	146
2.2. Reepitelización de células epiteliales HCE (Wound Healing Assay): migración	147
DISCUSIÓN _____	151
I. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE DILUCIONES DEL s-PRGF	153
II. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO DEL BIOADHESIVO	161
III. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE LA ALBÚMINA	172
CONCLUSIONES _____	175
BIBLIOGRAFÍA _____	179

ANEXO

Introducción

1. LA CÓRNEA

1.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

La córnea es un tejido transparente avascular de origen embrionario ectodérmico (epitelio) y neuroectodérmico (estroma y endotelio). Está altamente diferenciado para permitir la refracción y la transmisión de la luz. Tiene una cara anterior, en contacto íntimo con la película lagrimal precorneal, y otra cara posterior, bañada por el humor acuoso. Tanto la película lagrimal como el humor acuoso son los máximos responsables de mantener sus requerimientos fisiológicos.

Su grosor central, en la especie humana, es de unas 550 μm y en periferia es de casi 1 mm. Su diámetro vertical frontal es de unos 11 mm, mientras que el horizontal es de unos 12 mm. Su radio de curvatura anterior es de 7.8 mm, mientras que el radio de curvatura posterior es de unos 6.5 mm. Todos estos datos están sujetos a leves variaciones.

La transparencia de la córnea depende primordialmente de una arquitectura estromal muy característica, con un ordenamiento regular de las fibras del estroma lo cual depende, a su vez, de la cantidad de proteoglucanos que existen entre ellas. Además, a la transparencia corneal contribuye el que no existen vasos sanguíneos ni linfáticos y que sus fibras nerviosas son amielínicas. La transparencia corneal también es secundaria a un correcto funcionamiento del endotelio, encargado de la regulación de la hidratación corneal.

La nutrición corneal se produce a través de los capilares del limbo, de las lágrimas y del humor acuoso. El 80-90% del oxígeno necesario para la córnea proviene del humor acuoso. El aire atmosférico aporta un 21% de oxigenación a la córnea con los ojos abiertos y un 7-8% con los ojos cerrados (Krachmer, Mannis & Holland, Cornea. 3rd edition 2010).

1.2. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA

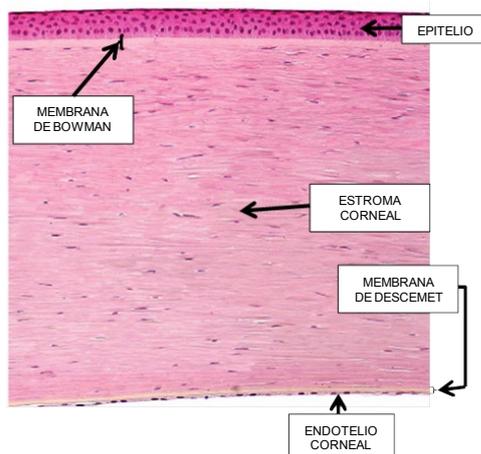


Fig.1a Histológicamente, la córnea consta de 5 capas clásicamente descritas. Fundamentos y Principios de Oftalmología. AAO. Módulo 1

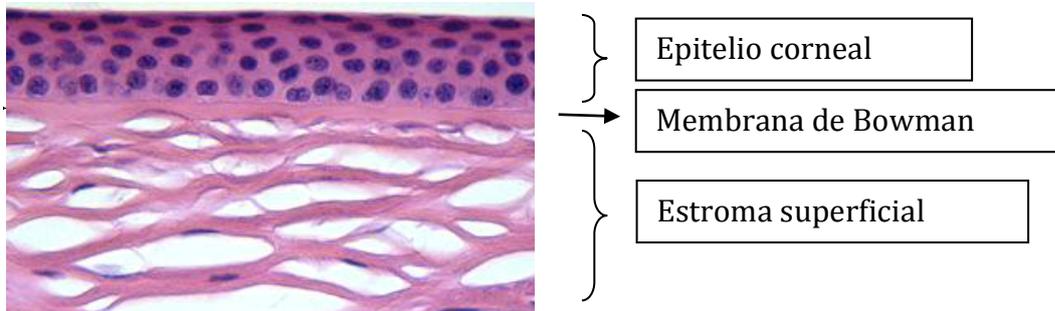


Fig. 1b: Detalle histológico de la cara anterior de la córnea. Fundamentos y Principios de Oftalmología. AAO. Módulo 1

Epitelio: es un epitelio estratificado (con células distribuidas en 5 o 6 estratos), plano, no queratinizado. Tiene un grosor de unas 50 μm , siendo aproximadamente el 10% del espesor total de la córnea. Las células del estrato basal del epitelio proliferan, emergiendo hacia la superficie en unos 7 días, descamándose hacia la película lagrimal. Expresan citoqueratina 3 y 12. Su membrana basal está compuesta por la lámina lúcida (en íntimo contacto con la capa de células basales) y la lámina densa. Su composición es mayoritariamente colágeno tipo IV y laminina. También contiene colágeno VII, fibronectina, fibrina y heparán sulfato (Berman et al., 1983). Su función es fijar la polaridad de las células epiteliales y favorecer la migración de las mismas. Cuando se produce un desbridamiento de células epiteliales, es necesario la creación de una nueva membrana basal, circunstancia que tarda 1 semana aproximadamente.

El epitelio proporciona una barrera mecánica de defensa efectiva contra patógenos, debido a la interdigitación de membranas celulares y a los complejos de unión entre células (uniones estrechas u ocluyentes, también conocidas como “tight junctions”; desmosomas; uniones comunicantes tipo gap, también conocidas como “gap junctions”) y a la unión entre células y membrana basal (hemidesmosomas)(Fig 1c).

Además, un epitelio sano es necesario para mantener una correcta superficie ocular y por tanto, una buena transparencia..

Capa de Bowman: no es una membrana basal sino un acúmulo de fibras de colágeno tipo I y II y proteoglicanos. Se considera la porción anterior del estroma ya que sus fibras de colágeno son secretadas por los queratocitos estromales. Su función no está clara ya

que hay mamíferos que no poseen esta capa, como por ejemplo el conejo, modelo animal utilizado en esta tesis. Incluso, en humanos, tras cirugía fotorrefractiva PRK, desaparece la membrana de Bowman, no regenerándose. Sin embargo, en dichos casos se desarrolla un epitelio sano. Posiblemente evite que ciertas moléculas provenientes del epitelio puedan entrar en contacto con los queratocitos del estroma, activándolos y diferenciándolos a miofibroblastos, lo que produciría una opacidad estromal (Fini & Stramer, 2005). (Fig 1c)

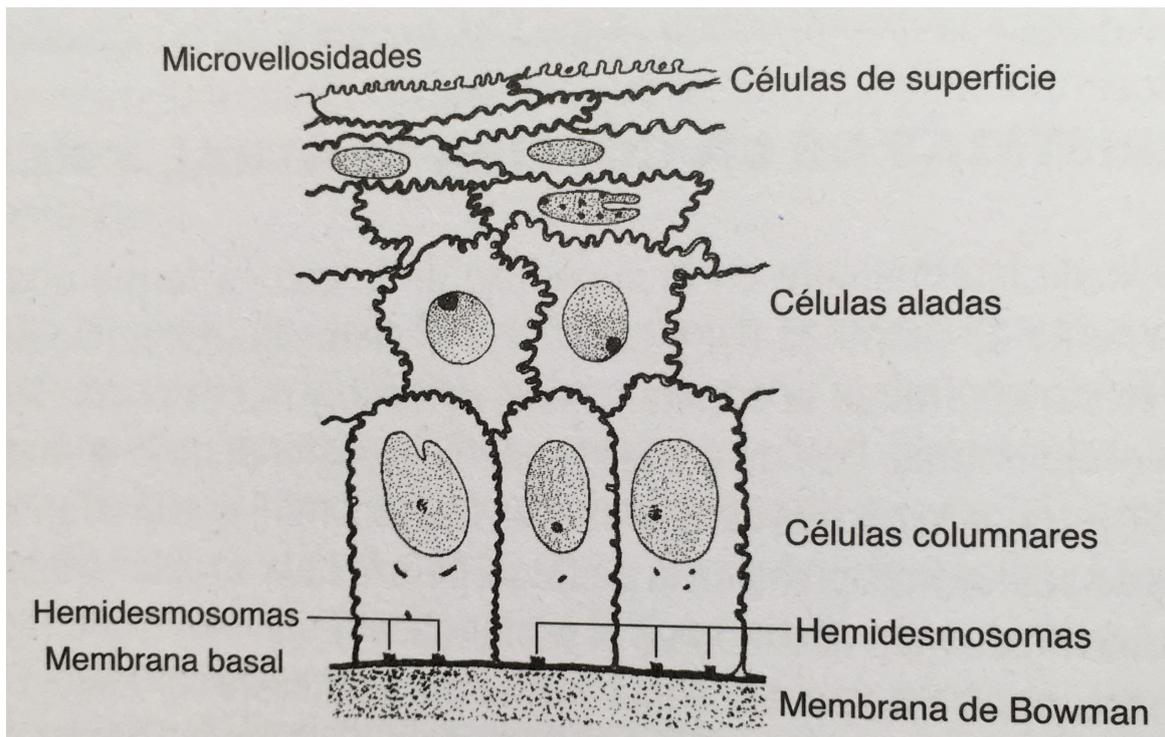


Fig 1c: Detalle del anclaje de la células epiteliales a la membrana basal y su relación con la membrana de Bowman. Fundamentos y Principios de Oftalmología. AAO. Módulo 1, 2018

Estroma: constituye aproximadamente el 90% del grosor corneal. Consiste en matriz extracelular, queratocitos (fibroblastos corneales) y nervios corneales. La matriz extracelular, que representa el 70% del peso de una córnea seca, está compuesta mayoritariamente por colágeno tipo I y, en menor cantidad, por tipo III, V y VI. La distribución entre fibras de colágeno (unas 300 capas) es muy uniforme, siendo esto determinante para una buena transparencia corneal (Fig. 2a).

Introducción

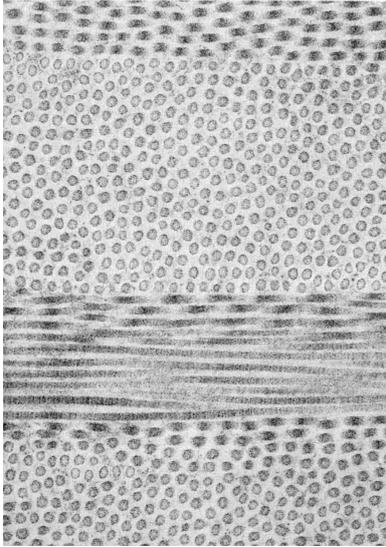


Fig. 2a. Microscopia electrónica mostrando la distribución normal de fibras de colágeno en el estroma corneal. (Libro: Leon Weiss 6th edition Cell and tissue biology 1988)

El metabolismo de recambio de estas fibras de colágeno es muy lento (unos 2-3 años). En caso de alterarse esta uniformidad, como por ejemplo en el edema corneal o en la cicatrización corneal, habría una pérdida de transparencia. Además de colágeno, la matriz extracelular está compuesta por glicosaminoglicanos (hialuronato, heparán sulfato, queratán sulfato, etc.) que retienen agua, hidratando la córnea y favoreciendo su transparencia.

Los queratocitos son las células del estroma corneal, representando aproximadamente un 2% de su volumen total. En condiciones normales, tienen una actividad metabólica muy baja, activándose ante una daño corneal. En caso de activarse, los queratocitos producen unas proteínas con actividad proteasa con capacidad de digerir el colágeno llamadas metaloproteasas (MMPs).

Recientemente se ha descrito una nueva capa en la córnea: la capa de Dua, que sería la equivalente a la membrana de Bowman pero en la parte más posterior del estroma. Por tanto, dicha capa de Dua formaría, histológicamente, parte del estroma, como lo debiera formar la capa de Bowman. Sin embargo, la descripción clásica, que incluye la capa de Bowman como capa independiente (y con nombre propio) del estroma, ha arrojado confusión en la descripción histológica de la misma (Dua et al., 2013). Es la capa en íntima relación con la membrana de Descemet (Fig 2b)

Membrana de Descemet: es la verdadera membrana basal del endotelio corneal subyacente. Está compuesta mayoritariamente por colágeno IV y laminina. Tiene un espesor de 5 a 20 μm , dependiendo de la edad del individuo, aumentando con la misma.

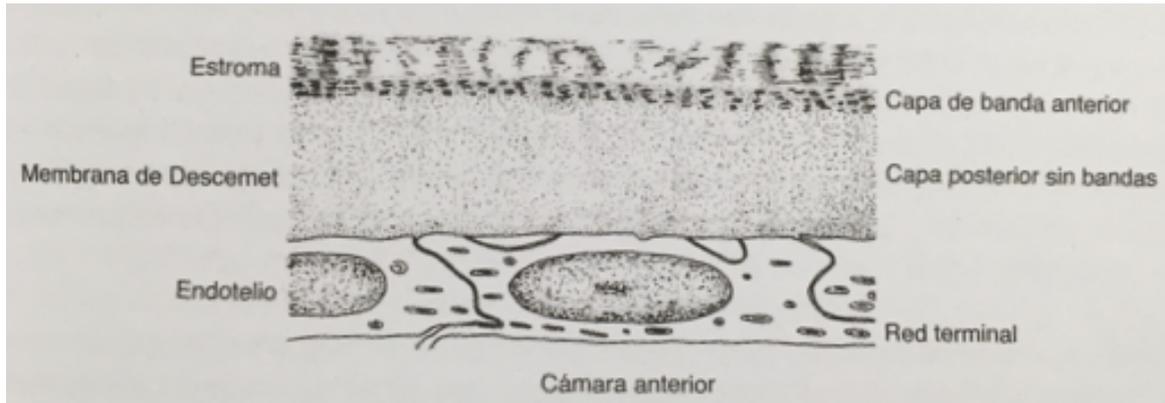


Fig 2b: Detalle de la transición estroma, membrana de Dua (o capa de banda anterior), membrana de Descemet (o capa de banda posterior) y endotelio. Fundamentos y Principios de Oftalmología. AAO. Módulo 1

Endotelio: capa más posterior de la córnea, compuesta por una monocapa de células poligonales, mayoritariamente hexagonales y sin capacidad mitótica *in vivo*. Por lo tanto, la densidad de células endoteliales disminuye con la edad. Son células metabólicamente muy activas. Su función principal es regular el contenido en agua del estroma corneal, que tiende a fluir osmóticamente desde el humor acuoso hacia el estroma, edematizando la córnea. Mediante una bomba ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, las células endoteliales desplazan el agua en sentido inverso. Contiene aproximadamente 3500 a 4000 células/ mm^2 al momento de nacer y el mínimo necesario para mantener la transparencia de la córnea es de 300 a 600 células/ mm^2 .

Mención aparte merece la estructura anatómica llamada limbo esclero-corneal, localizado en la transición entre la córnea y la esclera. En dicha localización residen las células madre adultas encargadas de la renovación del epitelio corneal. Dichas células madre están en la capa basal de la transición entre córnea y esclera y se transforman en células amplificadas transitorias y posteriormente en células epiteliales diferenciadas a medida que migran centripeta y apicalmente.

A pesar de no existir un marcador positivo específico para células madre de epitelio corneal humano, hay suficientes evidencias indirectas como para confirmar su existencia en dicha área anatómica. En primer lugar, para ello se han empleado las citoqueratinas. Estas proteínas forman parte junto a los microfilamentos y los microtúbulos, del citoesqueleto celular. Tanto la citoqueratina K3 como la citoqueratina K12 han mostrado un marcaje específico en aquellas zonas del epitelio corneal cuyas células presentan un estado de diferenciación avanzado y una ausencia del mismo en la zona basal del limbo,

representado por células de carácter indiferenciado. Por otro lado, la citoqueratina K15 es un marcador de células madre de estirpe epitelial que se expresa de manera específica el área del limbo y de la conjuntiva. Por tanto, las células madre del limbo no se tiñen con marcadores específicos de células epiteliales adultas como el anticuerpo monoclonal (AE5) específico para la citoqueratina 3 y 12 (Schermer et al., 1986).

Además, clínicamente, en caso de producirse un daño en dicho área limbar, observaremos un retraso o un fracaso en la reepitelización de la córnea (Huang y Tseng, 1991) así como la presencia de citoqueratinas 13 y 19, las cuales son marcadores de diferenciación conjuntival, en área corneal (Poli et al., 2011). En caso de haber una alteración severa de las células madre limbares, también ocurre la negativización de marcadores de diferenciación corneal, como la citoqueratina 12 (Poli et al., 2011).

La microscopia confocal también parece tener valor en el diagnóstico de la deficiencia funcional de esta área anatómica, es decir, en el diagnóstico de insuficiencia limbar (Deng et al., 2012) apreciándose, mediante esta técnica, cambios microestructurales estadísticamente significativos respecto a controles. Así, observamos la progresiva evolución de las células basales hacia la metaplasia, la disminución en la densidad de células en epiteliales en el estrato basal, así como la reducción en la densidad nerviosa sub-basal. En fases muy avanzadas, se alcanza una pérdida total de la morfología epitelial basal normal y una pérdida de nervios sub-basales. Dicha pérdida de densidad celular en estratos basales se correlaciona estadísticamente con la pérdida de densidad nerviosa sub-basal.

Más recientemente, se ha descrito el rol de la topografía óptica de coherencia de polo anterior en el diagnóstico de la insuficiencia de células madre limbares (Le et al, 2018)

1.3. INERVACIÓN CORNEAL

La córnea está densamente inervada por fibras nerviosas sensitivas provenientes de la división oftálmica del V par o nervio trigeminal, fundamentalmente por vía de los nervios ciliares largos, mediadas por la sustancia P como neurotransmisor. Dichas fibras nerviosas, tras formar un plexo anular en el limbo, pierden sus vainas de mielina y penetran en el estroma anterior, sobre todo por el área nasal. Ahí perforan la membrana de Bowman y alcanzan el área subepitelial, en donde sus terminaciones forman el plexo nervioso subepitelial, teniendo mayor densidad en los dos tercios centrales de la córnea.

La córnea es el tejido con mayor inervación sensitiva del cuerpo humano. De hecho, la concentración de estas terminaciones es de 20 a 40 veces mayor que la pulpa dental y entre 300 a 600 veces más que la piel (Rózsa et al., 1982). Esto indicaría que la lesión sobre una sola célula epitelial sería suficiente para provocar la percepción dolorosa (Müller et al., 1997).

Existen tres tipos de terminaciones nerviosas: nociceptoras, polimodales y de temperatura. Las segundas responden a variados estímulos de tipo químico, mecánico, etc.

La inervación juega un papel fundamental tanto en el trofismo tisular como en la regeneración del tejido después de un trauma, al liberar neuropéptidos que, a su vez, estimulan la llegada de células inflamatorias.

En caso de denervación trigeminal se produce una importante depleción de sustancia P en la córnea, además de cambios degenerativos en el tejido (Cook et al., 1994). La combinación sinérgica de sustancia P e IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) favorece la migración del epitelio corneal, a pesar de que ninguna de las moléculas anteriormente mencionadas pueden conseguir dicho efecto cuando actúan por separado (Nishida et al., 1996).

1.4. PELÍCULA LAGRIMAL

Es un complejo formado por componentes provenientes de diferentes lugares: glándula lagrimal principal, glándulas de Meibomio, glándulas lagrimales accesorias y células caliciformes. La membrana apical de las células epiteliales corneales tiene unos pliegues llamados microvilli, cuya función teórica es favorecer la adhesión de la película lagrimal.

Las funciones de la película lagrimal incluyen la lubricación, protección y nutrición de la córnea. Además, tiene una aportación crítica a las propiedades ópticas del ojo.

Su volumen suele ser de unos 6 µl, siendo la producción de 1,2 µl/minuto, es decir una renovación del 16% de la lágrima /minuto (Mishima et al., 1966)

Clásicamente la estructura de la película lagrimal se describió como 3 capas separadas: capa lipídica, capa acuosa y capa mucínica.

La capa lipídica es la más anterior y está producida por las glándulas de Meibomio, que liberan su secreción por el efecto “ordeño” del parpadeo. Su función más importante es la de retrasar la evaporación de la película lagrimal, además de proporcionar una superficie de gran calidad óptica.

Introducción

La capa acuosa supone el 95% del grosor total de la película y está segregada por las glándulas lagrimales principal y accesorias. Aparte del efecto fundamental de la humectación, esta capa contiene proteínas, electrolitos, metabolitos y enzimas para las funciones de defensa y mantenimiento de la superficie ocular. En cuanto a las proteínas se incluyen lisozima, lactoferrina, IgA secretora, albúmina, etc. También contiene proteínas llamadas factores de crecimiento las cuales favorecen la correcta epitelización de la córnea, tanto en situación basal como en situaciones de defecto epitelial (Matsumoto et al., 2004). Entre los electrolitos, la película lagrimal contiene Cl^- y K^+ a concentraciones algo mayores que en el suero sanguíneo. En cuanto a los metabolitos y enzimas, la glucosa está presente en la lágrima, si bien su concentración es baja (aproximadamente 25 mg/l).

La capa mucínica se deposita sobre el epitelio córneo-conjuntival y aporta estabilidad a la película lagrimal sobre. (Fig.3)

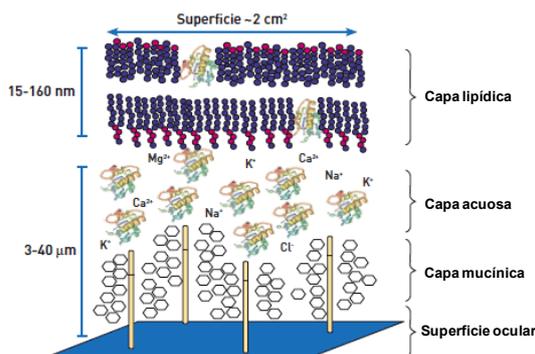


Fig. 3. Esquema clásico de la estructura de la película lagrimal (no a escala). Adaptado de <http://www.tearfilm.org>

En cualquier caso, este esquema en tres capas bien diferenciadas, es cuestionado en la actualidad, de modo que las capas de la película lagrimal no quedarían bien delimitadas, pues la mucina tendría presencia en la porción acuosa en un gradiente que pudiera influir de alguna manera sobre la capa lipídica superficial, es decir, la película lagrimal se considera más un continuo estando la capa lipídica más anterior que el resto.

La osmolaridad de la película lagrimal sana es de 296.5 ± 9.8 mOsm/L (Versura et al., 2010), aumentando en casos de síndrome de ojo seco u otro tipo de inflamación de la superficie ocular.

Por otro lado, si bien clásicamente se ha aceptado que existía un lagrimeo básico y otro reflejo, se considera hoy en día que toda secreción lagrimal es una respuesta continua a la estimulación sensitiva del V par craneal.

2. DEFECTO EPITELIAL PERSISTENTE (DEP)

2.1. DEFINICIÓN

Se define como la situación en la que el epitelio no consigue cubrir un defecto epitelial en dos semanas a pesar del tratamiento convencional con lágrimas artificiales y/o lente de contacto (Poon et al, 2001). Es una respuesta inapropiada de reparación del epitelio corneal, observándose la incapacidad por parte del ojo en cerrar una rotura epitelial debido a alteración en las adhesiones intercelulares o con la membrana basal subyacente. De hecho, cuando las “uniones ocluyentes” entre células epiteliales o los hemidesmosomas no se pueden formar, se produciría un defecto epitelial persistente.

Los defectos epiteliales, independientemente de su causa, cursan con un aumento de la plasmina libre en superficie ocular, facilitando adhesiones frágiles e induciendo la reducción y debilidad de los complejos de unión entre el epitelio corneal y la fibronectina de la matriz extracelular, contribuyendo a la persistencia del defecto epitelial (Berman, 1989).. Dicha plasmina libre es un quimiotáctico para polimorfonucleares, los cuales liberan ciertas metaloproteasas con actividad colagenasa, favoreciendo el “melting” o reblandecimiento del estroma corneal. Por tanto, los DEP, independientemente de la causa, pueden progresar al estroma anterior y producir una subsecuente úlcera estromal por degradación proteolítica de colágeno estromal y matriz extracelular.

2.2. ETIOPATOGENIA DEL DEP

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

Todas las etiologías del defecto epitelial persistente son diversas ya que cada enfermedad es la combinación de diferentes mecanismos bioquímicos que, además de producir el defecto epitelial, finalmente, incluso pueden producir la alteración del estroma corneal.

Las causas más frecuentes de DEP son el síndrome de ojo seco severo, incluyendo el ojo seco secundario del penfigoide de las membranas mucosas, síndrome de Stevens-Johnson, enfermedad injerto contra huésped; la neurotrofia, como en la enfermedad herpética o postqueratoplastia (Fig.4), etc. El espectro clínico de la patología corneal de

origen neurotrófico puede ir desde la queratitis punteada superficial, pasando por la úlcera neurotrófica hasta el defecto epitelial persistente e, incluso, la perforación corneal.

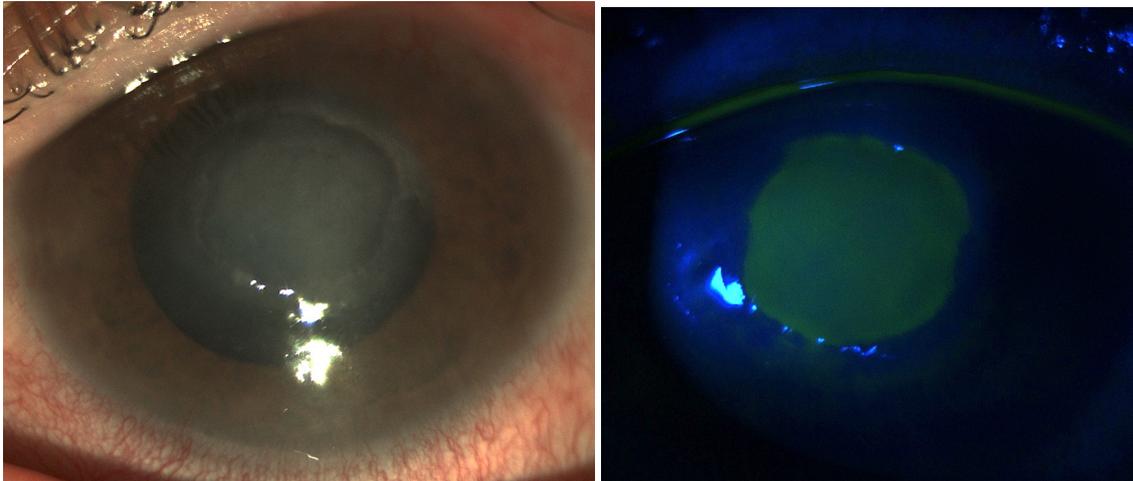


Fig. 4: Defecto epitelial persistente sin y con fluoresceína

Las causas de DEP pueden ser

- Trauma mecánico: por uñas, exceso de uso de lentes de contacto, cuerpo extraño en fondos de saco o párpado, triquiasis/distiquiasis,
- Exposición química.
- Exposición del globo ocular (mal cierre palpebral): enfermedades neurotróficas que producen cierre palpebral incompleto como la parálisis facial, enfermedades palpebrales con restricción de cierre, proptosis, deterioro cognitivo por coma o abuso de drogas, blefaroplastia, lagofthalmos.
- Quemaduras por ultravioleta, soldadura, exceso de exposición solar.
- Sequedad corneal de origen local o por enfermedades sistémicas: síndrome de ojo seco, enfermedad tiroidea, síndrome Sjögren, déficit de vitamina A.
- Insuficiencia de células limbares: por quemadura química, postcirugía, enfermedades inmunológicas como el penfigoide de membranas mucosas o el síndrome de Stevens-Johnson, aniridia, etc.
- Queratopatía neurotrófica: abuso de anestésico tópico, afectación trigeminal por VHS (virus herpes simple), VVZ (virus varicela zoster) u otros, afectación trigeminal por agenesia del ganglio de Gasser, alteración trigeminal iatrogénica.

2.3. TRATAMIENTOS DEL DEFECTO EPITELIAL PERSISTENTE

El tratamiento de los defectos epiteliales persistentes sigue siendo uno de los caballos de batalla más retantes en oftalmología. Son muchos los tratamientos médicos y quirúrgicos que se han descrito para la resolución de este cuadro clínico. Entre ellos existen tratamientos médicos habituales, como los lubricantes oculares y antibióticos tópicos, el colirio de suero autólogo (Tsubota 1999) y métodos quirúrgicos encaminados a mejorar el tropismo de la superficie ocular. Entre estos últimos destacamos la tarsorrafia lateral (Panda et al., 1999), el uso de lentes de contacto de vendaje (Rosenthal et al., 2000,) , los taponos lagrimales (Seitz et al., 2005), el trasplante de membrana amniótica (Kruse et al., 1999).

También contamos con tratamientos médicos basados en la aplicación de moléculas específicas como pueden ser el colirio de NGF (Neural Growth Factor) (Lambiase et al., 1998), el colirio de EGF (Epithelial Growth Factor) (Pastor et al., 1992), el colirio de FGF (Fibroblast Growth Factor) (Tripathi et al., 1990), el colirio de PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) (Murali et al., 1994) y el colirio de sustancia P y de IGF-1 (Insuline-like Growth Factor-1) (Yamada et al., 2008).

3. REGENERACIÓN CORNEAL

3.1. CONCEPTOS GENERALES

La córnea tiene características anatómicas, celulares y moleculares únicas, que hacen que la reparación del tejido tenga unas características especiales en relación al mantenimiento de transparencia y forma de la misma.

El mantenimiento de una correcta estructura corneal es crucial para que dicho tejido pueda desarrollar sus funciones fisiológicas de refracción y defensa ante microorganismos. La córnea es un tejido expuesto directamente al ambiente y, por tanto, susceptible de ser dañado fácilmente por agentes físicos, químicos o biológicos. Con objeto de proteger la córnea, disponemos de unas estructuras y unos mecanismos muy efectivos como son los párpados, la función de parpadeo y la película lagrimal, aunque no siempre son suficientes, por lo que la córnea dispone de un muy efectivo sistema de renovación del epitelio corneal y de reparación corneal en caso de defecto epitelial.

Las células epiteliales corneales se renuevan continuamente gracias a una fuente de células madre adultas localizadas en la zona basal de la estructura anatómica llamada

limbo esclero-corneal. Dicha área se encuentra en los 360° de la transición entre la córnea y la esclera. Las células madre limbares, a través de diferentes divisiones, maduraciones, diferenciaciones y migraciones centrípetas y hacia estratos superficiales, renuevan diariamente la descamación fisiológica del epitelio corneal.

Para que todo este sistema de reparación/regeneración funcione correctamente debe hacer un equilibrio entre morfología de párpados, funcionalidad de los mismos, cantidad y calidad de la película lagrimal, salud de células madre epiteliales (en cuanto a cantidad y a microambiente celular), e inervación corneal (Tseng y Tsubota, 1997)

La cicatrización corneal supone una cascada de circunstancias que se muestran sintéticamente en la figura 5 en orden cronológico, (Wilson et al., 2001) (Fig.5)

Cuando la córnea sufre un defecto epitelial, se produce una reparación caracterizada por 3 diferentes fases como son la migración, la proliferación y la diferenciación celular, es decir, las células epiteliales adyacentes a la herida migran hacia el defecto epitelial y se produce una mayor activación de las células madre epiteliales limbares, con intención de rellenar el defecto lo antes posible. También los queratocitos estromales son considerados células de gran importancia en la reparación corneal.

Al producirse el daño epitelial, se produce una liberación de citoquinas (IL-1, PDGF, etc.). A las pocas horas de la herida corneal, ya sea epitelial pura o epitelial y estromal, los queratocitos adyacentes a la herida sufren apoptosis/necrosis creando una zona acelular. A continuación se produce una liberación de factores de crecimiento en lágrima. Tras ello, hay un comienzo de cierre epitelial gracias a la migración del epitelio adyacente a la herida, con objeto de cerrarla (Kubawara et al., 1979). Ocurren dos tipos de movimiento celular: un deslizamiento inicial de una monocapa de células epiteliales, seguido de un posterior movimiento en masa del epitelio adyacente. Estos movimientos de migración celular están inducidos por la transducción de señales, que provocan cambio en la forma y función de las células. Las PK (proteín kinasas) C, A y G tienen un papel muy importante en estas señales de transducción celular. En concreto, la PKC- α es la isoforma que tiene mayor importancia en las vías de señalización celular (Hirakata et al., 1993). De hecho, la concentración de la PKC aumenta durante la reparación celular. Además, la inhibición de la PKC produce un importante retraso en la migración de células del epitelio corneal (Hirakata et al., 1993).

El cierre de la herida también se produce, aparte de por migración celular, por una aceleración en la proliferación celular desde las células madre del limbo esclero-corneal. Posteriormente, a las 6 horas de la producción de la herida aproximadamente, los queratocitos inmediatamente adyacentes al área acelular empiezan a activarse

(aumentan su tamaño y contenido en los orgánulos) A las 24 horas, los queratocitos empiezan a migrar hacia la zona dañada y a proliferar y adoptan una morfología que sugiere su transición a fibroblastos. A las 48 horas, los queratocitos llegan al borde de la herida, con un aspecto fusiforme típico de fibroblastos, múltiples núcleos y falta de orgánulos citoplasmáticos (Fini et al., 2005). Comienzan a activarse genes que codifican componentes de la matriz extracelular (fibronectina, MMPs, moléculas de adhesión) y empiezan a desactivarse genes que codifican moléculas que mantienen la transparencia de la córnea (cristalinas corneales) (Fini et al., 2005). Por otro lado, la fibronectina que proviene tanto de la vascularización conjuntival como de los queratocitos estromales, aumenta su concentración en la fase aguda de los defectos epiteliales y estromales, para formar parte importante de una matriz provisional sobre la que crecerán las células epiteliales (Lind et al., 1993). La fibronectina estimula la adhesión y la migración epitelial en cultivos de células epiteliales de conejo, al tener un efecto quimiotáctico sobre células epiteliales corneales. Al acabar el proceso de reparación celular, la fibronectina se reabsorbe, por un mecanismo posiblemente asociado a plasmina. La adhesión de las células epiteliales a la fibronectina se da a través de ciertas integrinas. Dichas integrinas disminuyen su expresión al comienzo de una herida corneal, favoreciendo la migración de las células epiteliales para, posteriormente, aumentar su expresión con objeto de aumentar su capacidad de adhesión con la fibronectina. De hecho, mediante anticuerpos contra la integrina $\beta 1$ inhibimos la adhesión de las células epiteliales a la fibronectina. La migración de células epiteliales también es modulada por diferentes citoquinas. De hecho, las células epiteliales corneales de conejo aumentan su adhesión a la fibronectina en caso de estar en presencia de EGF, IL-6, combinación de sustancia P con IGF-1. Es más, la IL-6, que es secretada por las propias células del epitelio corneal, estimula la expresión de ciertas integrinas como la integrina $\alpha 5\beta 1$, que es receptor de la fibronectina.

A continuación, se produce una diferenciación de los queratocitos a miofibroblastos mientras simultáneamente continúa la migración de los mismos. Estos miofibroblastos (expresan α -SMA, acrónimo en inglés de α -actina de músculo liso), que aparecen inicialmente bajo el epitelio, tienen capacidad contráctil y de motilidad (Stramer et al., 2003). Este proceso de transformación a miofibroblastos está mediado por TGF- β .

Dichos miofibroblastos corneales inician una producción de citoquinas (HGF, KGF, TGF- β). Con ello, tiene lugar una alta producción de matriz extracelular, alta hiper celularidad y contracción tisular, lo cual se traduce en opacidad tisular de la córnea o

Introducción

“haze”. Posteriormente, los marcadores de miofibroblastos desaparecen y el número de células vuelve a la normalidad.

Simultáneamente o inmediatamente después a la transformación de queratocitos a miofibroblastos, se da una infiltración de células inflamatorias. A continuación se produce una diferenciación de los monocitos a fibroblastos y una producción de colagenasas y otras metaloproteasas que inducen una remodelación estromal. Tras ello, se consigue un cierre de la superficie epitelial con hiperplasia epitelial. Después, se aprecia una apoptosis/necrosis de los miofibroblastos, e incluso, se ha descrito una transdiferenciación de los miofibroblastos, aunque este punto está en entredicho. Para finalizar la reparación corneal, se induce una apoptosis/necrosis de células inflamatorias, con retorno de los queratocitos a su estado normal.

En la siguiente figura (Fig.5) mostramos un esquema de la cronología de la reparación corneal.

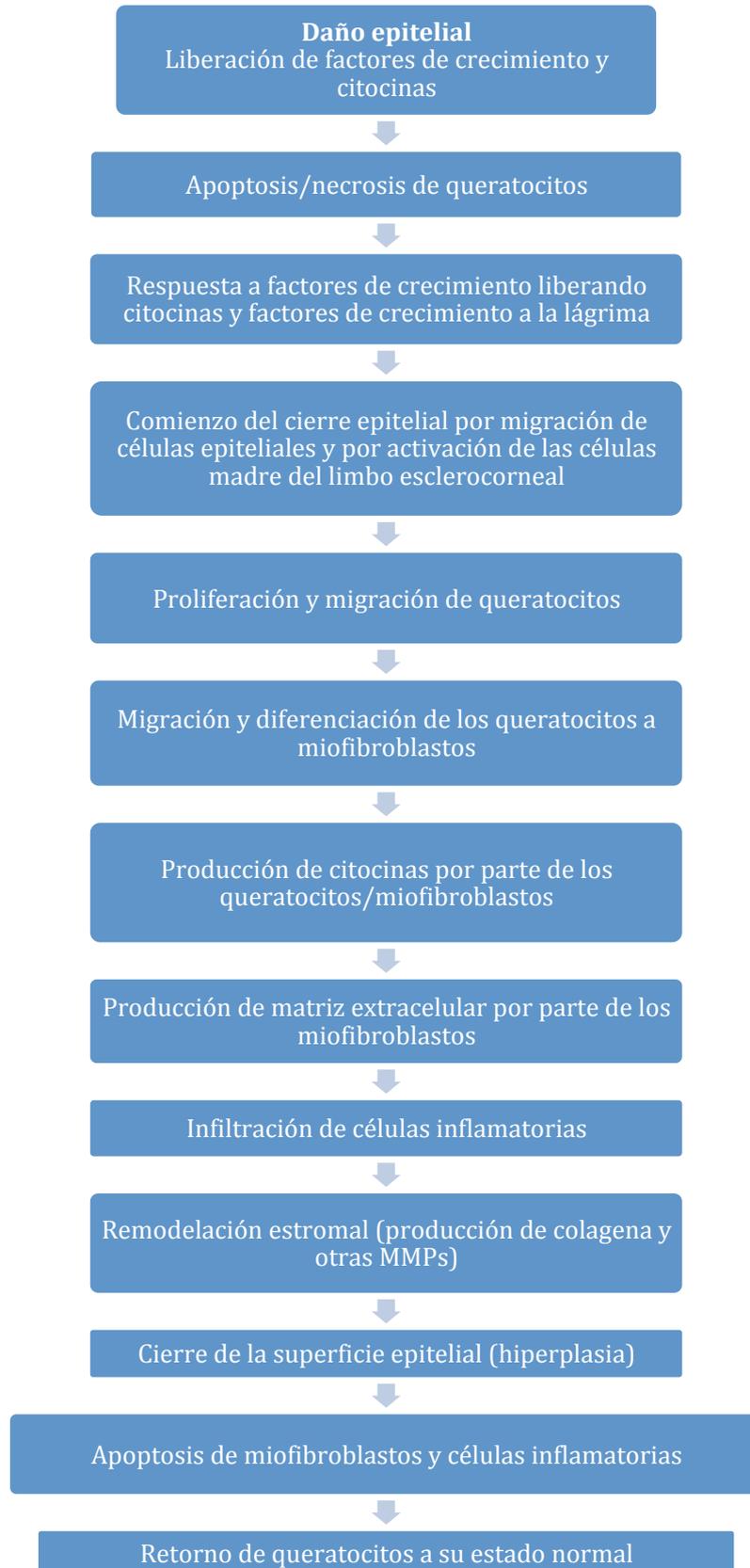


Fig. 5: Esquema que muestra la cascada de eventos en orden cronológico que ocurren en el proceso de regeneración corneal (adaptado de Klenkler et al 2004)

Por otro lado, el hialuronato, que es un componente de la matriz extracelular no presente en una córnea normal, parece tener su importancia en la reparación corneal al, según algunos estudios, al favorecer la proliferación de células epiteliales corneales (Inoue & Katakami., 1993) y la migración *in vitro* de las mismas (Gomes et al., 2004). Estudios experimentales demuestran que su expresión aumenta en córneas que sufren queratectomías superficiales, sugiriendo así su importancia en la cicatrización del epitelio corneal. De hecho, el hialuronato es el único glicosaminoglicano que estimula la migración celular *in vitro* del células de epitelio corneal. Incluso, la administración de gotas con ácido hialurónico ha demostrado que favorece el cierre del epitelio corneal en conejos in vivo (Nakamura et al., 1992), circunstancia que nosotros no hemos observado en los resultados de este trabajo.

Finalmente, tras el cierre del defecto epitelial, existe una fase de remodelación regenerativa de la cicatriz corneal que puede resultar en una mejoría de la transparencia debido al restablecimiento del paralelismo de las fibras de colágeno y la distribución de las capas de modo ortogonal las unas respecto a las adyacentes (Cintron et al., 1978). Seguramente el requerimiento de esta organización estructural tan precisa sea la causa de que el remodelamiento homeostático del estroma corneal, tanto en cuanto a fibras como en cuanto a queratocitos, tenga ciclos tan lentos comparado con la piel. En esta fase de remodelación, y que tiene una duración mayor de 2 años, el *turnover* del colágeno es mucho más rápido que en condiciones normales. En esta fase tienen especial importancia las metaloproteasas (MMPs) sobre todo la gelatinasa A (MMP-2), gelatinasa B (MMP-9), estromalisina-1 y colagenasa. Estas enzimas aumentan mucho entre la semana 1 y 4 postraumatismo, disminuyendo rápidamente las siguientes 4 semanas y manteniéndose más altas de la normalidad durante meses (Fini 2005). En relación a ello, se ha determinado la importancia de las células epiteliales en el control de la producción de las MMPs por parte de las células estromales. De hecho, la IL-1 α y el FGF-2 de las células epiteliales son potentes inhibidores del TGF- β 2 (Strissel et al., 1995). Y por otro lado, la interacción recíproca entre matriz extracelular y células estromales controla la expresión de MMPs a través de un mecanismo autocrino de secreción de IL-1 α (West-Mays et al., 1995). Es decir, en condiciones normales las células estromales no producirían IL-1 α , pero ante una herida, sí.

Por otro lado, tanto el PDGF como el FGF-2 (no así el TGF- β 2), producidos por el epitelio corneal, pero también presentes en el suero sanguíneo y derivados, tienen la capacidad de disminuir las cristalinas corneales, responsables en parte de la transparencia corneal, de modo que el bloqueo tanto de PDGF como de FGF-2 podría

ser un modo de mejorar la transparencia corneal durante su reparación (Stramer et al., 2004).

Además, para mantener la córnea transparente es precisa una deshidratación relativa de la misma, lo cual se consigue a través de la bomba endotelial. Si la barrera endotelial se daña, se produce un edema y pérdida de transparencia.

En la córnea, también es importante su característica naturaleza avascular. Así como en la reparación tisular de la piel, las plaquetas sanguíneas aportan citoquinas almacenadas en el área de la herida, en la córnea, las citoquinas regulatorias deben venir de otras fuentes diferentes a las plaquetas. En el caso de la córnea, sería las propias células epiteliales activadas las que liberarían citoquinas con capacidad de modular la respuesta de cicatrización (Wilson et al., 1999; Wilson et al., 2001; Imanishi et al., 2000). De hecho, al parecer la clave para reducir la fibrosis es reducir la interacción entre epitelio y las células estromales. Así, si nosotros desbridamos el epitelio corneal de su membrana basal, quedando intacta dicha membrana basal, las células estromales subyacentes entran en apoptosis (Wilson et al., 1998) y se produce una reposición de células epiteliales sin hiper celularidad ni depósito de matriz extracelular (Streilein et al., 1997) ni fibrosis (Wilson et al., 1998; Zierke et al., 2001),

Las moléculas más importantes (procedentes del epitelio corneal) que median la respuesta fibrótica corneal son la familia de las TGF- β (Saika et al., 2004). Dichas moléculas reclutan células de origen mesenquimal y favorecen que se expresen fibronectina y otros componentes de matriz extracelular, así como la expresión de α -SMA típica de los miofibroblastos. De hecho, la isoforma TGF- β 2 es la más importante en cuanto a la inducción de fenotipo fibrótico (Fini et al., 2005), teniendo un patrón de secreción prácticamente nulo en un epitelio corneal íntegro, con liberación abundante hacia el estroma durante la respuesta fibrótica. Sin embargo, y por otro lado, la secreción de TGF- β 1 no es consistente con la respuesta fibrótica. La familia de los TGF- β estimulan fosforilación de moléculas citoplásmicas, como la familia de las Smads, las cuales se translocan al núcleo favoreciendo la transcripción de ciertos genes. Estas moléculas (Smads), por tanto, serían potenciales objetivos para inhibir la fibrosis, al menos en piel, donde la principal isoforma de TGF- β secretada en la reparación es la TGF- β 1 (proveniente de las plaquetas y monocitos). En córnea, donde el TGF- β 2 es la principal isoforma involucrada en la respuesta fibrótica, las moléculas Smad son necesarias para la formación de la α -SMA (marcador de miofibroblastos). Es decir, la inhibición de las Smad, inhibirían la formación de α -SMA, disminuyendo el "haze" u opacidad estromal. Sin embargo, al inhibir las Smad no se altera la deposición de fibronectina, la cual sí aumenta la opacidad estromal. Es decir, la inhibición de las Smad

Introducción

no sería suficiente para inhibir la opacidad corneal durante la respuesta de reparación corneal ya que se inhiben ciertos marcadores de fibrosis (α -SMA) pero no se inhiben otros marcadores de fibrosis como la fibronectina, que ejerce su respuesta por otros mediadores distintos a los Smads, como las MAPK (mitogen-activated protein-kinasa)

Por tanto, las observaciones clínicas y de laboratorio, sugieren que la membrana basal epitelial sería un factor clave en controlar la liberación de TGF- β durante la reparación corneal. Cuando desbridamos el epitelio corneal sin afectar la membrana basal, las células estromales subyacentes sufren apoptosis, pero el TGF- β 2 queda confinado al epitelio corneal y por tanto, las células estromales se reemplazan por mitosis sin evidente hiper celularidad o deposición de matriz extracelular, es decir, sin evidencia de reacción fibrótica (Zieske et al., 2001). Esto es lo que ocurriría en un LASIK, en que la membrana basal queda intacta (excepto en los bordes del flap) y, a pesar de la energía del laser, la respuesta fibrótica es prácticamente inexistente (Nakamura et al., 2001) por lo que sólo se produce expresión de marcadores fibróticos en dichos bordes (Ivarsen et al., 2003). De forma equivalente, en un queratectomía radial, en trasplante de córnea penetrante o lamelar anterior, sólo habrá expresión de marcadores fibróticos en la zona de la intectomía donante-receptor. Sin embargo, cuando hay desbridamiento del epitelio corneal con penetración de la membrana basal y estromal, se produce una respuesta de fibrosis en dichas zonas en las que hay disrupción de la membrana basal. Esto es lo que ocurre en la queratectomía fotorrefractiva o, más comúnmente conocido por su acrónimo en inglés, PRK (Photorefractive Keratectomy).

En este sentido sería razonable la utilización de la membrana amniótica para defectos epiteliales persistentes, debido a la membrana basal que aporta, favoreciendo, además de la reepitelización, la reducción de cicatrización fibrótica (Shimazaki et al., 1997), ya que facilita que el TGF- β 2 vuelva a confinarse en la capa epitelial, disminuyendo el fenotipo fibrótico.

Por otro lado, la pérdida de sensibilidad corneal favorece una rotura en la integridad del epitelio corneal. Es más, el anestésico tópico impide la migración del epitelio corneal *in vivo* (Bisla et al., 1992).

De hecho, una de las causas principales del defecto epitelial persistente es la reducción de la sensibilidad corneal producida por diferentes causas (herpes, diabetes, etc.). Dichas fibras nerviosas corneales están mediadas por la sustancia P como neurotransmisor. En caso de denervación trigeminal se observa una reducción de la cantidad de sustancia P en córnea. Y el aporte exógeno de sustancia P y IGF-1 en

combinación favorece la migración epitelial corneal y favorece el cierre de úlceras corneales neurotróficas *in vivo* debido, seguramente, a la regeneración de fibras nerviosas corneales (Nishida et al., 1996). Sin embargo, el aporte de cada una de esas moléculas por separado no afecta a la migración celular epitelial (Nishida et al., 1996).

3.2. FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son un conjunto de sustancias (generalmente proteínas), que desempeñan una importante función en la comunicación intercelular. La función principal de los factores de crecimiento es la regulación del ciclo celular iniciando la mitosis. Además, estimulan la migración celular, la diferenciación celular e incluso la apoptosis. Actúan uniéndose a receptores celulares de membrana que transmiten la señal del exterior al interior de la célula, mediante el acoplamiento de diferentes proteinquinas que se fosforilan y que activan una cascada de señales que acaba con la activación de uno o varios genes. A esto se le llama transducción de señales.

Los factores de crecimiento son producidos por gran número de células y transportados por el suero.

Existen diferentes tipos de factores de crecimiento:

EGF (Epithelial Growth Factor) y relacionados, como el TGF- α (Transforming Growth Factor- α): Factor de crecimiento epidérmico y Factor de crecimiento transformante-alpha.

TGF- β (Transforming Growth Factor- β): Factor de crecimiento transformante-beta.

PDGF (Platelet-Derived Growth Factor): Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

FGF (Fibroblastic Growth Factor) y KGF (Keratinocyte Growth Factor): Factor de crecimiento de fibroblastos y Factor de crecimiento de queratocitos.

HGF (Hepatocyte Growth Factor): Factor de crecimiento de hepatocitos.

NGF (Nerve Growth Factor): Factor de crecimiento nervioso

IGF-1 (Insulin-like Growth Factor): Factor de crecimiento insulínico tipo 1

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) o Factor de crecimiento endotelial, que pertenece a la familia de los PDGF.

.Otros: Trombopoyetina, eritropoyetina, G-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Aunque no son considerados factores de crecimiento, la sustancia P y las proteínas de adhesión fibronectina y vitronectina están muy implicadas en los procesos de reepitelización, por lo que merecen ser considerados en este apartado.

También es de destacar la importancia de la interacción entre los factores de crecimiento y otras moléculas de señalización como son las citoquinas

3.2.1. FACTORES DE CRECIMIENTO DE LA LAGRIMA Y SU RELEVANCIA EN EL CIERRE DE HERIDAS EPITELIALES. RELEVANCIA DEL ESTROMA.

La integridad de la superficie ocular y su capacidad de cicatrización depende de un balance entre migración, proliferación, diferenciación, adhesión, motilidad y apoptosis celular. Para ello tiene que haber una interacción entre factores de crecimiento/citoquinas y matriz extracelular (Ljubimov et al., 2015). Existen una serie de factores de crecimiento presentes en la lágrima (Rolando y Zierhut, 2001), y en el humor acuoso (Welge-Lüssen et al., 2001), producidos por las células de epitelio corneal que son esenciales en el mantenimiento y renovación del epitelio corneal, así como para prevenir reacciones inmunes o angiogénicas indeseables. Dichos factores de crecimiento, mediante un complejo mecanismo de señalización paracrina y autocrina, facilitan la cicatrización corneal induciendo la proliferación del epitelio corneal y estromal así como la formación de la matriz extracelular.

De hecho, el mismo factor de crecimiento puede tener funciones antagónicas en función del microambiente extracelular. (Klenkler et al., 2004). Cuando existe una alteración en este equilibrio de factores de crecimiento, se pueden producir distintas patologías corneales, incluyendo edema, glaucoma o neovascularización.

3.2.1.1 EGF (Epidermal Growth Factor):

El EGF es una proteína presente en múltiples tejidos y fluidos, con importante función en la comunicación intercelular. Presenta gran homología con el TGF- α , el cual se incluye dentro de la familia de "Factores de crecimiento epidérmico", utilizando ambas el mismo receptor (EGFR) y realizando funciones similares. El receptor para EGF (EGFR) es en realidad una familia de 4 moléculas con actividad tirosin kinasa intrínseca, con diferente afinidad hacia el EGF. El EGF es un potente estimulador de la proliferación (estimula la síntesis de DNA) de las células epiteliales corneales y de fibroblastos, favoreciendo el cierre epitelial de heridas corneales en conejo (Ho et al., 1974). También estimula la migración epitelial a través de una vía (NF- κ B) que disminuye la expresión del PAX6. EGF también estimula la mitosis de hepatocitos y fibroblastos (Schultz et al., 1991). Esta actividad es importante en la cicatrización de heridas, situación en la que los queratinocitos, los macrófagos y otras células inflamatorias que migran a la zona dañada segregan EGF.

EGF EN EL OJO

El EGF está presente en la lágrima (van Setten et al., 1989) así como en el plasma sanguíneo (Hirata et al., 1982) y otros fluidos. Existe EGF en la lágrima corneal en una concentración 0,7-9,7 ngr/ml (Ohashi et al., 1989). La presencia de EGF en humor acuoso es más controvertida según distintos estudios.

En las células epiteliales corneales, el EGF tiene un mecanismo de acción tanto autocrino como paracrino. En el ojo, existen receptores de EGF de alta afinidad y de baja afinidad (Frati et al., 1972; Hongo et al., 1992). Se localizan sobre todo en el limbo esclerocorneal y en las células endoteliales. Por el contrario, existen pocos receptores de baja afinidad por EGF en el estroma corneal.

El EGF ya demostró, en los años 70', su eficacia en el cierre de heridas epiteliales corneales en conejo (Ho et al., 1974).

Favorece la proliferación de las células epiteliales y endoteliales (Ljubimov 2015) así como la migración de las células epiteliales y estromales (quimiotáctico) (Ljubimov 2015; Nishida et al., 1992; Schultz et al., 1992) También inhibe la diferenciación de células epiteliales. (Ljubimov 2015) y favorece la secreción de matriz extracelular (ácido hialurónico y fibronectina) (Ljubimov 2015).

Su efecto sobre la angiogénesis es controvertido. Se postula que quizá estimule la angiogénesis cuando está en combinación con otros factores como FGF (Klenkler et al., 2004).

Además, favorece la adhesión epitelial al aumentar formación de fibronectina por parte de células epiteliales, así como aumenta la afinidad del receptor de fibronectina. De hecho, la capacidad de reepitelización que tiene el EGF está mediada, al menos en parte, por la fibronectina, de modo que con anticuerpos antifibronectina se inhibe la migración epitelial inducida por EGF (Nishida et al., 1990)

Además, el TGF- α modula el efecto del EGF, siendo necesario para la formación de matriz extracelular tras una herida (Schultz G et al., 1992).

Por otro lado, el EGF, en presencia de sustancia P, aumenta la migración epitelial (Nakamura et al., 1997).

3.2.1.2. TGF- β (Transforming Growth Factor- β) :

TGF- β pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas para TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3) y otros. La molécula con una función más amplia es TGF- β 1 y es la que se utiliza como factor de referencia. Es una proteína homodimérica, producida por una gran variedad de células, como plaquetas, células endoteliales, linfocitos o macrófagos. Se sintetiza como un precursor inactivo, que debe ser escindido proteolíticamente para generar la proteína activa. Esta se une a dos receptores celulares (tipo I y II) con actividad serin-treonin kinasa, desencadenando la fosforilación de unos factores citoplásmicos llamados Smads, de los que existen diferentes formas (1,2,3,5,8). Estos Smads fosforilados se unen a Smad4 para formar heterodímeros que entran en el núcleo y se asocian a otras proteínas de unión a ADN para activar o inhibir la transcripción de genes específicos. TGF- β tiene muchos efectos diferentes, a veces opuestos, en función del tipo de tejido afectado y el tipo de daño.

En la mayoría de las células epiteliales, TGF- β es un inhibidor del crecimiento. El TGF- β inhibe la proliferación celular epitelial tanto en la presencia de EGF, modulándolo, como en su ausencia. El TGF- β no tiene efecto sobre la migración celular ni sobre la adhesión de celular epiteliales. Las propias células epiteliales tienen ARNm de TGF- β por lo que responden a señalización autocrina.

En las células mesenquimales, el efecto de TGF- β depende del entorno, pero puede promover la invasión y la metástasis durante el crecimiento de un tumor.

TGF- β es un importante agente implicado en procesos de fibrosis ya que estimula la quimiotaxis de los fibroblastos y aumenta la producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos. De hecho, es conocido que las heridas en piel durante el periodo embrionario se resuelven sin cicatriz. Esto se ha asociado a bajos niveles de TGF- β 1,

TGF- β 2 y PDGF y a altos niveles de TGF- β 3 en el embrión (Penn et al., 2012). Esta circunstancia de producir reparaciones tisulares sin cicatriz se ha demostrado experimentalmente también en córnea (Moller-Pedersen et al., 1998).

El TGF- β tiene una fuerte acción antiinflamatoria, pero puede aumentar algunas funciones inmunes.

TGF- β 2 EN EL OJO

Es la isoforma con mayor presencia en el ojo. Lo sintetizan por las células epiteliales corneales y sus receptores están en las células estromales corneales (Li y Tseng, 1995), en el limbo corneal y en centro del epitelio corneal.

Los niveles de TGF- β 2 latente en lágrima humana son de unos 7800pgr/ml (Pasquale et al., 1993). Puede ser activada en condiciones patológicas por parte de plasmina o catepsina.

Su función es inhibir fuertemente la proliferación de células epiteliales (la proliferación estimulada por KGF y HGF) e inhibir débilmente la proliferación de células epiteliales (la proliferación estimulada por EGF) (Honma et al., 1997) . Por el contrario, otros autores han mostrado la situación inversa, es decir que el TGF- β 2 tiene efectos de aceleración del cierre epitelial *in vivo* (Er y Uzmez , 1997), posiblemente por acelerar la migración.

Además, el TGF- β 2 estimula la proliferación y migración de fibroblastos corneales. (Andresen et al., 1997) y favorece la producción de matriz extracelular, sobre todo heparán y dermatán sulfatos (aunque disminuye la de keratán sulfatos). También inhibe el crecimiento endotelial, e inhibe el crecimiento de leucocitos

El TGF- β 2 favorece la aparición de receptores de alta afinidad de EGF, potenciándose el efecto del EGF en la presencia de TGF- β .

Por otro lado, el TGF- β está involucrado en el privilegio inmune de la córnea al regular la formación de los linfocitos T CD4+ (Niederhorn., 2007)

Finalmente, se cree que tiene efecto proangiogénico, aunque este punto es controvertido.

3.2.1.3. PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

El PDGF fue uno de los primeros factores de crecimiento caracterizado, propiciando el entendimiento del mecanismo de transducción de muchos factores de crecimiento. Químicamente es una glicoproteína dimerica que contiene 4 cadenas posibles (A, B, C

y D). Por ese motivo se han descrito 5 isómeros posibles : PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD. El receptor para el PDGF (PDGFR) pertenece a la clase de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, dentro del grupo de receptores transmembrana. Se han identificado dos tipos de PDGFR: el tipo alfa y el beta. (Matsui et al., 1989).

PDGF EN EL OJO

En el ojo solo existen las tres primeras formas (PDGF-AA, PDGF-AB, y PDGF-BB) . El PDGF-BB es producido por el epitelio, y los fibroblastos corneales tienen receptores de PDGF (Li y Tseng 1995). De este modo, esta molécula regula la migración y proliferación de queratocitos (Daniels y Khaw 2000).

Además, el PDGF-AA, PDGF-BB y sobre todo PDGF-AB favorecen la quimiotaxis de células epiteliales en presencia de fibronectina (Nishida et al., 2010).

El endotelio corneal tiene receptores de PDGF (Imanishi et al., 2000), por lo que responden a este factor favoreciendo la proliferación y la migración de las mismas *in vitro*.

3.2.1.4. FGF (Fibroblast Growth Factor)

Son una familia de más de 20 proteínas (con 4 receptores con actividad tirosin kinasa conocidos para FGF) que regulan proliferación, diferenciación y migración de células de origen mesodérmico (en menor medida de células epiteliales y endotelio), angiogénesis y formación de matriz extracelular.

De ellos, el FGF ácido (aFGF o también conocido como FGF-1) y FGF básico (bFGF o también llamado FGF-2) son los mejor caracterizados.

Cuando se liberan los FGF, se asocian con el heparán sulfato de la matriz extracelular, que sirve como almacén de factores inactivos. Los FGF contribuyen a diferentes tipos de respuestas, como la cicatrización de heridas, la hematopoyesis y la angiogénesis, así como el desarrollo embrionario.

FGF EN EL OJO

El FGF-1 se localiza sobre todo en la membrana de Bowman y membrana de Descemet y endotelio, mientras que el FGF-2 se localiza en epitelio, estroma y endotelio.

El FGF-2 estimula la proliferación de celular epiteliales, acelerando el cierre de defectos epiteliales (Rieck et al., 1992)

Tanto FGF-1 como FGF-2 inducen mitosis en las células de epitelio, estroma y endotelio corneal (Saghizadeh et al., 2001). Además, favorecen la migración de células endoteliales.

3.2.1.5 KGF (Keratinocyte Growth Factor)

El factor de crecimiento de queratinocitos (KGF: Keratinocyte Growth Factor), también conocido como FGF-7, es el miembro más divergente de la familia de FGF (Fibroblastic Growth Factor). Presenta una homología de aproximadamente un 30% con bFGF. El KGF se une al receptor de FGF-2b con una alta afinidad.

A diferencia de los demás miembros de la familia de FGF, este factor tiene una escasa actividad sobre células del mesénquima, pero estimula el crecimiento de las células epiteliales. Participa en la fase de epitelización durante la reparación de heridas.

KGF EN EL OJO

Lo producen las células estromales. Actúa sobre células epiteliales, favoreciendo la proliferación de las células epiteliales limbares (Sotozono, et al., 1995). Por lo tanto, tiene un papel importante durante el proceso de reparación epitelial y en la modulación de *stem cells* limbares hacia células amplificadoras transitorias.

No afecta a la migración ni a la diferenciación celular.

Otro miembro de la familia KGF, el KGF-2 (o FGF-10) también estimula la proliferación de las *stem cells* epiteliales (Wang et al, 2010).

3.2.1.6 HGF (Hepatocyte Growth Factor):

Lo sintetizan las células de origen mesenquimal (en la córnea, por parte de los queratocitos) en forma inactiva (pro-HGF) y se activa ante una herida, estímulo inflamatorio o por parte de las proteasas de la cascada de la coagulación. Tiene, además, efecto mitogénico sobre hepatocitos.

HGF EN EL OJO

Sus receptores están sobre todo en la córnea central, en sus 3 capas: epitelio, estroma (principalmente) y endotelio. (Ljubinov et al., 2015)

Su concentración en lágrima es de unos 200 pgr/ml (Tervo et al., 1997). También se encuentra en el humor acuoso, sugiriendo una posible función en el mantenimiento de las células del endotelio corneal.

Sus funciones son estimular la proliferación (Wilson et al., 1993) y migración (Saghizadeh et al., 2011) de células epiteliales (sobre todo) y endoteliales. También regula la apoptosis de células epiteliales corneales (Kakazu et al., 2004) e inhibe la diferenciación terminal de las células epiteliales.

Además, facilita el cambio de forma de las células epiteliales a un aspecto fibroblasto-like (Miyagi et al., 2018).

La vía que regula HGF es una de las principales involucradas en el retraso de epitelización que tienen los pacientes diabéticos (Saghizadeh et al., 2011).

3.2.1.7. NGF (Nerve Growth Factor)

EL NGF fue descubierto en 1947 por Rita Levi-Montalcini (1909-2012) y por Stanley Cohen de la Universidad de Washington. Por este hallazgo, ambos investigadores recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1986. Es un dímero que realiza su efecto a través de la unión a un receptor tirosin kinasa de alta afinidad en la membrana de las células diana.

El NGF estimula la angiogénesis en diferentes tejidos y aumenta la proliferación de las células endoteliales. Además, favorece la regeneración de fibras nerviosas periféricas.

NGF EN EL OJO

Estimula la proliferación y diferenciación de células epiteliales, las cuales expresan receptores de NGF, aunque en menor grado que el EGF. De hecho, mejora el cierre de úlceras neurotróficas *in vivo* (Lambiase et al., 1998; Bonini et al., 2018). Induce la liberación de moléculas inflamatorias, de otros factores de crecimiento como TGF- β y de moléculas implicadas en la vascularización.

El receptor de alta afinidad por el NGF (TrkA) está las células del epitelio y endotelio, y en menor grado en células del estroma.

El NGF en colirio se ha mostrado beneficioso para el cierre de defectos epiteliales persistentes en modelo animal y humanos (Lambiase et al., 1998; Bonini et al., 2018) ya que NGF estimula la migración del epitelio corneal. Además, produce un aumento de MMP-9 y del clivaje de integrinas- β 4 (Blanco-Mezquita et al., 2013).

3.2.1.8. IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)

El IGF-1 es una hormona de 70 aminoácidos, similar en estructura molecular a la insulina. Juega un papel importante en el crecimiento infantil, mientras que en el adulto continúa teniendo efectos anabolizantes. Se une a un receptor específico de actividad tirosin kinasa.

El IGF-1 es un estimulador del crecimiento y proliferación celular epitelial y un potente inhibidor de la muerte celular programada.

IGF-1 EN EL OJO

Favorece la migración celular epitelial (Lee et al., 2006), la proliferación epitelial (Yanai et al., 2006,) y la diferenciación epitelial (Trosan et al., 2012).

Puede actuar sinérgicamente con la sustancia P favoreciendo el cierre epitelial *in vitro* e *in vivo* tanto en ojos con neurotrofia como sin ella (Nagano et al., 2003; Yamada et al., 2004; Yanai et al., 2015).

Es de resaltar que la combinación de gotas de sustancia P + IGF-1 mejora úlceras corneales incluso en casos con sección de ramas del trigémino, al contrario que el NGF que mejora úlceras de componente neurotrófico pero no si hay sección nerviosa. Esto es debido a que es precisa cierta integridad de la vía nerviosa para que haya una secreción de sustancia p e IGF-1, moléculas necesarias para el cierre *in vivo* de la herida corneal. Si hay sección nerviosa, aunque pongamos NGF exógeno, no habrá sustancia P, ni IGF-1, por lo que el cierre de la herida no será bueno (Nishida et al., 2007).

3.2.1.9. OTROS

- a) Timosin- β 4 favorece reepitelización corneal, disminuye inflamación, inhibe apoptosis, favorece migración epitelial (Ljubimov et al., 2015)
- b) IL-6 y IL-10: mejoran migración y cierre epitelial (Arranz-Valsero et al., 2014).
- c) Opioid growth factor.
- d) Encefalina.

En la tabla 1

se muestran las características más importantes de los principales factores de crecimiento que actúan a nivel de la superficie ocular.

Acciones a nivel de la superficie ocular	
EGF	<ul style="list-style-type: none">- Favorece la proliferación y migración de células epiteliales y fibroblastos.- Aumenta la síntesis de fibronectina.
FGF	<ul style="list-style-type: none">- Favorece la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la reparación tisular.- Favorece la síntesis y contracción de la matriz extracelular.- Favorece la migración de los queratocitos.
VEGF	<ul style="list-style-type: none">- Induce la proliferación y migración de células endoteliales (efecto angiogénico).
HGF	<ul style="list-style-type: none">- Favorece la proliferación y migración de células epiteliales.- Inhibe la diferenciación terminal de células epiteliales.
PDGF	<ul style="list-style-type: none">- Favorece la migración y proliferación de fibroblastos y células inflamatorias, así como la producción de fibronectina.- Favorece la migración de células epiteliales en presencia de fibronectina.- Induce la migración de células endoteliales corneales.
Fibronectina	<ul style="list-style-type: none">- Favorece la migración de células epiteliales en los procesos de reparación corneal.

Tabla 1. Factores de crecimiento involucrados en la superficie ocular

En la tabla 2 se muestran las concentraciones de las moléculas más involucradas en la proliferación y migración celular tanto PRP sin activación con calcio, como en suero autólogo y en PRGF

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

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

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

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

Tabla 2 Concentraciones de factores de crecimiento según hemoderivado y acotado según edad del donante de la sangre. Obtenido de Freire et al., 2012

3.3. NUEVAS TERAPIAS EN LA REGENERACIÓN CORNEAL

3.3.1 Células madre

Existen casos de DEP secundario principalmente a una depleción de células madre o a una alteración en el microambiente de las mismas, lo que se conoce como insuficiencia limbar. Para su reparación, existen diferentes formas de reemplazar dichas células madre dañadas. Fueron Kenyon y Tseng los que describieron por primera vez el trasplante de limbo autólogo como tal hace casi 30 años (Kenyon y Tseng, 1989), siendo el grupo liderado por Thoft el que describió en 1990 el primer trasplante de limbo alogénico (Turgeon et al., 1990). En dichos trasplantes es de vital importancia que los injertos limbares tengan una conjuntiva adyacente sana, de modo que si el receptor no dispone de conjuntiva sana, el trasplante de limbo deberá asociarse a trasplante conjuntival sano. Si, además, el origen de las células es no autólogo, el paciente deberá ser inmunosuprimido como si se tratara de un trasplante de órgano sólido (Holland et al., 1996).

Una variante de dichos trasplantes es la expansión *ex vivo* de células madre de diferente origen para, posteriormente, ser transferidas al ojo dañado. La fuente más frecuentemente usada de células madres para ser expandidas en laboratorio es el limbo del ojo contralateral (Pellegrini et al., 1997). También puede usarse, aunque con peor pronóstico, limbo de donante (Koizumi et al., 2001) o incluso, mucosa oral autóloga (Kolli et al., 2014), células mesenquimales adiposas (Nieto et al., 2013) o células mesenquimales de médula ósea (Rohaina et al., 2014), entre otras.

3.3.2. Hemoderivados (PRPs)

Desde finales de los años 90, se ha puesto de moda la utilización de plaquetas como vehículos liberadores de concentraciones suprafisiológicas de factores cicatrizantes para favorecer y acelerar el cierre de heridas de diferentes tejidos como músculo, tendón, piel, etc. (Anitua et al., 2006) Estos preparados se llaman genéricamente PRPs (Platelet-Rich Plasma) y ya han sido utilizados para acelerar el cierre de heridas en piel (Molina-Minano et al., 2009), de quemaduras, incluyendo quemaduras por radioterapia (Norbert et al., 2010). También se han utilizado en diferentes tipos de cirugía como cosmética, plástica, dental (Marx et al., 1998), ortopédica (Anitua et al., 2007) y cardiorrástica (Everts et al., 2006).

Los tratamientos con concentrados de plaquetas para su uso tópico o infiltrado son una baza terapéutica en la medicina regenerativa (Dohan Ehrenfest et al., 2014). Las plaquetas autólogas ya han sido usadas en cirugía maxilo-facial para consolidación de implantes de titanio y remodelación ósea. También se han usado en cirugía ortopédica para artroplastia de rodilla, degeneración de discos intervertebrales, reconstrucción de ligamento cruzado anterior, reparar roturas de tendón y reparación de músculos. En cirugía plástica se usa para tratamiento de úlceras de piel resistentes al tratamiento habitual y en regeneración de nervio facial.

Históricamente se empezaron a desarrollar por el interés que existía en la matriz de fibrina como material que facilita el cierre de la heridas (Matras et al., 1970).

Posteriormente se desarrollaron los PRPs, debido a las propiedades de cierre de heridas por parte de las plaquetas, inicialmente en heridas corneales (Rosenthal et al., 1978). Finalmente, se da preferencia a los factores de crecimiento (circulantes o provenientes de las plaquetas) para la regeneración tisular (Marx et al., 1998).

Su uso es aún controvertido, tanto en patología músculo esquelética (Andía et al., 2014) como en la patología oftálmica, donde los estudios realizados son puramente descriptivos y nunca comparativos, randomizados, multicéntricos, doble ciego, por lo que la evidencia científica sobre su uso en oftalmología no pasa de ser “la opinión del experto” (grado de evidencia C). De hecho, aún no hay respuesta de por qué algunos pacientes responden a los tratamientos con PRP y otros no. Además, existen diferencias interindividuales muy importantes en las características del PRP final obtenido. Posiblemente una formulación de PRP sea adecuada para ciertas patologías y no para otras, por lo que la individualización de la preparación en función de la patología será una circunstancia clave a desarrollar en el futuro. Además, la posología es muy probable que también tenga gran importancia. Es decir, el uso de los PRPs se ha realizado y aún

se realiza con unos conocimientos muy limitados sobre sus propiedades celulares y moleculares, sobre los mecanismos de acción, sobre el tiempo que, en el caso del s-PRGF, debe mantenerse la liberación de las plaquetas antes de retirar el coágulo con las plaquetas adheridas, etc

El desarrollo de los concentrados de plaquetas, cuyos acrónimos son PRP (Platelet-Rich Plasma) o PRF (Platelet-Rich Fibrin) están siendo objeto de un gran desarrollo en cuanto a sus aplicaciones clínicas. De hecho, su uso está siendo objeto de una sobreexplotación aprovechando la fascinación que provoca en los clínicos todo aquello desconocido en relación a la biología celular y molecular. Para ello, su utilización con frecuencia se asocia a terminología como “medicina regenerativa”, “células madres” o “factores de crecimiento” que producen gran seducción en los profesionales deseosos de encontrar nuevas opciones terapéuticas para sus pacientes.

Básicamente son derivados de la separación de los diferentes componentes de la sangre mediante diferentes protocolos de centrifugación (Bielecki et al., 2012) concentrando elementos considerados terapéuticos como las plaquetas, factores de crecimiento, leucocitos y fibrinógeno/fibrina y descartando elementos no útiles como los hematíes (Dohan Ehrenfest et al., 2012)

Los PRPs han tenido una historia de confusión en cuanto a la terminología, caracterización y clasificación de las distintas variantes. En principio, podríamos consensuar una clasificación de los mismos (Dohan Ehrenfest et al., 2012; Dohan Ehrenfest et al., 2014) que dividiría todos los PRPs en 4 familias, en función de su contenido celular y en fibrina:

1. Pure-Platelet-Rich Plasma (P-PRP): productos sin leucocitos y con una baja densidad de malla de fibrina después de su activación. Estos productos se pueden usar como soluciones líquidas o como geles activados. Por lo tanto, pueden ser aplicados tópicamente, ser inyectados o ser colocados sobre una herida. Entre estos productos se encontraría el PRP conseguido mediante la técnica patentada PRGF-Endoret, con su variante oftalmológica que hemos bautizado como s-PRGF (Serum derived from Plasma Rich in Growth Factors) y que es objeto de estudio en esta tesis.
2. Leukocyte and Platelet-Rich Plasma (L-PRP): productos con leucocitos y una baja densidad de malla de fibrina después de su activación. Por lo tanto, también pueden ser usados como soluciones líquidas o como geles activados.

Existen muchos protocolos patentados por diferentes compañías para la obtención de estos productos.

3. Pure Platelet-Rich Fibrin (P-PRF) or Leukocyte-Poor Platelet-Rich Fibrin: productos sin leucocitos pero una malla de fibrina muy densa, lo cual provoca que sólo pueda ser aplicado en forma sólida.
4. Leukocyte and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF): productos con leucocitos pero una malla de fibrina muy densa, lo cual provoca que sólo pueda ser aplicado en forma sólida.

Además, para crear aún más confusión, existen diferentes modos de activar los PRPs: con calcio, con calor / frío, con titanio (Mustafa Tunali et al., 2014)

Debido a sus diferentes contenidos, cada producto debería tener unas indicaciones clínicas distintas, aún por determinar.

Existen estudios experimentales *in vitro* que demuestran que la liberación de factores de crecimiento como el TGF- β 1, PDGF-AB, el VEGF y tres proteínas relacionadas con la coagulación (trombospondina 1, fibronectina y vimentina) se mantiene más eficazmente a lo largo de los días en formulaciones con alta densidad de malla de fibrina (Dohan Ehrenfest et al., 2009) que en los P-PRPs, que liberan la mayoría de sus factores de crecimiento en las primeras horas, y se disuelve la malla de fibrina completamente en 3 días (Dohan Ehrenfest et al., 2012). Esta circunstancia es beneficiosa en el caso del s-PRGF, donde el líquido sobrenadante tras la retirada del coágulo de fibrina debe tener disuelta la mayor cantidad de factores de crecimiento. Desgraciadamente, tras dos horas de formación del coágulo, la malla de fibrina, con las plaquetas adheridas a ella y presumiblemente aún liberando factores de crecimiento, es retirada. De este modo, el s-PRGF contiene exclusivamente los factores de crecimiento que se han liberado desde las plaquetas al suero circundante durante esas dos horas. Sería recomendable valorar otras formulaciones de s-PRGF obtenidos tras un mayor tiempo de liberación de factores de crecimiento y cuantificarlos con objeto de determinar si el tiempo entre la activación de las plaquetas y la retirada de la malla de la fibrina es determinante o no.

El PRGF tiene una concentración moderada de plaquetas, lo cual está asociado a beneficios biológicos óptimos según algunos autores (Anitua et al., 2013). Además, es un tipo de PRP en el que se han eliminado los leucocitos, evitando los efectos proinflamatorios de las proteasas e hidrolasas que éstos pueden liberar (Anitua. et al., 2013). Otros grupos (Mishra et al., 2012; Pinto at al., 2018) niegan un beneficio en

retirar los leucocitos de los PRPs, ya que éstos tienen actividad antiinfecciosa (Moojen et al., 2008) y liberan mediadores con efecto analgésico como la IL-4, IL-10, beta endorfina y otros opioides (Bielecki et al., 2012). Posiblemente los leucocitos sean beneficiosos pero dependiendo de cuáles (monocitos, linfocitos, granulocitos), de su cantidad y su estado de activación (Dohan Ehrenfest et al., 2014) y según la patología a tratar.

Para el uso del PRGF como colirio oftalmológico, realizamos una pequeña modificación sobre el protocolo original de fabricación de PRGF, obteniéndose un suero derivado de PRGF, en el cual no obtendremos una liberación mantenida de factores de crecimiento como cuando lo usamos en forma de coágulo de fibrina salpicado de plaquetas activadas que liberan lentamente los factores, sino que consiste básicamente en la liberación de los factores de las plaquetas al sobrenadante, retirándose posteriormente las plaquetas envueltas en la malla de fibrina (Lopez-Plandolit et al., 2010).

4. HEMODERIVADOS EN LA REGENERACIÓN CORNEAL

4.1. PLAQUETAS

De los elementos que forman la sangre, la plaqueta fue el último en ser descubierto. Se considera al francés Alfred Donné (1801–1878) como el descubridor de las plaquetas, aunque también se atribuye al médico inglés George Gulliver (1804–1882).

Las plaquetas o trombocitos son fragmentos anucleados del citoplasma de otras células llamadas megacariocitos. Tienen un papel fundamental en la hemostasia y como fuente de factores de crecimiento. Se acumulan en el lugar donde el endotelio está disfuncional o dañado dentro de la pared arterial, lo que inicia la formación del trombo. Contienen una gran cantidad de sustancias biológicamente activas que facilitan la reparación tisular, la angiogénesis, la inflamación y la respuesta inmune. Por tanto, su uso terapéutico para acelerar la cicatrización natural tiene sentido (Anitua et al., 2004)

A medida que una plaqueta va envejeciendo, aumenta proporcionalmente su contenido en proteínas que adquiere por endocitosis (pinocitosis y/o endocitosis mediada por receptores) del torrente plasmático. Se considera normal un número de plaquetas de 150.000-350.000/ μ l de sangre. Un adulto produce cada día una media de alrededor de $1 \cdot 10^{11}$ plaquetas. El bazo secuestra continuamente (aunque transitoriamente) un tercio de las plaquetas circulantes. Cuando se da una esplenomegalia, se observa una trombocitopenia (disminución del número de plaquetas) debido a un aumento en el porcentaje de plaquetas secuestradas transitoriamente por el bazo.

Introducción

Su tamaño es de 1-2 μm , y su vida media es de unos 8-12 días. Los megacariocitos maduran en la médula ósea a través de una duplicación nuclear sin división citoplasmática, resultando las llamadas células gigantes. Las organelas de dichas células gigantes se organizan en dominios que conforman la futura plaqueta. Invaginaciones de la membrana citoplasmática de las células gigantes, facilitan la formación de estructuras citoplasmáticas alargadas, llamadas proplaquetas que se van llenando de gránulos citoplasmáticos gracias a un sistema de microtúbulos citoplasmáticos que actúan como guía para dichas organelas. Finalmente, el megacariocito (o la célula gigante) sale desde la médula ósea al torrente circulatorio donde se fragmenta en plaquetas debido, seguramente, a las fuerzas mecánicas del torrente circulatorio, seguramente y sobre todo en la circulación pulmonar (George et al., 2000).

El proceso de desarrollo de los megacariocitos está controlado por diferentes hormonas y citoquinas, principalmente la trombopoyetina y la IL-3, -6 y -11.

La plaqueta inactiva tiene forma de disco. En condiciones fisiológicas, las plaquetas circulan en forma no activa y expresan en su superficie un número relativamente pequeño de muchas de las moléculas que, en estado activado, van a facilitar su interacción con otras plaquetas y otras células de su entorno. Al activarse, adopta una forma esférica con extensiones dendríticas que facilitan su adhesión. Su citoplasma es rico en actina y miosina que facilita este cambio de forma y la retracción del coágulo.

Además, la plaqueta tiene un único y elaborado sistema de invaginaciones de la membrana celular llamado Sistema Canalicular Abierto u Open Canalicular System (OCS). (Fig. 6)

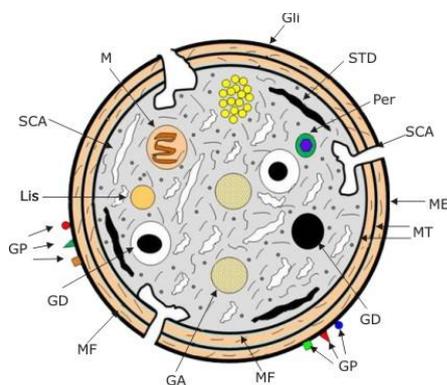


Fig. 6. Esquema de la ultraestructura de una plaqueta. GA Gránulo α ; GD: gránulo denso; Gil: glicocálix; GP: glicoproteínas; Lis: lisosomas; M: mitocondria; MF: microfilamento; MT: microtúbulos; ME: membrana externa; Per: peroxisoma; SCA: sistema canalicular abierto; STD: sistema tubular denso (Adaptado de Fernández-Delgado et al., 2012)

Las plaquetas contienen diferentes tipos de gránulos (fundamentalmente gránulos densos, gránulos α y lisosomas) desde los que al ser activadas liberan diferentes factores almacenados en ellos y que a su vez estimulan más la actividad de la propia plaqueta. Estos factores tienen también efectos biológicos sobre otras células del entorno plaquetario. El proteoma de la plaqueta consta de más de 2000 proteínas de las que están identificadas más de 600 (García et al., 2004). Las plaquetas activadas por trombina liberan más de 300 proteínas diferentes, muchas de ellas relacionadas con reacciones inflamatorias. Además, las plaquetas pueden interactuar con patógenos bacterianos e incluso expresar receptores del complemento lo que las convierte también en células involucradas en la inmunogenicidad del organismo. De hecho, las plaquetas expresan y almacenan proteínas antibacterianas llamadas trombocidinas.

Tiene 3 tipos de gránulos secretores.

1. Gránulos densos: que segregan ADP y Calcio, necesarios para las reacciones de agregación plaquetaria y reacciones de coagulación. También contienen serotonina, la cual produce vasoconstricción, aumento de la permeabilidad capilar y regeneración hepática. También contienen histamina, noradrenalina y dopamina. Su volumen es aproximadamente el 1% del volumen total de la plaqueta
2. Lisosomas: con hidrolasas, catepsina D y E, elastasa y otros enzimas de degradación.
3. Gránulo α : están definidos por unos criterios morfológicos al microscopio electrónico (características específicas de la membrana periférica del gránulo, un nucleoide electrodensos que contiene citoquinas y proteoglicanos, una zona adyacente menos electrodensa que contiene fibrinógeno, y una zona periférica electrolumínica que contiene factor de von Willebrand). También se pueden identificar por inmunofluorescencia (fibrinógeno, P-selectina, Factor de von Willebrand).

Los gránulos α contienen una gran cantidad de proteínas, algunas formadas desde la fase de megacariocitos, siendo producidas en el retículo endoplásmico y exportadas al aparato de Golgi, en el que maduran y se empaquetan en forma de vesículas. Así tenemos por ejemplo el factor de von Willebrand, PDGF, P-selectina, RANTES, factor plaquetario 4 (antiangiogénico, inhibidor de la proliferación endotelial pero con gran capacidad quimiotáctica para neutrófilos y fibroblastos. Seguramente participe también en el reclutamiento de stem cells) (Zhang et al., 2004), y otros.

Introducción

Otras proteínas de los gránulos α son adquiridas por *endocitosis mediada por receptores* durante su vida en el plasma (ej. Fibrinógeno). Otras son adquiridas por *pinocitosis* en el plasma (ej. Albumina, inmunoglobulinas).

Todas estas vesículas (con productos adquiridos por endocitosis o por síntesis *de novo*) se unen en los cuerpos multivesiculares, que al madurar, unificando la membrana de todas las vesículas, producen los gránulos α .

Existen unos 50-80 gránulos α por cada plaqueta. Tienen un tamaño entre 200-500 nm (Frojmovic et al., 1982) y un volumen total de aproximadamente el 10% del volumen plaquetario total, con una superficie de membrana granular de unos 14 μm^2 . Los gránulos α son bastante heterogéneos en cuanto a su contenido específico, pudiendo existir algunos que no tiñen para fibrinógeno y otros que no tiñen para factor de von Willebrand, etc. produciéndose diferentes subpoblaciones de plaquetas en función del contenido de sus gránulos α . Los gránulos α se forman ya desde la fase de megacariocito y siguen aumentando su contenido durante la fase de plaqueta.

Aunque las plaquetas son anucleadas, pueden sintetizar proteínas, como la IL-1 β , al procesar pre-RNA preformado, al excindir intrones del IL-1 β pre-RNA, consiguiendo que madure y pueda ser trasladado a proteína.

La plaqueta permanece inactiva hasta que un ligando fisiológico (ADP, trombina, factor activador de plaquetas, colágeno, adrenalina, etc) interactúa con los receptores agonistas de la membrana celular (Furie et al., 2006). La activación de las plaquetas conlleva una serie de modificaciones que afectan tanto a la morfología como a la funcionalidad de las mismas. Desde un punto de vista morfológico, las plaquetas pierden su configuración discoide habitual y emiten pseudópodos por la activación del sistema contráctil del citoesqueleto. (Fig. 7)

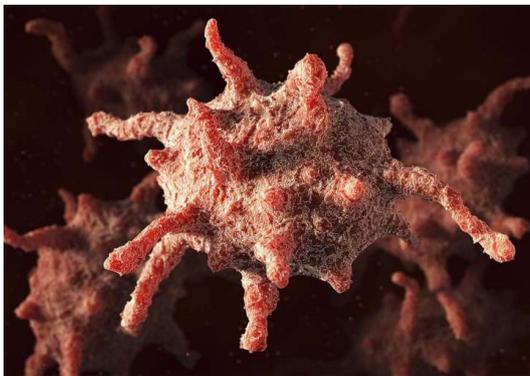


Fig. 7. Plaqueta activada

Cuando se activa la plaqueta, los gránulos α se fusionan con la membrana plasmática de la plaqueta o a la membrana del sistema OCS (Open Canalicular System), aumentando su superficie de membrana celular hasta de 2 a 4 veces.

A través de estudios de proteómica se ha demostrado que los gránulos α liberan cientos de proteínas bioactivas con gran versatilidad funcional. De este modo, aunque las plaquetas originalmente se asociaron a su participación en la trombosis y hemostasia, cada vez se da más importancia a dichas proteínas de origen plaquetario en inflamación, aterosclerosis, capacidad antimicrobiana, cierre de heridas epiteliales, angiogénesis y malignización celular (Blair et al., 2009)

El contenido de los gránulos α plaquetarios va desde proteínas de membrana que luego se expresan en la membrana plasmática de la plaqueta (integrinas, receptores de inmunoglobulinas y otros), hasta proteínas solubles que se liberan al espacio extracelular. Hay proteínas de membrana que también se expresan de forma habitual en la membrana plaquetaria. Otras proteínas de membrana de los gránulos α no se expresan en la membrana plasmática de la plaqueta (P-selectina).

Las proteínas de los gránulos α pueden tener diferentes funciones: coagulación, inflamación, aterosclerosis, antimicrobianos, angiogénesis, reparación de heridas, malignización:

- Coagulación: las plaquetas segregan muchos mediadores de la coagulación sanguínea (fibrinógeno, factor von Willebrand), proteínas de adhesión plaquetaria (fibronectina, vitronectina y trombospondina-1). La fibronectina facilitaría la actividad mitogénica del PDGF. También contienen factores que participan en la hemostasia (factor V, XI, XIII). También contienen protrombina. Así mismo, liberan proteasas inhibitorias como el Inhibidor de la activación del plasminógeno -1 (PAI-1) y α -2 antiplasmina, que limitan la fibrinólisis mediada por plasmina. También contienen proteínas que limitan la progresión de la coagulación: antitrombina y C1 inhibidor, proteasas nexin-2, etc.
- Inflamación (May et al., 2008): liberando sustancias quimiotácticas o expresando receptores que facilitan la adhesión de las plaquetas. Las plaquetas activas tienen la capacidad de reclutar células inflamatorias como neutrófilos, monocitos, linfocitos. También liberan altas concentraciones de factores proinflamatorios y factores moduladores de la inmunidad, que inducen el reclutamiento, activación y diferenciación de células hematopoyéticas y vasculares. En este sentido tenemos

el CXCL 4 que induce la adhesión de neutrófilos y su degranulación, activación de monocitos y diferenciación de los monocitos a macrófagos. CXCL4 favorece la adhesión de monocitos a células endoteliales. CXCL7 induce la quimiotaxis de neutrófilos y su adhesión a células endoteliales.

- Aterosclerosis: es una enfermedad inflamatoria crónica. CCL5 y CXCL12 han sido detectadas en placas ateromatosas.
- Efecto antimicrobiano (Klinger et al., 2002): las plaquetas son las primeras células que reconocen un daño endotelial con colonización microbiana, acumulándose en dicha zona. Las plaquetas interactúan directamente con virus, bacterias, hongos y protozoos, en incluso se unen a eritrocitos infectados por el plasmodium, matando al parásito (McMorran et al., 2009). Las proteínas microbicidas plaquetarias son CXCL4, timosin- β 4, derivados de CXCL7 (algunos de los cuales, originan otros péptidos microbicidas como las trombocidinas-1 y -2) y CCL5 (RANTES). Los gránulos α también contienen complemento, en concreto C3a y C5a, que activan la cascada del complemento. También tienen reguladores de la activación del complemento como C1 inhibidor y factor H del complemento.
- Angiogénesis (Kisucka et al., 2006). Las plaquetas contienen factores pro- y anti-angiogénicos. Contienen VEGF (sobre todo VEGF-A, con efecto trófico sobre las células endoteliales y que estimula la adhesión de leucocitos a células endoteliales. Esta función es suprimida por el HGF, PDGF, TGF- β 1 (antiangiogénico pero promueve la formación de MMPs y es quimiotáctico para células inflamatorias, facilitando la formación de tejido conectivo por parte de fibroblastos pero retrasando la reepitelización) , FGF-2, EGF, HGF, IGF (Insulin-like growth factor 1), que, en conjunto promueven el reclutamiento, crecimiento y proliferación de células endoteliales y fibroblastos. Estas proteínas son secretadas por una variedad de células inflamatorias, pero es relevante su contenido en plaquetas por la velocidad que tienen estas en acumularse en zonas de heridas vasculares. Es esencial para la reparación de heridas el PDGF (platelet-derived-growth-factor) en sus isoformas -AB y -C, siendo un potente quimiotáctico y estimulador de la proliferación celular. También tienen otros factores proangiogénicos como CXCL2, MMP-1, -2, -9. Por otro lado, los alfa-gránulos contienen proteínas inhibitoras de la angiogénesis, como TSP-1 (trombospondina-1, molécula antiangiogénica, potente inhibidor de la proliferación de células endoteliales y estimulador de la apoptosis de células endoteliales, además de facilitar la expresión de moléculas de adhesión como

VCAM-1 e ICAM-1), CXCL4, angiostatina, endostatina, TIMPs -1 y -4. Estudios recientes sugieren que existirían diferentes subpoblaciones de gránulos α según contengan proteína pro-antigénicas o anti-angiogénicas.

- Cierre de heridas: las plaquetas facilitan el cierre de heridas tanto *in vitro* como *in vivo* (Nurden et al., 2008). Hay trabajos *in vitro* que demuestran que sobrenadantes enriquecidos en proteínas de gránulos α aumentan la proliferación y migración de células osteogénicas (Kark et al., 2006) y estimulan la proliferación *in vitro* de células de tendón humano (Anitua et al., 2005), estimula la regeneración de tejido periodontal en perros (Nagai et al., 2005), estimula el cierre de heridas cutáneas en ratas diabéticas (Moulin et al., 1998), estimula el cierre de úlceras neuropáticas de pie diabético (Margolis et al., 2001), etc.
- Malignidad celular: Las plaquetas están implicadas en la estabilidad, crecimiento y metástasis de tumores. De hecho, una trombocitopenia aguda puede resultar en una desestabilización del tumor con hemorragia intratumoral (Ho et al., 2008). Los pacientes con cáncer tienen una mayor concentración de VEGF y angiopoyetina-1 en sangre (gran parte de ellos mismo proviene de las plaquetas). Al parecer esto se conseguiría a través de moléculas de adhesión (P-selectina, vitronectina, fibronectina) que facilitarían la adhesión de las plaquetas a las células tumorales, pudiendo, de esta forma, metastatizar.

Otras proteínas provenientes de las plaquetas son el Tromboxano A₂, potente vasoconstrictor derivado del ácido araquidónico; la esfingosina-1 fosfato, que se libera durante la formación del coágulo, estimulando mitogénesis.

Un dato a tener en cuenta al preparar los derivados de plaquetas es evitar la toma de aspirina en los días antes de la extracción ya que la aspirina reduce la secreción proteica de las plaquetas (Nurden et al., 2008).

4.2.PRPs EN OFTALMOLOGIA

Entre los PRPs usados en oftalmología, la primera referencia bibliográfica data del año 1978, cuando Rosenthal utilizó una mezcla de trombina-fibrinógeno y plaquetas para cerrar heridas corneales penetrantes experimentales (Rosenthal et al., 1978).

El hemoderivado más frecuentemente usado en oftalmología y del que hay mayor experiencia es, sin lugar a dudas, el suero autólogo. Hay muchísima bibliografía acerca

de su uso, tanto para el tratamiento del síndrome de ojo seco (Tsubota et al., 1999a) como para el tratamiento del defecto epitelial persistente (DEP) (Tsubota et al., 1999b) así como sobre la cuantificación de su contenido en factores de crecimiento.

En oftalmología también se han descrito, para el tratamiento del DEP, el suero de cordón umbilical (Vajpayee et al., 2003), el PRP (Plasma Rich in Platelets) (Alio. et al., 2007) y el s-PRGF (serum derived from Plasma Rich in Growth Factors) para el tratamiento del síndrome de ojo seco (López-Plandolit et al., 2011). y de los defectos epiteliales persistentes (López-Plandolit et al., 2010).

Además, los hemoderivados también se han utilizado como una alternativa de tratamiento en el síndrome de ojo seco severo (Alio et al., 2007; Lopez-Plandolit, et al., 2011; Tsubota, et al., 1999) y como coadyuvante para el cierre de agujeros maculares (Pâques et al., 1999).

Varios de estos hemoderivados han sido evaluados por nuestro grupo en cuanto a la cuantificación de factores de crecimiento que contienen (Freire et al., 2012). El suero autólogo, el PRP sin activar y el s-PRGF no muestran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su contenido en PDGF, FGF y Fibronectina. Sin embargo, el suero autólogo muestra mayor cantidad de HGF que los otros dos hemoderivados, mientras que el s-PRGF muestra mayor cantidad de EGF que el suero autólogo y éste, a su vez, mayor cantidad que el PRP sin activar. Sobre el VEGF, el PRP es el hemoderivado con menor cantidad.

No existen trabajos realizados por los mismos grupos y con mismos métodos de detección que ofrezcan la cuantificación de los factores de crecimiento más habituales tanto en lágrima como en s-PRGF por lo que la tabla que mostramos a continuación (Tabla 3) es un compendio de los valores ofrecidos en distintos trabajos de la literatura.

	EGF (pg/ml)	FGF (pg/ml)	VEGF (pg/ml)	HGF (pg/ml)	PDGF (ng/ml)	IGF (pg/ml)	NGF (pg/ml)	Fibronectina (µg/ml)	TGF-β1 (pg/ml)	TGF-β2 (pg/ml)
Lágrima (Sujetos normales)	647± 67.87 <small>(Carreño et al., 2017)</small>		249.59± 17.84 <small>(Carreño et al., 2017)</small>							24683.08± 2208.16 <small>(Carreño et al., 2017)</small>
	3000-8000 <small>(Klenkler et al., 2007)</small>					400 <small>(Klenkler et al., 2007)</small>	50 <small>(Klenkler et al., 2007)</small>		800-38000 <small>(Klenkler et al., 2007)</small>	2000-8000 <small>(Klenkler et al., 2007)</small>
	200-9700 <small>(Ohashi et al 1989; Geerling et al 2004)</small>	No se detecta <small>(Schecher et al 2000)</small>	19000 <small>(Vesaluoma et al 1997)</small>	200-500 <small>(Li et al 1996; Tervo et al 1997)</small>	0.9-1,7 <small>(Vesaluoma et al. 1997)</small>			21-25 <small>(Fukudaet al 1996; Geerling 2004)</small>		
s-PRGF (Sujetos normales)	489.12± 95.48 <small>(Freire et al., 2012)</small>	58.27 ± 41.25 <small>(Freire et al., 2012)</small>	124.60± 79.64 <small>(Freire et al., 2012)</small>	83.74±7 9.42 <small>(Freire et al., 2012)</small>	15.58± 4.65 <small>(Freire et al., 2012)</small>			31.83± 3.56 <small>(Freire et al., 2012)</small>		

Tabla 3: Cuantificación de los distintos factores de crecimiento según la literatura actual tanto en lágrima de sujetos sanos, como en s-PRGF de sujetos sanos.

Llegado a este punto teórico, encontramos recomendable realizar estudios controlados sobre la eficacia del s-PRGF, tanto *in vitro* como *in vivo*, buscando determinar los mecanismos celulares implicados en el cierre del defecto epitelial corneal tratado con s-PRGF, así como describir la concentración y posología más recomendables para el tratamiento del defecto epitelial corneal. También hemos querido determinar si el tratamiento de s-PRGF concomitante con moléculas bioadhesivas pudiera ser beneficioso al aumentar el contacto del hemoderivado a la superficie ocular y así poder reducir la frecuencia de instilación y, por tanto, mejorar la cumplimentación terapéutica del paciente.

Objetivos

Objetivos

JUSTIFICACIÓN

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

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

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

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

El AS, aun es considerado el *gold estándar* de los hemoderivados en el tratamiento de la patología de superficie ocular desde los trabajos de Tsubota de hace 20 años. Sin embargo, el s-PRGF está pretendiendo reemplazar al AS en estas indicaciones. Todos los trabajos que describen superioridad del s-PRGF sobre el AS tienen un conflicto de intereses por lo que trabajos desinteresados sobre el tema son necesarios. Además, es preciso conocer

Objetivos

cuales son los mecanismos celulares intrínsecos de actuación del s-PRGF así como su concentración ideal de uso y su posología ideal en el tratamiento de patologías de la superficie ocular. Además, sería interesante conocer si su combinación con moléculas que, teóricamente, aumenten su tiempo de adhesión a la superficie ocular pudieran actuar sinérgicamente con el s-PRGF, buscando una frecuencia de instilación menor y por lo tanto, una mejor cumplimentación por parte de los pacientes. Por ello, mediante esta tesis pretendemos realizar un estudio comparativo *in vitro* e *in vivo* de la capacidad de distintas concentraciones de s-PRGF, combinados o no con moléculas bioadhesivas, para reparar y regenerar el epitelio corneal.

HIPOTESIS

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

- El hemoderivado rico en factores de crecimiento s-PRGF podría ayudar a aumentar la proliferación y migración de las células epiteliales corneales para, de este modo, reducir el tiempo necesario para el cierre de los defectos epiteliales corneales, minimizando además el riesgo de infección y el malestar del paciente. Por otra parte, la administración de manera combinada del s-PRGF junto con sustancias con propiedades adhesivas (ácido hialurónico y albúmina sérica) podría facilitar la cicatrización del epitelio corneal, y contribuir a una mejor adhesión del mismo a la membrana basal en los procesos de re-epitelización. Además, podría mantener el efecto terapéutico del tratamiento de forma prolongada sobre la superficie ocular, reduciendo el número de dosis diarias a aplicar.

OBJETIVOS

Objetivos principales:

1. Realizar un estudio comparativo, tanto *in vitro* como *in vivo* de la capacidad del s-PRGF a distintas concentraciones para reparar el epitelio corneal.
2. Valorar si la asociación de un bioadhesivo como tratamiento concomitante al s-PRGF tanto *in vitro* como *in vivo* puede mejorar el efecto intrínseco del mismo en términos de mejorar su eficacia y posibilidad de disminuir su posología, y por tanto avalar su aplicación en la práctica clínica.

Objetivos concretos:

1. Evaluar *in vitro* la capacidad de distintas concentraciones de s-PRGF, en solitario o en combinación con un biopolímero bioadhesivo (ácido hialurónico), para promover la proliferación de células de epitelio corneal.
2. Valorar *in vitro* la capacidad de distintas concentraciones de s-PRGF, en solitario o en combinación con un biopolímero bioadhesivo (ácido hialurónico), para estimular la migración de células de epitelio corneal.
3. Analizar el efecto quimiotáctico de s-PRGF sobre la capacidad de migración e invasión de cultivos primarios de queratocitos corneales de conejo.
4. Evaluar la evolución del cierre *in vivo* de los defectos epiteliales corneales inducidos quirúrgicamente en ojos de conejo tratados con distintas concentraciones de s-PRGF en solitario o combinado con un biopolímero bioadhesivo (ácido hialurónico).
5. Estudiar a nivel histológico la capacidad de reparación epitelial *in vivo* de distintas concentraciones de s-PRGF en solitario o combinado con un biopolímero bioadhesivo (ácido hialurónico), así como mediante técnicas inmunohistoquímicas los mecanismos celulares implicados: proliferación y diferenciación celular, adhesión intercelular y al tejido conjuntivo subepitelial, fibrosis y activación limbar.
6. Valorar si la Albúmina sérica humana puede ser un componente sinérgico combinado con el s-PRGF para favorecer la re-epitelización de las células epiteliales corneales, mediante el análisis de la proliferación y migración celular.

Material y métodos

1. ÉTICA

Este proyecto ha sido realizado de acuerdo a las normas de ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) para el uso de Animales en Investigación Oftalmológica y de la la Visión. Los procedimientos y diseños experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Univesidad del País Vasco (UPV/EHU): permiso número CEBA/49-P03-02/2010/ANDOLLO VICTORIANO), y cumple las leyes europeas y nacionales.

La experimentación que ha precisado del uso de hemoderivados de origen humano se realizó previa firma del Consentimiento Informado de los voluntarios sanos que donaron su sangre, acorde a la Declaración de Helsinki y con el informe favorable del Comité de Ética para las Investigaciones relacionadas con Seres Humanos (CEISH) de la UPV/EHU..

2. CULTIVO CELULAR

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

2.1. Mantenimiento de los cultivos celulares y recuento celular

Cuando se adquiere una línea celular nueva o se pone en marcha un cultivo a partir de un *stock*, el primer paso es la descongelación. Para proceder a la **descongelación celular**, el vial que contiene las células se atempera a 37° C. Tras su descongelación, cada vial celular que contiene 1 ml de la suspensión celular, se diluye con 9 ml de medio de cultivo y la suspensión se centrifuga a 170 g durante 5 minutos a 4° C. A continuación, se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado celular en 1 ml de medio de cultivo. Se añade el ml de suspensión celular en un tubo de propileno que

Material y métodos

contiene 9 ml de medio de cultivo, alcanzando un volumen final de 10 ml, que se pasa a un frasco de cultivo de 75 cm². Finalmente, se incuba a 5% de CO₂ a 37° C durante 16 horas, cambiando posteriormente el medio de cultivo para eliminar las células muertas. Los cultivos celulares **se mantienen** en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a una temperatura de 37° C. El número de células se multiplica en los cultivos celulares en unos pocos días, ocupando toda la superficie del frasco de cultivo, en el caso de células adherentes, y empobreciendo el medio, al consumirse los nutrientes y acumularse en él productos de desecho producidos por el metabolismo de las células. Cuando las monocapas celulares alcanzan la subconfluencia, previo lavado con PBS, se disocian con una solución enzimática de Tripsina-EDTA (0,5% tripsina-0,2% ácido etilendiaminotetraacético) (Sigma-Aldrich) durante un máximo de 10 minutos a 37° C. Una vez las células están despegadas, se inactiva la acción de la Tripsina-EDTA mediante adicción de mismo volumen (que la solución enzimática) de un medio con 10% suero bovino fetal (FBS). La suspensión celular se centrifuga a 170 g durante 5 minutos. Tras desechar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspende con 5 ml de medio de cultivo fresco, para seguidamente diluirlo en el volumen final necesario dependiendo del tamaño del frasco de cultivo o del número de frascos que se van a sembrar. El número de células a sembrar se ajusta para cada tipo celular y tamaño de frasco de cultivo, con el fin de conseguir un tapiz subconfluente cada 2-3 días.

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

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

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

Para proceder a la **congelación celular**, las células se despegan del frasco de cultivo, según se ha descrito, cuando están en crecimiento exponencial. La suspensión celular se centrifuga a 170 g durante 5 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspende a una concentración de 3 x 10⁶ células en 1 ml de medio de congelación (FBS suplementado con un 10% de DMSO). Para provocar el menor daño celular, los viales se congelan de forma gradual. Primero se dejan a -20° C durante 2-3 horas, posteriormente a -80° C durante 16 horas y por último se almacenan en nitrógeno líquido.

2.2. Aislamiento y expansión de cultivos epiteliales primarios de conejo (células RPCE)

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

Para el aislamiento y la expansión de los cultivos primarios de células de epitelio corneal de conejo (*Rabbit Primary Corneal Epithelial*) (RPCE), los conejos fueron humanamente sacrificados bajo anestesia general profunda con 100mg/kg de Ketamina (Ketolar® 50 mg/ml, Pfizer, Madrid, España) es decir 2ml de Ketolar®/kg + 14 mg/kg de Xylacina (Xylagesic 20 mg/ml, Labs. Calier SA, Barcelona, España) es decir 0,6 ml de Xylagesic/kg. Durante la anestesia profunda, se retira el pelo de la oreja del conejo mediante raspado superficial con bisturí del 15, se canaliza con Abocath de 24 gauges una de las dos venas auriculares del conejo y se le introducen 10 ml de una solución saturada de KCl para inducer la eutanasia. Seguidamente, se extraen, bajo condiciones asépticas, las córneas mediante pinza de Bonn, cuchillito de 15° y tijeras de ramas corneales. Tras eliminar el botón central con un punch corneal de 9 mm (Hessburg Barron, Jedmed), se obtuvo el anillo corneal en el que se localizan las células epiteliales limbares, que tienen gran capacidad proliferativa. Los anillos se lavaron en DMEM:Ham's F12 (Lonza) con penicilina-estreptomicina al 1% (Lonza) y a continuación se sumergieron en una solución enzimática de dispasa II 25UI/ml (B&D Labware, Two Oak Park, Bedford, MA, USA) en un tampón fisiológico HBSS (Hanks Balanced Salt solution) (Sigma-Aldrich) durante 16 horas a 4° C, para separar el tejido epitelial del estroma corneal. Se recogió la fracción epitelial y tras una centrifugación (170 g durante 5 minutos), se incubó durante 30 minutos a 37° C con 0,5% tripsina-0,2% EDTA (Sigma-Aldrich) para obtener una suspensión de células individuales. Antes de hacer el recuento celular se filtró la suspensión celular mediante un filtro de tipo *cell strainer* (BD®; Ref: 352350) de 70 µm de diámetro de poro (Freire et al. 2014). Finalmente, las células obtenidas se sembraron y mantuvieron adheridas a 37° C y 5% de CO₂ en:

- Medio DMEM:Ham's F12 (1:1 Mix) (Lonza, Verviers, Belgium)
- 2mM L-glutamina (Lonza, Verviers, Belgium)
- 1% penicilina-estreptomicina (Lonza, Verviers, Belgium)
- 10% FBS (Lonza, Verviers, Belgium)

Material y métodos

- 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 5 µg/ml insulina (Sigma-Aldrich)
- 0,1 µg/ml toxina colérica (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium)

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

Al microscopio óptico de contraste de fases podemos observar como en un cultivo de células de cultivo primario RPCE se da una mayor heterogeneidad morfológica, ya que al ser un cultivo primario puede haber pequeñas contaminaciones de otros tipos celulares (Fig. 1). En general, las células crecen expandiéndose en monocapa, sin formación de colonias.

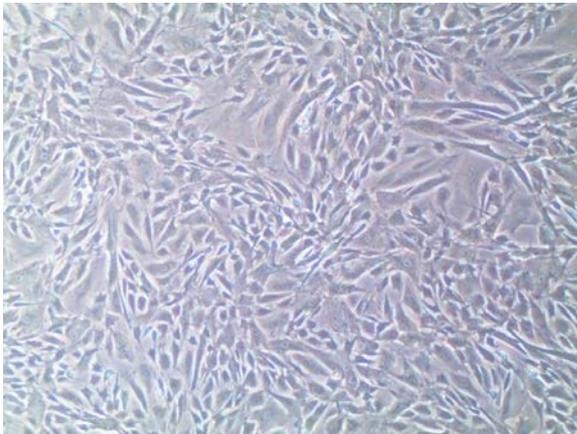


Fig.1 . Fotografía de microscopía de contraste de fases de un cultivo primario de células de epitelio corneal de conejo RPCE (40x)

2.3. Aislamiento y expansión de cultivos epiteliales de epitelio corneal humano (células HCE: Human Corneal Epithelial cells)

La línea celular HCE (*Human Corneal Epithelial*) corresponde a células inmortalizadas de epitelio corneal humano mediante el virus humano SV-40. Fueron cedidas muy amablemente por el Dr. K. Araki-Sasaki (Araki-Sasaki *et al.*, 1995). Las células se cultivaron adheridas a 37° C y 5% de CO₂ en:

- Medio DMEM:Ham's F12 (1:1 Mix) (Lonza, Verviers, Belgium)
- 2mM L-glutamina (Lonza)

- 1% penicilina-estreptomicina (Lonza)
- 10% suero bovino fetal (FBS) (Lonza)
- 10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)
- 5 µg/ml insulina (Sigma-Aldrich)
- 0,1 µg/ml toxina colérica (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium)
- 0,5% DMSO (Dimetilsulfóxido) (Sigma-Aldrich)

De aquí en adelante, nos referiremos al EGF, insulina, toxina colérica y DMSO como **suplementos** que se deben añadir al medio de cultivo para el mantenimiento de esta línea celular. La línea celular HCE se subcultivó a dilución 1:4 - 1:5 cada 2-3 días a una concentración aproximada de 20.000 células/cm².

Al microscopio óptico de contrastes de fases (Nikon Eclipse TS 100), podemos observar que un cultivo de células HCE está formado por células de tamaño intermedio con pocas proyecciones citoplasmáticas y con grandes núcleos (Fig. 2). También se observan algunas células de mayor tamaño y más aplanadas. En general, las células crecen, en colonias heterogéneas, con distinto grado de compactación.

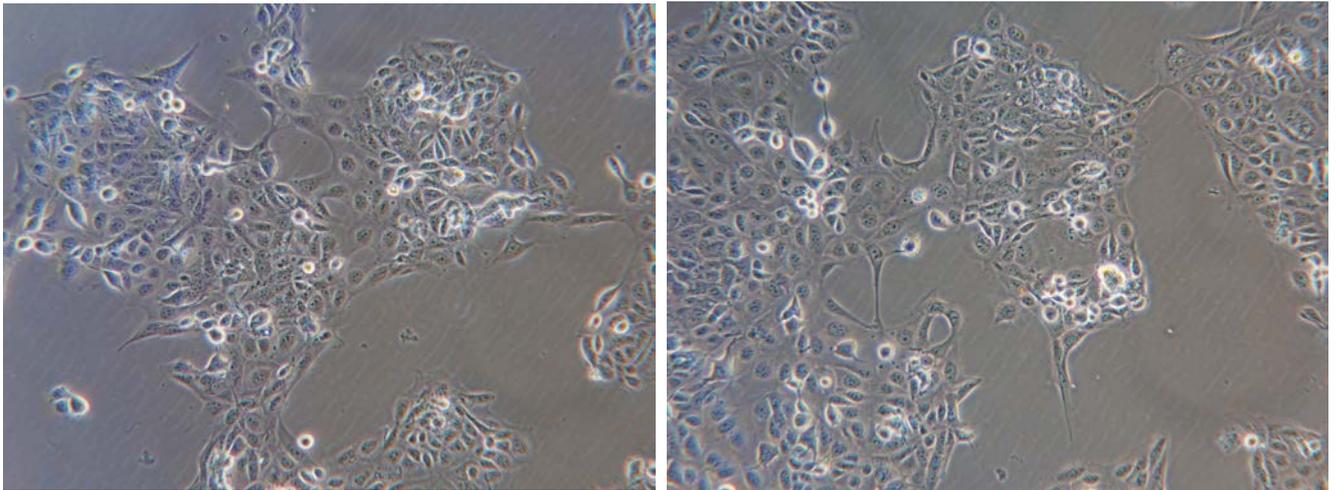


Fig. 2. Fotografía de microscopía de fases de un cultivo de células HCE (40x)

2.4 Aislamiento y expansión de cultivos primarios de queratocitos corneales de conejo

Los cultivos primarios de queratocitos se obtuvieron del estroma de córneas obtenidas de conejos *New Zealand White* con el siguiente método: el estroma corneal es obtenido aplicando en la córnea completa 25 UI/ml de dispasa II durante 16 horas a 4°C, seguido de un raspado suave del epitelio corneal hasta su retirada completa. Después, el estroma corneal es digerido con 1 mg/ml de colagenasa tipo I (Sigma) durante 1.5 horas a 37°C. Las células así obtenidas son cultivadas a 37°C bajo 5% CO₂ en medio de cultivo queratinocito-SFM (low-calcium and serum-free) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA), para evitar la diferenciación de las células en fibroblastos o miofibroblastos (Kawakita et al. 2006).

3. OBTENCIÓN DEL s-PRGF (Suero derivado de Plasma Rico en Factores de Crecimiento)

3.1. s-PRGF de conejo

De acuerdo con los procedimientos y diseños experimentales aprobados por el comité ético de experimentación animal de la UPV/EHU, empleamos conejas *New Zealand White* de alrededor de 2-2,5 kg de peso. Los animales se mantuvieron en el Servicio General de Animalario de la UPV/EHU (SGIker). Los métodos para el procesado de la sangre de conejo se pusieron a punto en base a nuestra experiencia con la sangre humana, a los ensayos publicados en la bibliografía y al tamaño y número de plaquetas de los conejos respecto al de los humanos.

Tras administrar anestesia local de lidocaína 2% subcutánea en oreja, junto a la arteria auricular (Fig. 3) se realiza extracción de la sangre mediante punción de la arteria central auricular con palomilla de 21 gauges (BD Vacutainer) conectada a sistema de vacío a tubos de 5 ml con 3,8% de citrato sódico como anticoagulante (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). La sangre se centrifugó a 650 g durante 8 minutos. A continuación, se recogió el sobrenadante hasta la fracción localizada justo encima de la serie de glóbulos blancos, y seguido se indujo la coagulación con cloruro cálcico a concentración final de 32 mM. La función del cloruro cálcico es neutralizar el citrato y activar la secreción de gránulos α de las plaquetas y la cascada de coagulación. Después de 1 hora a 36° C, durante la cual se produjo la activación de las plaquetas y la formación del

coágulo, se retiró el coágulo de fibrina retraído y se recogió el sobrenadante, que constituye el s-PRGF (Freire et al. 2014; Etxebarria *et al.*, 2017).(Fig 4)

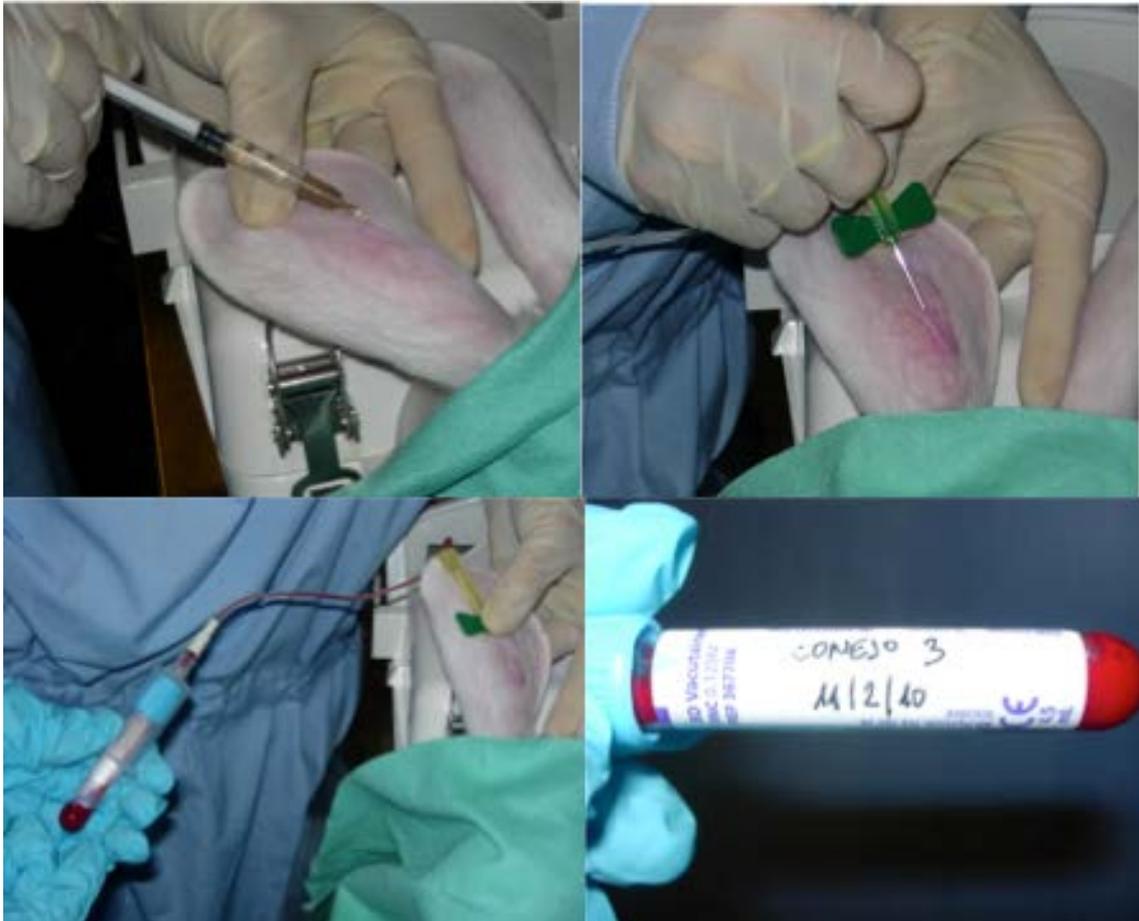


Fig. 3. Composición fotográfica mostrando inyección de anestesia subcutánea junto a la arteria auricular, canalización de la misma y extracción de la sangre en tucos con citrato. Marcaje de cada tubo.

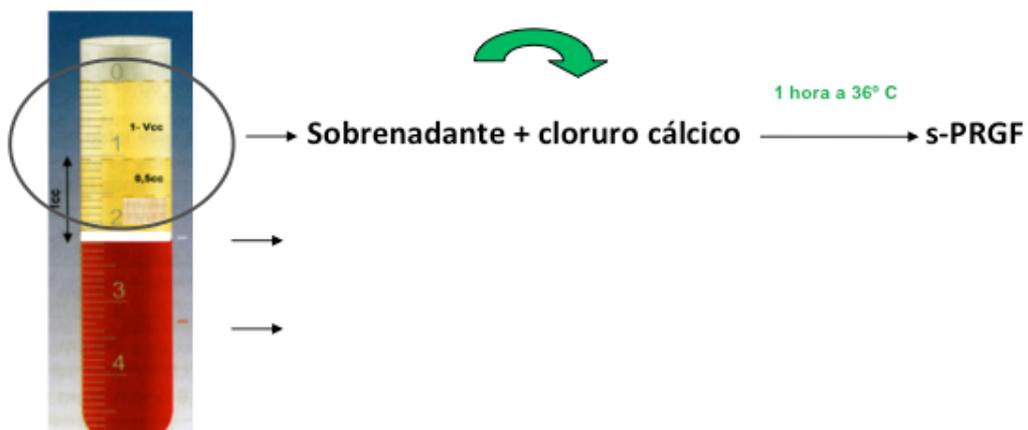


Fig.4.. Obtención del s-PRGF de conejo tras la centrifugación de la sangre a 650 g 8 minutos.

El s-PRGF se filtró usando un filtro con membrana hidrófila de polietersulfona (PES) de 0,22 µm de grado esterilizante (MILLEX® GP Filter Unit, Merck Millipore Ltd., Tullegreen, Carrigtwohill, Co.Cork, IRL, Ref: SLGP033RS), se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20° C hasta el día de su utilización. Dicho s-PRGF fue diluido, en caso de ser preciso, con BSS (Balanced Salt Solution) (Alcon Laboratories).

Para los experimentos *in vitro*, los factores del complemento fueron inactivados mediante calentamiento del s-PRGF en estufa a 56°C durante 30 minutos, para así evitar reacciones inflamatorias y evitar la lisis celular mediada por complemento. Tras la inactivación del complemento del s-PRGF de conejo, se realizaron *pools* de s-PRGF de varios conejos para así obtener preparaciones representativas que den resultados reproducibles y minimizar la variabilidad interindividual.

Para los experimentos *in vivo*, se utilizó el s-PRGF autólogo de cada conejo en su herida corneal, sin inactivar el complemento. Todas las preparaciones se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.2. s-PRGF humano

Para ello empleamos sangre de voluntarios sanos y no medicados (rango de edad 30-60 años). Se les extrajo sangre por venopunción, previa firma del consentimiento informado tal y como hemos descrito en el apartado de Ética.

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

Como en el caso del s-PRGF de conejo, el s-PRGF humano se filtró usando un filtro con membrana hidrófila de polietersulfona (PES) de 0,22 µm de grado esterilizante (MILLEX® GP Filter Unit, Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Carrigtwohill, Co.Cork, IRL, Ref: SLGP033RS).

También, como en el caso de s-PRGF de conejo, se hicieron alícuotas y se almacenaron a -20° C hasta el día de su utilización. Para los ensayos, se hicieron *pools* del s-PRGF obtenido de los distintos voluntarios, con objeto de disminuir la variabilidad interindividual que se encontró tras la cuantificación de los factores de crecimiento. Para ello, previo a hacer el *pool*, se inactivaron los factores del complemento del s-PRGF mediante su calentamiento a 56° C durante 30 minutos. De este modo se evita la lisis celular mediada por complemento. También se hicieron alícuotas de los *pools* y se almacenaron a -20° C.

4. OBTENCIÓN DEL BIOADHESIVO (ÁCIDO HIALURÓNICO)

4.1. Obtención de solución PBS

Deberemos utilizar una solución fosfato isotónica (PBS) con pH=7,2. La composición de dicho PBS es el de la Tabla 1:

NaH ₂ PO ₄ anhidro	240 mg
Na ₂ HPO ₄ anhidro	663 mg
NaCl	450 mg
Agua	csp 100 ml

Tabla 1. Composición de la solución de PBS isotónico pH=7,2

Para la obtención de la solución de PBS, una vez pesados los componentes principales, se añade agua ultrapura MilliQ (una cantidad ligeramente superior a la mitad del total del volumen, (~ 60 ml para una solución de 100 ml) y se mantiene en agitación mecánica hasta la disolución completa de las sales. Una vez disueltas las sales, se enrasa la solución hasta 100 ml con agua ultrapura MilliQ. Esta solución se filtra a través de membranas de 0,45 µm de tamaño (HAWP04700, Millipore) de poro (filtración

clarificante) y a continuación se esteriliza por autoclave (121°C, 20 minutos) (Raypa AH-21, Barcelona, España).

4.2. Obtención de la solución de ácido hialurónico en PBS isotónico pH=7,2

Se pesa una cantidad exacta de **ácido hialurónico (HaNa)**. El ácido hialurónico se encuentra formulado como hialuronato sódico (HaNa), presenta un peso molecular comprendido entre 200.000-400.000 Da, de grado oftálmico y está suministrado por Abarán Materias Primas S.L. (Barcelona, España).

Se pesan 220 mg de HaNa y se añaden aproximadamente 6 ml de la solución isotónica de PBS pH=7,2. Esta mezcla se mantiene en agitación mecánica durante 12 horas. A continuación, se enrasa la solución del polímero bioadhesivo con la solución isotónica de PBS hasta 10 ml. La concentración final del polímero bioadhesivo en PBS es de 2,2% (22 mg/ml).

Se trabaja en condiciones asépticas, el material de plástico empleado es estéril (Sarstedt, Barcelona, España) y el material de vidrio utilizado se ha esterilizado por calor seco.

4.3. Preparación de las diluciones para los ensayos *in vivo*

- 1.-100% PBS como grupo control: solo PBS
- 2.- 90% s-PRGF : 1 ml de s-PRGF + 100 µl de PBS
- 3.- 90% s-PRGF + 0,22% ácido hialurónico: 1 ml de s-PRGF + 100 µl de HaNa 2,2% (usando pipeta de viscosos).
- 4.- 0,22% ácido hialurónico: 1 ml de PBS + 100 µl de HaNa 2,2% (usando pipeta de viscosos).

Los componentes de las diluciones se mezclan con la pipeta que se ha utilizado para hacer las diluciones: se hacen 3 aspiraciones suave y lentamente con la propia pipeta, y a continuación, se agita el bote que contiene la mezcla mediante agitación manual suave durante unos segundos.

5. ESTUDIOS PILOTO

5.1. ELECCIÓN DE MODELO FINAL DE HERIDA CORNEAL

Para la realización de este estudio se utilizó, conforme al Comité Ético de Experimentación Animal de la UPV/EHU, un modelo animal de conejos *New Zealand White* de aproximadamente 2 kg de peso. Todas estas cirugías fueron realizadas bajo anestesia general consistente en 50mg/kg de Ketamina (Ketolar® 50 mg/ml, Pfizer, Madrid, España) es decir 1ml de Ketolar®/kg + 7 mg/kg de Xylacina (Xylagesic 20 mg/ml, Labs. Calier SA, Barcelona, España) es decir 0,3 ml de Xylagesic/kg. El postoperatorio en todos los casos consistió en pomada oftálmica de cloranfenicol y dexametasona (Deicol pomada) 2 veces al día y Diclofenaco colirio (Voltaren® monodosis) 2 veces al día.

En este estudio se utilizaron 3 conejos por cada tipo de modelo de realización del defecto corneal, es decir, se utilizaron en total 12 conejos. El defecto epitelial se realizó:

- a) con NaOH,
- b) mediante raspado epitelial previa colocación de etanol,
- c) mediante raspado epitelial simple y
- d) mediante raspado epitelial + queratectomía superficial anterior.

5.1.1. NaOH.

La cirugía consistió en colocación de un disco acetato de celulosa HAWP 304 (Millipore) de 9 mm de diámetro en el centro anatómico de la córnea del conejo, embebido en 3-4 gotas de NaOH 1M, hasta observar inicio de pérdida de transparencia de la córnea, momento en el que se retira dicho disco. Posteriormente, lavado profuso con BSS (Fig.5).

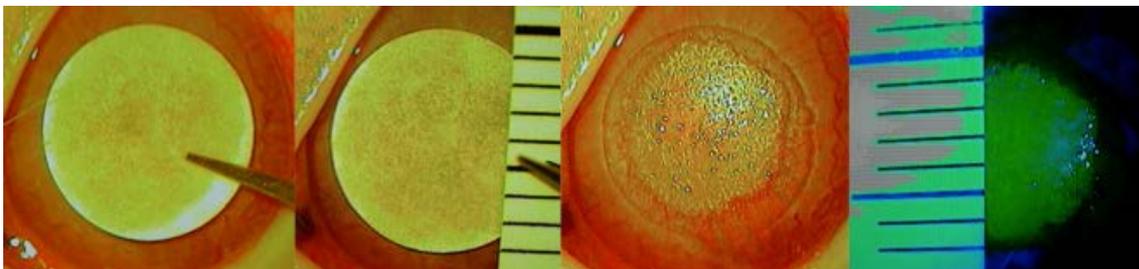


Fig.5. Inducción del daño corneal mediante disco con NaOH.

5.1.2. Raspado epitelial + etanol.

La cirugía consistió en colocación de un trépano corneal (Hessburg-Barron, Jedmed) de 9 mm de diámetro en el centro anatómico de la córnea del conejo, aplicación de 3-4 gotas de etanol al 20% durante 30 segundos, absorción del mismo mediante hemosteta, retirada del trépano y lavado profuso con BSS. Posteriormente y, usando un rascador tipo “palo de golf” (Alcon laboratories), se retira el epitelio corneal dentro de los límites marcados (Fig. 6).

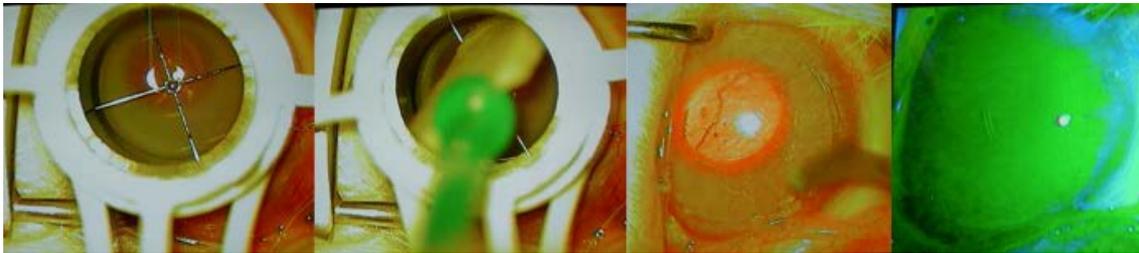


Fig.6. Inducción del daño corneal mediante raspado epitelial + etanol.

5.1.3. Raspado epitelial.

Colocación de un trépano corneal (Hessburg-Barron) de 9 mm de diámetro en el centro anatómico de la córnea del conejo, con marcado de los bordes mediante ligera presión sobre la córnea. Posteriormente se retira el epitelio corneal dentro de los límites marcados usando un rascador tipo “palo de golf” (Fig.7).

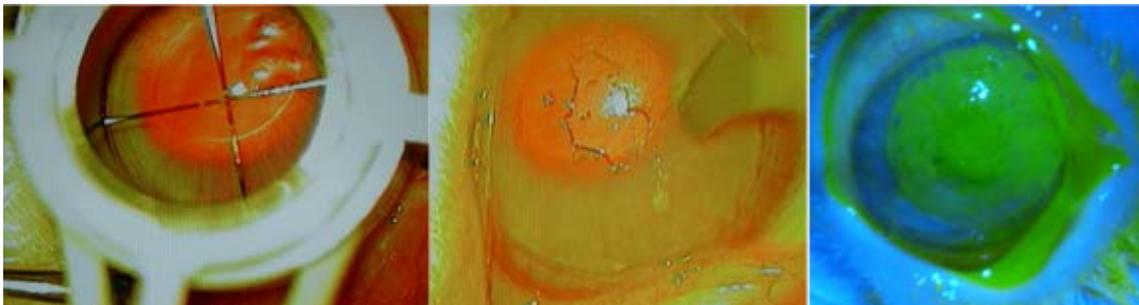


Fig.7. Inducción del daño corneal mediante raspado epitelial

5.1.4. Queratectomía estromal superficial anterior.

Colocación de un trépano corneal (Hessburg-Barron) de 9 mm de diámetro en el centro anatómico de la córnea del conejo, y dar 2-3 cuartos de vuelta al trépano (125-187 micras de espesor). Mediante cuchillito “crescent” (Alcon laboratories) se realizó queratectomía superficial del área trepanada siguiendo un plano corneal. (Fig. 8)

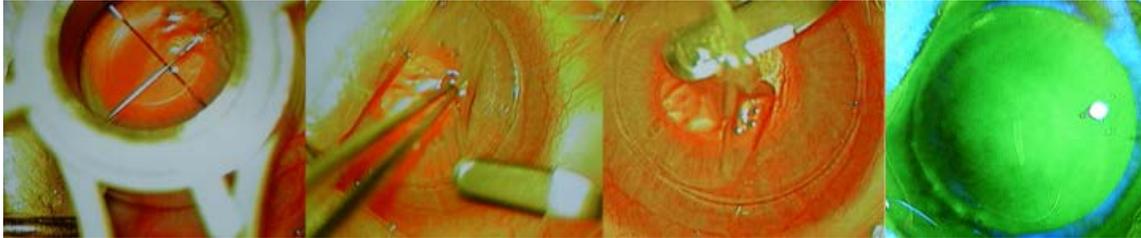


Fig.8. Inducción del daño corneal mediante raspado epitelial + queratectomía estromal superficial.

5.1.5. Valoración histológica.

Tras la reparación de las heridas corneales, los conejos fueron sacrificados bajo anestesia general profunda tal y como se indica en la sección 2.2. de este capítulo. Los botones corneales se introducen en pocillos con DMEM: F12 para ser fijadas posteriormente en parafina y, más tarde, procesadas con tinción de hematoxilina-eosina tal y como se muestra en el capítulo de Análisis Histológico. Los cortes se observaron bajo microscopía óptica, con aumentos 4x, 10x, 20x, 40x con un microscopio de transmisión de luz (Nikon Eclipse TS) y fueron fotografiados mediante el programa ProgRes CapturePro 2.6. Se evaluaron las integridad estructural de las diferentes capas de la córnea.

6. VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN CELULAR

6.1. Método MTT

Para evaluar la proliferación celular de los cultivos crecidos en presencia de los distintos hemoderivados utilizados en esta tesis, se determinó la viabilidad a celular a distintos tiempos, empleando el método MTT, que es un **ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica de sales de tetrazolio** (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio) (MTT) (Sigma-Aldrich, Ref: M5655), que se emplea habitualmente para cuantificar viabilidad celular. La conversión de las sales de tetrazolio (amarillo y soluble) a cristales de formazan (púrpura e insoluble) se produce por la actuación de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Las mitocondrias de las células muertas no realizan la respiración celular, por lo que no se da esta conversión. Estos cristales de formazan, una vez disueltos son espectrofotométricamente detectables y se sabe que su absorbancia es directamente proporcional al número de células vivas. De hecho, en ensayos previos de nuestro grupo (Dra. Freire, tesis doctoral 2016) se ajustaron las recta de calibrado que relacione el número de células con su absorbancia correspondiente, a las 24 horas tras la siembra, tanto en células HCE como en células RPCE (Fig 9a y 9b).

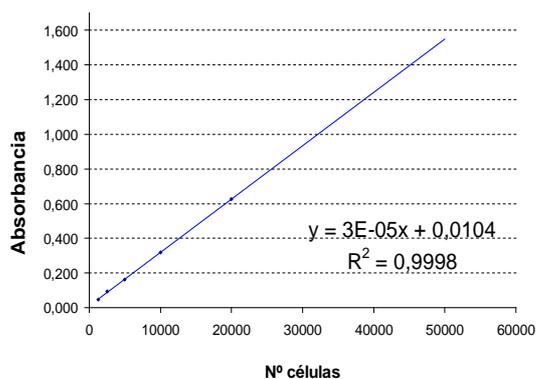


Fig. 9a. Recta de calibrado que muestra absorbancia vs número de células en cultivos HCE a las 24 h de cultivo (cortesía Dra. Freire, tesis doctoral 2016)

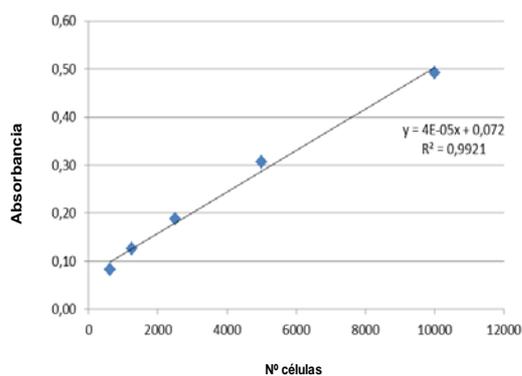


Fig. 9b. Recta de calibrado que muestra absorbancia vs número de células inicial en cultivos RPCE a las 24 h de cultivo (cortesía Dra. Freire, tesis doctoral 2016)

Para realizar los ensayos mediante el método MTT, y basándonos en los resultados previos de nuestro grupo sobre las curvas de crecimiento celular de las distintas estirpes celulares, se sembraron 3.000 células HCE (o 2.500 células en el caso de las células RPCE, debido a que dichos cultivos con RPCE tienen mayor densidad óptica o absorbancia a un mismo número de células dado, respecto a las HCE) por pocillo en las placas de 96 pocillos de fondo plano (0,32 cm²). Una vez se adhirieron al fondo del pocillo (aproximadamente 12 horas), y con el fin de sincronizar los cultivos, se cambió el medio de cultivo inicial con FBS y los suplementos, por un medio DMEM:F12 con Seroalbúmina bovina (BSA) al 1% (Sigma-Aldrich) (Ref: A9647-50G), sin suplementos durante 16 horas. Posteriormente, el medio se reemplazó por el medio de cultivo DMEM:F12 con suplementos y FBS al 10% (medio estándar para RPCE y para HCE) o tratamiento a estudiar para cada ensayo (tablas 2a; 2b; 2c). Este momento se consideró tiempo 0. Con la lectura de la placa de 0h se llevó a cabo la normalización. Es decir, el valor de absorbancia de cada tiempo de cultivo se dividió por el de tiempo 0, de forma que obtuvimos ratios de proliferación respecto al momento inicial.

Para cuantificar la viabilidad celular del cultivo, una vez transcurrido el tiempo de incubación con los distintos tratamientos (a las 24, 48 y 72 horas), se realizó un lavado con PBS y se incubaron los cultivos con 100 µl/pocillo de 0,5 mg/ml de MTT en medio DMEM:F12, durante tres horas a 37° C y 5% de CO₂. Esta solución se eliminó y se añadieron 100 µl/pocillo de DMSO para solubilizar las sales de formazan. La intensidad del color producido se determinó midiendo la absorbancia a 540 nm con un lector de placas ELISA (ELx800 Microplate Reader. Fig.10), siendo ésta directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Todos los experimentos fueron realizados por cuadruplicado y repetidos en 3 réplicas biológicas en los cultivos RPCE (n=12)

Material y métodos

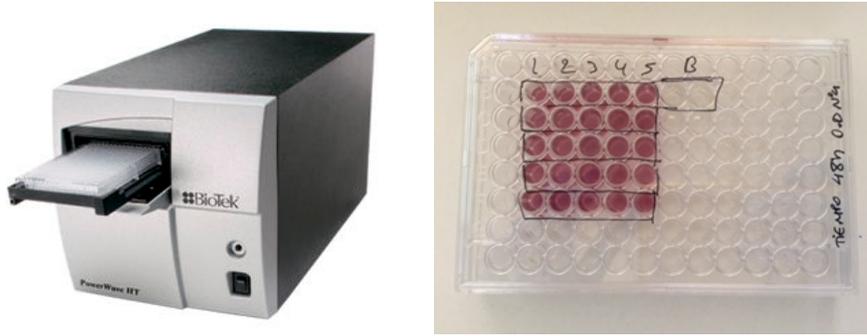


Fig. 10. Lector de placas de ELISA BioTek y placa de 96 pocillos

Se sembraron 3000 células HCE por cada pocillo de placas de 96, acorde a nuestros experimentos previos en que observamos que poniendo más de 5000 células por pocillo, la curva de proliferación se saturaba (Fig.11)

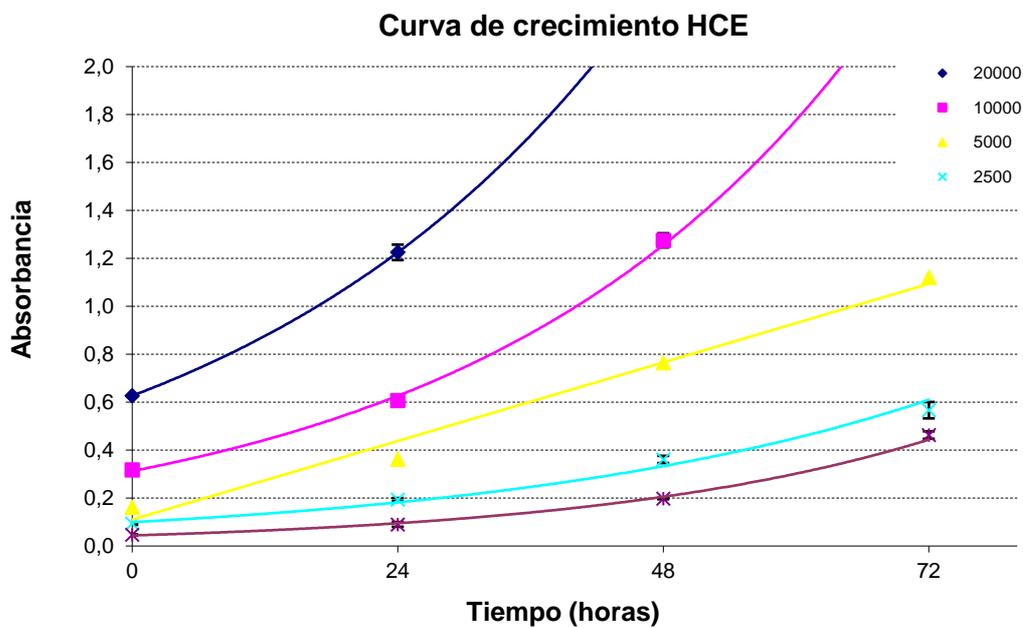


Fig. 11. Las curvas de proliferación celular obtenidas para las células HCE, partiendo de distintas densidades celulares crecientes y conocidas, mostraron que para poder mantener un cultivo entre 72-96 horas, sin llegar a su saturación, el número idóneo de células a sembrar sería entre 3.000-5.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos ($0,32\text{cm}^2$), es decir 10.000-15.000 células/ cm^2 (Figura 9 A). Además se observó que para esta concentración, la tasa de división celular es aproximadamente 24 horas. (Cortesía Dra. Freire, tesis doctoral 2016)

Se realizaron ensayos de proliferación para 3 experimentos:

- 1) Experimento con distintas % s-PRGF sobre células RPCE (24, 48 y 72 horas)
 - Con 1% BSA (control -)
 - Con 10% s-PRGF
 - Con 20% s-PRGF
 - Con 50% s-PRGF
 - Con 10% FBS (control +)

- 2) Experimento con bioadhesivo sobre células HCE (24, 48 y 72 horas)
 - Con 1% BSA (control -)
 - Con 45% s-PRGF
 - Con 0,1% HaNa
 - Con 45% s-PRGF + 0,1% HaNa
 - Con 10% FBS (control +)

- 3) Experimento con Albúmina sérica humana sobre células HCE (24, 48 y 72 horas)
 - Con 1% BSA (control -)
 - Con 20% s-PRGF
 - Con 20% s-PRGF + 10% Albúmina sérica humana
 - Con 50% s-PRGF
 - Con 50% s-PRGF + 10% Albúmina sérica humana
 - Con 10% FBS (control +, al ser el tratamiento estandard)
 - Con 10% Albúmina sérica humana (reconstituida del polvo liofilizado. Sigma-Aldrich)

La Albúmina sérica humana usada fue la Albúmina Humana en polvo liofilizado, con riqueza $\geq 96\%$, obtenida por electroforesis de suero sanguíneo humano, y por tanto, exenta de anticuerpos y aglutininas (Sigma-Aldrich, A1653, St. Louis, MO, USA) y se solubiliza en el s-PRGF (o, en su caso, H_2O) hasta la concentración deseada.

La proliferación se describe en terminos de tasa de proliferación (ratio entre la absorbancia obtenida a los distintos tiempos respecto a la absorbancia al tiempo $0 \pm$

Material y métodos

desviación estandar (SD)) de células viables respecto a células viables justo antes de la exposición al hemoderivado (t=0 horas)

Tratamientos	Componentes
Medio BSA-sincronización	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + 1% BSA
Medio con 1% BSA (control -)	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 1% BSA
Medio con 20% s-PRGF	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 20% s-PRGF
Medio con 20% s-PRGF + 10% Albúmina humana	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 20% s-PRGF + 10% Alb humana
Medio con 50% s-PRGF	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 50% s-PRGF
Medio con 50% s-PRGF + 10% Albúmina humana	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 50% s-PRGF + 10% Alb humana
Medio con 10% FBS (control +: medio habitual)	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 10% FBS
Medio con 10% Albúmina sérica humana	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 10% Alb humana

Tratamientos	Componentes
Medio BSA-sincronización	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + 1% BSA
Medio con 1% BSA (control -)	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos** + 1% BSA
Medio con 10% s-PRGF	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos** + 10% s-PRGF
Medio con 20% s-PRGF	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos** + 20% s-PRGF
Medio con 50% s-PRGF	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos** + 50% s-PRGF
Medio con 10% FBS (control +)	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos** + 10% FBS

Tratamientos	Componentes
Medio BSA-sincronización	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + 1% BSA
Medio con 1% BSA (control -)	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 1% BSA
Medio con 45% s-PRGF	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 45% s-PRGF
Medio con 0,1% HaNa	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 0,1% HaNa
Medio con 45% s-PRGF + 0,1% HaNa	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 45% s-PRGF + 0,1% HaNa
Medio con 10% FBS (control +)	DMEM:F12 + 2mM L-Glutamina + 1% Penicilina/Estreptomicina + Suplementos* + 10% FBS

Tabla 2a (arriba). Medios de cultivo celular utilizados en el ensayo de proliferación *in vitro* con Albúmina sérica (sobre células HCE).

*Suplementos: 10 ng/ml EGF + 5 µl/ml Insulina + 0,1 µl/ml Toxina colérica + 0,5% DMSO

Tabla 2b (intermedio). Medios de cultivo celular utilizados en el ensayo de proliferación *in vitro* con distintas disoluciones de s-PRGF (sobre células RPCE).

**Suplementos: 10 ng/ml EGF + 5 µl/ml Insulina + 0,1 µl/ml Toxina colérica

Tabla 2c (abajo). Medios de cultivo celular utilizados en el ensayo de proliferación *in vitro* con bioadhesivo (sobre células HCE).

*Suplementos: 10 ng/ml EGF + 5 µl/ml Insulina + 0,1 µl/ml Toxina colérica + 0,5% DMSO

7. ENSAYOS DE REEPITELIZACIÓN

7.1. Reepitelización *in vitro* (Wound Healing Assay): HCE y

RPCE

La reepitelización *in vitro* se evaluó tras sembrar 25.000 células HCE o 20.000 células RPCE por pocillo en placas de 96 pocillos. Una vez se adhirieron al plástico y formaron una monocapa celular se mantuvieron en ausencia de suero, en medio DMEM:F12 con BSA al 1% durante 16 horas para sincronizar los cultivos. Tras ese tiempo, se provocó mecánicamente, con un objeto de punta roma estéril, una erosión circular en la monocapa celular (desepitelización), observándose limpiamente el plástico del pocillo. Tras la erosión, se fotografiaron todos los pocillos con un microscopio de contraste de fases (Nikon TS), y se capturaron las imágenes con el software ProgRes CapturePro 2.6. El tamaño del área desepitelizada de cada pocillo fue determinado usando el programa Image J (desarrollado por Wayne Rasband, Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Los pocillos se distribuyeron homogéneamente (en base al área de cada erosión) entre las distintas condiciones a evaluar. A continuación, el medio de cultivo se reemplazó por los medios a estudio o medio DMEM:F12 con BSA al 1% como control.

Para los cultivos HCE, los s-PRGF evaluados fueron de sangre humana, mientras que en los cultivos primarios de conejo de RPCE los s-PRGF fueron obtenidos a partir de sangre de conejo.

Para los ensayos de migración con HCE (células de gran capacidad proliferativa), éstas se trataron previamente con mitomicina C (Sigma M0503) a concentración 10µg/ml durante 3 horas en incubador de células. Luego, se lava el cultivo con PBS x3 para eliminar trazas de mitomicina y luego se levantan las células HCE con tripsina-EDTA, para ser posteriormente sembradas. La mitomicina C es un inhibidor de la síntesis de ADN y la división nuclear. Es utilizada para inhibir la proliferación celular, ya que son experimentos de tiempos superiores a 24 h. y deseamos valorar el cierre epitelial *in vitro* por migración exclusivamente (y que el cierre de la herida creada *in vitro* no sea por proliferación celular).

Para el mismo experimento de migración pero con las células RPCE, éstas no fueron tratadas previamente con mitomicina C ya que su capacidad proliferativa per se no es grande.

Los cultivos de RPCE se mantuvieron con medios de cultivo conteniendo suplementos y 10% FBS como control + (n = 28), 50% s-PRGF (n = 28) or 1% BSA (n = 15) como control-. Las áreas en las que el epitelio había sido rascado fueron fotografiadas cada 12 horas con un microscopio de contraste de fases Eclipse TS 100 (Nikon, Tokyo, Japan) y las imágenes se adquirieron con el software ProgRes CapturePro 2.6 (Jenoptik, Jena, Germany). El tamaño de las áreas denudadas fue cuantificado usando el software Image J (desarrollado por Wayne Rasband en Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD). La tasa de cierre se describe en términos de la media que queda de área denudada \pm desviación estándar (SD) en mm². Todos los experimentos se realizaron al menos por quintuplicado (5 pocillos) y repetidos en 3 réplicas biológicas de cultivos RPCE Sin embargo, Los cultivos de HCE se expusieron a medios de cultivo conteniendo suplementos asociados a 1%BSA (como control -), a 45% s-PRGF, a 0,1% HaNa, a 45% s-PRGF + HaNa o a 10%FBS (como control +)

Se fueron haciendo registros fotográficos con el microscopio de contraste de fases cada 12 horas, y calculando el área de la lesión aun sin cubrir. Así, se analizó a lo largo del tiempo la velocidad de reepitelización de las células *in vitro*, es decir la capacidad para migrar y cubrir la erosión de la monocapa de las células HCE.

El tamaño de las áreas erosionadas (área de la monocapa sin cubrir) se expresó como la media del área sin cubrir \pm SD en mm² para cada tiempo estudiado. Todos los experimentos se realizaron por sextuplicado (6 pocillos) y se repitieron con tres cultivos diferentes (réplicas biológicas) de HCE, así como con cultivos RPCE de tres conejos diferentes.

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

7.2. Reepitelización *in vivo*

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

Material y métodos

comprobar su bienestar y asegurando una eutanasia adecuada una vez el experimento finalizara .

En el primer experimento de reepitelización *in vivo* (comparando distintas diluciones de s-PRGF) se incluyeron 14 conejos adultos blanco New Zealand de 2.0 – 2.5 kg. (28 ojos).

En el segundo experimento de reepitelización *in vivo* (comparando s-PRGF libre vs combinación con bioadhesivo vs bioadhesivo) se incluyeron ?? conejos (??? ojos)

Resumidamente se realizó una cirugía de desepitelización mecánica (previa instilación de etanol 20% durante 20 segundos), tal y como se muestra en el apartado 5.2.2. , en el ojo derecho de todos los conejos y tras un periodo de aclaramiento (a las dos-tres semanas de recuperarse completamente la herida en la córnea derecha) para eliminar a nivel sistémico las trazas de los fármacos administrados, se repitió la cirugía en el ojo izquierdo

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

Inmediatamente después, la superficie ocular se enjuagó con solución salina balanceada oftálmica (BSS, Alcon Laboratories, Inc.Fort Worth, Texas 76134 USA) (Ref: NDC0065-0795-15) y con un cuchillete oftálmico se retiró el epitelio que se encontraba dentro de la marca circular delimitada por el trépano (Fig.12).



Fig. 12. Ojo de conejo tras la cirugía. La superficie ocular desepitelizada se observa teñida por la tinción de fluoresceína.

Tras la operación y hasta que el defecto epitelial fue solventado completamente, todos los conejos fueron tratados tópicamente dos veces al día con pomada oftálmica antiinflamatoria y antibiótica (Oftalmolosa Cusí De Icol[®], Alcon Cusí SA, Barcelona, España) y gotas analgésicas tópicas (Voltaren[®], Allergan, Inc, Irvine, CA, USA). Además, se les aplicó cuatro veces al día el tratamiento a evaluar en cada caso. Para esto, los conejos fueron distribuidos aleatoriamente en cada operación, en los siguientes grupos:

PARA EL EXPERIMENTO DE s-PRGF A DISTINTAS % vs CONTROL

Grupo 1) 20% s-PRGF colirio (n=9 ojos)

Grupo 2) 50% s-PRGF colirio (n=9 ojos)

Grupo 3) 100% s-PRGF colirio (n=5 ojos)

Grupo 4) Grupo control: Lágrimas artificiales conteniendo Povidona (Oculotect, Alcon) (n=5 ojos).

PARA EL EXPERIMENTO DEL BIOADHESIVO

Grupo 1) (n=? ojos)

Grupo 2) (n=? ojos)

Grupo 3) (n=? ojos)

Grupo 4) (n=? ojos)

El s-PRGF fue diluido en solución salina balanceada (BSS[®] Alcon, Fort Worth, TX, USA) cuando fue necesario. Además, el orden en que los diferentes ojos de los distintos grupos era tratado también fue randomizado (Fig. 13).



Fig. 13. Manipulación del animal para la instilación del conejo.

Material y métodos

Para evaluar la progresión del defecto epitelial hasta su cierre, se fotografiaron los ojos de los conejos con y sin fluoresceína (Colircusí Fluotest®; Alcon Cusí SA, Barcelona, España) (Figs. 14 y 15) dos veces al día, siempre a las mismas horas del día y utilizando una regla como referencia colocada en el mismo plano que la superficie ocular. La fluoresceína tiñe las zonas desepitelizadas, permitiendo así cuantificar esta área en cada fotografía, mientras que en las fotografías sin fluoresceína se pueden observar el resto de síntomas como neovascularización o hiperemia. La cuantificación del área desepitelizada se realizó mediante el programa ImageJ, midiendo por triplicado el defecto del epitelio de cada fotografía con una desviación estándar menor que el 10%. Los resultados se expresaron como la media del área del defecto dentro de cada grupo \pm SD en mm².

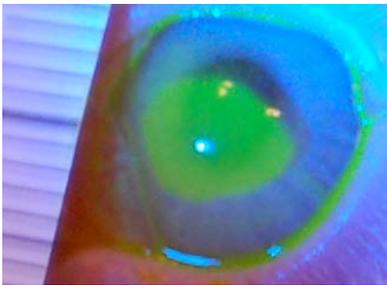


Fig 14. Foto del defecto epitelial teñido con fluoresceína (luz azul cobalto) junto a regla milimétrica.

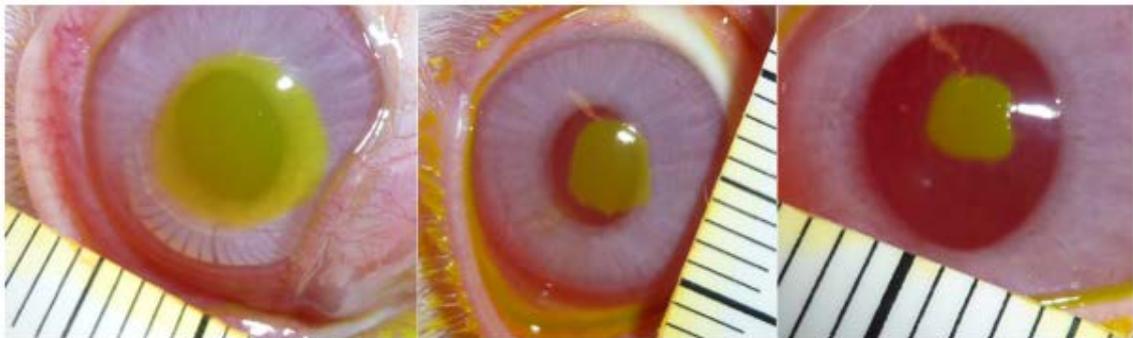


Fig 15. Progresión de la curación del defecto epitelial teñido con fluoresceína (luz blanca) junto a regla milimétrica.

8. ENSAYOS DE MIGRACION E INVASIÓN *in vitro*

Realizamos ensayos de migración transfiltro y de invasión a través de un filtro de Matrigel para analizar la capacidad del s-PRGF de inducir quimiotaxis o invasión en cultivos primarios de queratocitos de conejo.

Para los experimentos de migración usamos placas de 24 pocillos Transwell con un tamaño de poro de membrana de 8- μ m (BD Biosciences). Sembramos 3×10^5 células en cada inserto y repetimos los siguientes tratamientos por triplicado (y repitiendo 3 réplicas biológicas) :

- a) DMEM:F12 con 1% BSA como medio de control en el plato inferior, y DMEM:F12 con 1% FBS en el plato superior (n=9);
- b) DMEM:F12 con 10% FBS en el plato inferior , y DMEM:F12 con 1% FBS en el plato superior (n=9);
- c) DMEM:F12 con 50% s-PRGF en el plato inferior , y DMEM:F12 con 1% s-PRGF en el plato superior (n=9);
- d) DMEM:F12 con 80% s-PRGF en el plato inferior , y DMEM:F12 con 1% s-PRGF en el plato superior (n=9);

Para los experimentos de invasión, reproducimos los mismos tratamientos, número de células sembradas y condiciones de cultivo que se usaron en los ensayos de migración, pero usando insertos envueltos de Matrigel (BD Biosciences).

Después de una incubación de 7 horas (para migración) y de 24 horas (para invasión) a 37°C con una atmósfera de 5% CO₂, los insertos y platos fueron lavados 3 veces con PBS). Se usaron unas torundas de algodón para retirar cuidadosamente las células en la cara superior de la membrana. Tanto los platos como las membranas fueron fijadas en metanol durante 10 minutos.. Finalmente se irrigaron 3 veces de nuevo con PBS, siendo teñidas con 1 μ g/ml DAPI en el segundo lavado. Tanto las membranas como los platos fueron fotografiados con un microscopio de laser confocal FV500 (Olympus, Tokyo, Japan). Los núcleos teñidos con DAPI en membranas o platos fueron contados usando el software ImageJ .

9. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Después de que ambos ojos de los conejos *New Zealand White* del experimento de reepitelización *in vivo* (tanto del experimento con diluciones distintas de s-PRGF como del experimento con bioadhesivo) fueron intervenidos y el defecto epitelial recuperado, (habiendo pasado 1 mes desde la cirugía en el ojo derecho y 7 días desde la cirugía en el ojo izquierdo), los conejos fueron humanamente sacrificados bajo anestesia general profunda tal y como se describe más pormenorizadamente en el apartado 2.2. (Ketolar ® 50 mg/ml, 2 ml/kg + Xylacina 20 mg/ml 0,6 ml/kg), utilizando una solución endovenosa de 10 ml de KCl saturada.

Una vez se extrajeron las córneas, se realizaron tres lavados de cinco minutos en medio Hank's + penicilina-estreptomina 1% + anfotericina 1%. Las córneas se sometieron a tres lavados de cinco minutos con PBS al 1% y se fijaron en formaldehído al 4% durante 24 horas a 4° C. Después de la fijación, se eliminó el área periférica de la córnea extirpada. El tejido restante (córnea central) se cortó por la mitad.

En el caso del experimento con diferentes diluciones de s-PRGF, los fragmentos de córnea se lavaron en una solución PBS, se deshidrataron en soluciones graduales crecientes de etanol hasta etanol de 100° y se incluyeron en parafina líquida a 60° C. Tras su solidificación a temperatura ambiente se obtuvieron secciones histológicas de 4-5 micras con un micrótopo de rotación manual (Leica, RM2125, Nussloch, Alemania).

9.1. Hematoxilina-eosina

Algunos cortes se calentaron para eliminar la parafina por completo (también existe la posibilidad de desparafinar con Xilol o Citrosol en 2 baños de 10 minutos cada uno), y se sometieron al siguiente protocolo para su tinción con hematoxilina-eosina: hidratación con soluciones de etanol progresivamente menos concentradas (100°, 100°, 96°, 96°, 70° y 50°) (10 segundos en cada uno), tinción con hematoxilina (2,5 minutos), lavado con H₂O clorhídrica 0,5% (3 segundos), tinción con eosina (25 segundos), deshidratación con soluciones de etanol progresivamente más concentradas (70°, 96°, 100° y 100°) (10 segundos en cada uno) y por último aclarado con dos baños de xilol (5 minutos cada uno). Se realizó un lavado con agua destilada MilliQ entre cada uno de los pasos anteriores (Fig. 16).

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

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

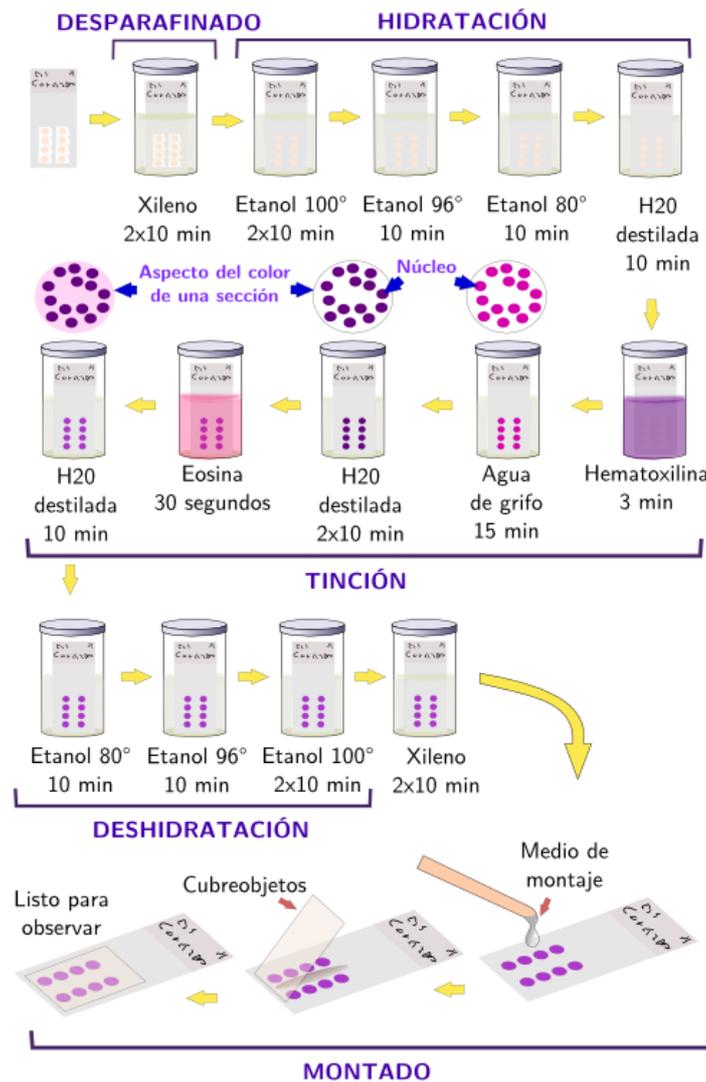


Fig. 16. Esquema general del procedimiento para la tinción con hematoxilina-eosina

En el caso de la experimento in vivo con diferentes diluciones de s-PRGF, bajo el objetivo 20x , contamos el número de queratocitos en 3 campos al azar del tercio anterior del estroma de secciones en H-E de tres conejos por cada tratamiento (n=9 para cada tratamiento)

9.2 Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia es un ensayo basado en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a una molécula y un fluorocromo que produce la emisión de luz fluorescente (en concreto el fluoróforo es la parte del fluorocromo que emite la radiación fluorescente). Los fluorocromos son moléculas que tienen propiedad de absorber radiación luminosa de una longitud de onda (λ) determinada y después emitir radiación luminosa de mayor λ . Un anticuerpo primario se diseña específicamente para su unión a una molécula determinada, ya sea una proteína o un marcador celular que actúa como antígeno, y puede obtenerse del plasma de animales inmunogenizados con dicho antígeno, como por ejemplo el ratón, conejo o cabra, entre otros. Un anticuerpo secundario se une de manera específica al anticuerpo primario, ya que reacciona con los marcadores asociados a éste. Este anticuerpo lleva ligado una molécula fluorescente, que es la que va a emitir la luz al unirse al primer anticuerpo (Fig. 17).



Figura 17. Esquema de una reacción de inmunofluorescencia indirecta

En el caso del experimento *in vivo* con diferentes diluciones de s-PRGF, y a partir de muestras en bloques de parafina, y siguiendo protocolos convencionales, se prepararon muestras para inmunofluorescencia. Sucintamente, primero se desparafinaron y rehidrataron como se indicó en el apartado 9.1.

Posteriormente, las secciones fueron tratadas (para desenmascarar el antígeno de los tejidos) con una solución de recuperación de antígenos ("*Antigen Retrieval*"), inducida por calor Tris:EDTA pH 9.0 durante 40 minutos a 96°C. Después las secciones se permeabilizaron con solución de PBT (conteniendo 0.5% Triton X-100 (Sigma) +PBS) durante 10 minutos (para que se produzcan poros en la membrana celular con el fin de que entren los anticuerpos dentro de la célula). Este paso no se realizó en las muestras para ver el Ac anti-ZO-1 ya que en estos casos tanto la fijación como la permeabilización se realizó con acetona durante 10 minutos pues en la literatura se describe como mala la fluorescencia para este anticuerpo si usáramos PAF (para la fijación) y Triton (para la permeabilización).

Posteriormente, se preincubó durante 1 hora con solución de PBS conteniendo 5% BSA y 10% FBS, con objeto de minimizar señales no específicas (es decir, bloquear los posibles sitios de unión inespecífica).

Luego, las secciones fueron incubadas durante toda la noche (O/N: overnight) a 4°C en cámara húmeda con los siguientes anticuerpos primarios a sus respectivas diluciones (Tabla 3):

- mouse monoclonal anti-cytokeratin K3/K76 (1:20, Millipore, Temecula, CA, USA),
- mouse monoclonal anti-cytokeratin K15 (1:50, Santa Cruz, Dallas, TX, USA),
- goat policlonal anti-ZO1 tight junction protein antibody C-terminal (1:20, Abcam, Cambridge, Mass, USA),
- mouse monoclonal anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) (1:20, Abcam).

A la mañana siguiente, las secciones fueron sacadas de la cámara frigorífica y lavadas con PBS (3 lavados de 5 minutos cada uno), y las muestras fueron incubadas con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Usamos los siguientes anticuerpos secundarios (Tabla 1) respectivamente (1:1000, Invitrogen):

- goat anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 568 conjugate,
- goat anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 488 conjugate,
- donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 568 conjugate,
- goat anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 488 conjugate.

De nuevo se realizaron 3 lavados con PBS. La tinción DNA específica DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) para detectar núcleos celulares fue

Material y métodos

aplicada durante el segundo lavado durante 5 minutos, a una concentración final diluida en PBS, de 1 µgr/ml (Sigma).

Finalmente las secciones fueron secadas y montadas con Fluoromount-g (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) y fotografiadas con un microscopio de fluorescencia Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, USA), y mediante microscopia laser confocal (Olympus Fluoview FV500) en el Servicio de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de la UPV/EHU, que forma parte de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU).

En el caso del experimento *in vivo* con bioadhesivo, una vez extraídas las córneas, parte de destinaron a parafina (para realizar tinción H-E) y la otra parte (las destinadas a inmunofluorescencia) fueron incluidas en gel OCT compound ("Optimum Cutting Temperature", TissueTek®, Sakura Finetek, NL, para inmersión de muestras para congelación) para conservarlas en un congelador a -80°C y posteriormente poder realizar sobre ellas la inmunofluorescencia (es decir, las muestras de este experimento para inmunofluorescencia no estuvieron en parafina). De estos bloques en OCT se realizaron secciones histológicas con grosor de 10 µm con un criotomo Thermo Scientific™, Shandon™ Finesse™ 325 Manual Microtome/Criotome (Fig. 18) y se conservaron en un congelador de -20°C hasta que se llevó a cabo la tinción de inmunofluorescencia. El procedimiento de preparación de las muestras fue equivalente al realizado en el experimento sobre corneas tratadas con distintas diluciones de s-PRGF (anteriormente descrito). En este experimento se valoraron 2 antígenos más respecto al experimento *in vivo* realizado con distintas diluciones de s-PRGF. En concreto la integrina β4 y el Ki-67, en cuyos casos tanto la fijación como la permeabilización se realizaron con acetona en vez de con PAF (para la fijación) y Triton (para la permeabilización).

Luego, las secciones fueron incubadas a 4°C en cámara húmeda "overnight" con los siguientes anticuerpos primarios a sus respectivas diluciones (Tabla 4) :

- mouse monoclonal anti-cytokeratin K3/K76 (1:20, Millipore, Temecula, CA, USA),
- mouse monoclonal anti-cytokeratin K15 (1:50, Santa Cruz, Dallas, TX, USA),
- mouse monoclonal anti-integrin β4 (1:20, Abcam, Cambridge, Mass, USA).
- mouse monoclonal anti-Ki67 (1:20, Millipore)
- goat policlonal anti-ZO1 tight junction protein antibody C-terminal (1:400, Abcam).
- mouse monoclonal anti- α-smooth muscle actin (α-SMA) (1:20, Abcam).

A la mañana siguiente, las secciones fueron lavadas con PBS, y las muestras fueron incubadas con los Anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Usamos los siguientes anticuerpos secundarios (Tabla 2) respectivamente (1:1000, Invitrogen):

- goat anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 568 conjugate,
- goat anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 488 conjugate,
- goat anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 568 conjugate,
- goat anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 568 conjugate,
- donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 568 conjugate,
- goat anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 488 conjugate.

El resto del procedimiento (secado y montaje), equivale al que se realizó en el experimento con diluciones de s-PRGF



Fig. 18. Criostato utilizado para corte de muestras a -20°C para posterior Inmunofluorescencia

10.. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

10.1. Microscopía óptica de contraste de fases

El análisis morfológico de los cultivos se realizó usando un microscopio invertido de contrastes de fases (Nikon Eclipse TS 100). Las imágenes se capturaron con el software ProgRes CapturePro 2.6. Con el fin de sacar fotos de calidad óptima las células se cultivaron en pocillos de un tamaño, como mínimo, de 3,8 cm² (placas de 12 pocillos) para que la refracción de la luz fuera la adecuada (Fig. 19).



Fig. 19. Microscopio óptico de contraste de fases y de transmisión de luz Nikon Eclipse TS 100

10.2. Microscopía óptica de transmisión de luz o de campo claro

Las muestras preparadas con tinción hematoxilina-eosina fueron observadas con el microscopio Nikon Eclipse TS100, con objetivos 10x, 20x y 40x. Las imágenes se capturaron con el software ProgRes CapturePro 2.6

10.3. Microscopía de fluorescencia

Las muestras preparadas para inmunofluorescencia fueron observadas en los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU (SGiker), Servicio de Microscopía Analítica y Alta Resolución en Biomedicina, mediante el microscopio de fluorescencia Zeiss Axioskop, Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA. Las fotografías se tomaron con cámara Olympus DP71 para campo claro y fluorescencia intensa (con Software Cell B) y con cámara Nikon Ds-Qi1Mc para fluorescencia (con software NIS F) (Fig.20).



Fig. 20. Microscopio de fluorescencia Axioskop, Zeiss

10.4. Microscopia laser confocal

Las muestras preparadas para inmunofluorescencia también fueron observadas en los Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU (SGiker) mediante el microscopia laser confocal Olympus Fluoview FV500 (Tokyo, Japan). Las fotografías se tomaron con el software Fluoview (Fig.21)



Fig. 21. Microscopio laser confocal Olympus Fluoview FV500.

Marcador	Casa Comercial	Dilución	Fijación	Permeabilización	Anticuerpo secundario	Marcaje
Citoqueratina k3/k76	Millipore (Ref: CBL218)	1:20	PAF 2%	PBS + Tritón 0,5%	Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 (Ref: A21124)	Citoplásmico. Diferenciación: células epiteliales corneales diferenciadas (zona apical limbo y córnea central)
Citoqueratina k15	Santa Cruz (Ref: sc-47697)	1:50	PAF 2%	PBS + Tritón 0,5%	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG2a (Ref: A21131)	Citoplásmico. Diferenciación: presunto marcador de células madre limbares (zona basal limbo)
α -Actina de músculo liso (α -SMA)	Abcam (Ref: ab7817)	1:20	PAF 2%	PBS + Tritón 0,5%	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG2a (Ref: A21131)	Citoplásmico. Diferenciación de queratocitos del estroma a fibroblastos activos y miofibroblastos
ZO-1	Abcam (Ref: ab190085)	1:20	Acetona	NO	Alexa fluor 568 donkey anti-goat IgG (Ref:A11057)	Intercelular. Uniones zónula occludens de la capa apical del epitelio

Tabla 3. Características de los anticuerpos utilizados en la experimentación con distintas diluciones de s-PRGF para la caracterización de los cortes histológicos

Marcador	Casa Comercial	Dilución	Fijación	Permeabilización	Anticuerpo secundario	Marcaje
Citoqueratina k3/k76	Millipore (Ref: CBL218)	1:50	PAF 2%	PBS + Tritón 0,5%	Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 (Ref: A21124)	Citoplásmico. Diferenciación: células epiteliales corneales diferenciadas (zona apical limbo y córnea central)
Citoqueratina k15	Santa Cruz (Ref: sc-47697)	1:50	PAF 2%	PBS + Tritón 0,5%	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG2a (Ref: A21131)	Citoplásmico. Diferenciación: presunto marcador de células madre limbares (zona basal limbo)
α -Actina de músculo liso (α -SMA)	Abcam (Ref: ab7817)	1:400	PAF 2%	PBS + Tritón 0,5%	Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG2a (Ref: A21131)	Citoplásmico. Diferenciación de queratocitos del estroma a fibroblastos activos y miofibroblastos
Integrina β 4	Abcam (Ref: ab29042)	1:20	Acetona	NO	Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 (Ref: A21124)	Membrana celular. Unión epitelio-estroma (células epiteliales)
Ki-67	Millipore (Ref: MAB4190)	1:20	Acetona	NO	Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG1 (Ref: A21124)	Nuclear. Proliferación celular
ZO-1	Abcam (Ref: ab190085)	1:20	Acetona	NO	Alexa fluor 568 donkey anti-goat IgG (Ref:A11057)	Intercelular. Uniones zónula occludens de la capa apical del epitelio

Tabla 4. Características de los anticuerpos utilizados en la experimentación con Bioadhesivo para la caracterización de los cortes histológicos

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

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

- Valores estadísticos de posición: Media aritmética (\bar{x}): ayuda a expresar el valor medio del conjunto de valores.
- Valores estadísticos de dispersión: son indicadores del grado de homogeneidad con que se agrupan los valores alrededor de las medias de la tendencia central. Reflejan la dispersión de los datos estudiados para las distintas variables, en nuestro caso se utiliza la desviación estándar.
- Contraste de hipótesis estadística: consiste en analizar si es significativa o no la diferencia entre la media en las muestras y el valor supuesto control del parámetro. La presencia de esta característica se mide por el valor de 'p' (probabilidad). Se ha considerado diferencia significativa una $p < 0,05$.
- Pruebas de homogeneidad:
 - o *t de Student*. Test paramétrico que se basa en la suposición de que los datos están muestreados de una población que sigue una distribución normal. Permite comparar dos medias muestrales (por tanto cuantitativas) obtenidas de dos grupos independientes y con distribución normal que difieren en un factor (por ejemplo tratamiento) para analizar si entre ellos existen diferencias significativas. La diferencia significativa nos confirma que es muy poco probable que esta diferencia pueda ser explicada al azar.
 - o *U de Mann-Whitney*. Test no paramétrico, equivalente a la t de Student, que se utiliza cuando la población no sigue una distribución normal o Gaussiana. Se usa cuando se quiere comparar dos poblaciones usando muestras independientes, es decir, es una prueba alternativa a la t de Student para comparar dos medias usando muestras independientes.
- Chi cuadrado (X^2): en el contraste de hipótesis, esta prueba nos permite comparar la homogeneidad de la distribución de dos o más variables cualitativas. Es un test no paramétrico. Se utiliza para comparar variables

independientes. Cuando no puede usarse este test por tamaño muestral insuficiente, empleamos la prueba exacta de Fisher

- Prueba de Kuskal-Wallis: es un estimador no paramétrico, alternativa al ANOVA cuando los datos no satisfacen las premisas para realizar dicho test. Es una extensión del test U de Mann-Whitney para más de dos grupos. Contrasta si las diferentes muestras están equidistribuidas y por tanto pertenecen a una misma población. de la función de supervivencia. Usado para estudiar el número de días que tardaban en cerrar completamente los defectos epiteliales corneales.
- Test de Dunn-Bonferroni: test no paramétrico de comparaciones múltiples, cuya ventaja sobre el test de Kruskal-Wallis es que detecta no solo que hay diferencias entre grupos, sino donde están esas diferencias.
- ANOVA (ANálisis Of VAriance): evalúa la importancia de uno o más factores al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes valores de variables. Para ello debe haber una variable de respuesta continua y al menos un factor categórico con dos o más niveles.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS 18.0 (SPSS Sciences, Chicago, Illinois, Estados Unidos) en el caso de la experimentación con s-PRGF libre. En el caso de la experimentación con el bioadhesivo , los análisis se hicieron con el programa estadístico R (versión 3.4.0).

12. SINOPSIS DE LA EXPERIMENTACIÓN

12.1. METODOLOGÍA *IN VITRO*

12.1.1. Ensayo diluciones: Ensayo de Proliferación epitelial de RPCE mediante MTT (24h, 48h, 72h). (n=12 por cada tratamiento)

con 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA). Control -
con 10% s-PRGF de conejo
con 20% s-PRGF de conejo
con 50% s-PRGF de conejo
con 10% Suero Fetal Bovino (FBS). Control +

12.1.2. Ensayo diluciones: Ensayo de Reepitelización epitelial (Wound Healing Assay) *in vitro* de RPCE (0h, 12h, 24h, 36h).

con 10% Suero Fetal Bovino (FBS). (n=28)
con 50% s-PRGF de conejo. (n=28)
con 1% BSA. (n=15)

12.1.3. Ensayo diluciones Ensayo de Migración de queratocitos de conejo.

con DMEMF12 + 1% BSA y DMEM F12 + 1% FBS.
con DMEMF12 + 10% FBS y DMEM F12 + 1% FBS.
con DMEMF12 + 50% s-PRGF de conejo y DMEM F12 +1% FBS
con DMEMF12 + 80% s-PRGF de conejo y DMEM F12 +1% FBS

12.1.4. Ensayo diluciones: Ensayo de Invasión de queratocitos de conejo

con DMEMF12 + 1% BSA y DMEM F12 + 1% FBS.
con DMEMF12 + 10% FBS y DMEM F12 + 1% FBS.
con DMEMF12 + 50% s-PRGF conejo y DMEM F12 + 1% FBS.
con DMEMF12 + 80% s-PRGF conejo y DMEM F12 + 1% FBS.

12.1.5. Ensayo bioadhesivo: Ensayo de Proliferación epitelial de HCE mediante MTT (24h, 48h, 72h).

con 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA). Control -
con 45% s-PRGF humano
con 0,1% HaNa
con 45% s-PRGF humano + 0,1% HaNa
con 10% Suero Fetal Bovino (FBS). Control +

12.1.6. Ensayo bioadhesivo: Ensayo de Reepitelización epitelial (Wound healing) *in vitro* de HCE (0h, 12h, 24h, 36h).

con 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA). Control -
con 45% s-PRGF humano
con 0,1% HaNa
con 45% s-PRGF humano+ 0,1% HaNa
con 10% Suero Fetal Bovino (FBS). Control +

12.1.7. Ensayo Albúmina: Proliferación epitelial mediante MTT de HCE (0h, 24h, 48h). (n=12 por cada tratamiento)

con 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA). Control -.
con 20% s-PRGF humano.
con 20% s-PRGF humano + 10% Albúmina humana.
con 50% s-PRGF humano.
con 50% s-PRGF humano + 10% Albúmina. humana
con 10% Suero Fetal Bovino (FBS). Control +

con 10% Albúmina Sérica Humana (HSA).

12.1.8. Ensayo Albúmina: Reepitelización (Wound healing) *in vitro* con HCE (0h, 12h, 24h, 36h). (n=12 por cada tratamiento)

con 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA). Control -.
con 20% s-PRGF humano.
con 20% s-PRGF humano + 10% Albúmina humana.
con 50% s-PRGF humano.
con 50% s-PRGF humano + 10% Albúmina humana.
con 10% Suero Fetal Bovino (FBS). Control +
con 10% Albúmina Sérica Humana (HSA).

12.2. METODOLOGIA IN VIVO

12.2.1. Estudio piloto para la elección del modelo animal de herida corneal (y resultados por los que elegimos un método en concreto)

con NaOH (n=3)
con raspado epitelial + etanol (n=3)
con raspado epitelial (n=3)
con raspado epitelial y queratectomía estromal superficial anterior (n=3)

12.2.2. Reepitelización *in vivo* en el experimento de diluciones s-PRGF

con 20% s-PRGF de conejo colirio (n=9 ojos)
con 50% s-PRGF de conejo colirio (n=9 ojos)
con 100% s-PRGF de conejo colirio (n=5 ojos)
con Lágrimas artificiales como grupo control (n=5 ojos).

12.2.3. Reepitelización *in vivo* en el experimento de Bioadhesivo

con 100% PBS como grupo control (n=8 ojos).
con 90% s-PRGF de conejo + 10% PBS (n=9 ojos).
con 0,22% ácido hialurónico en PBS (n=8 ojos)
con 90% s-PRGF de conejo + ácido hialurónico en PBS (n=8 ojos).

12.3.. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

12.3.1. Hematoxilina-eosina (cortes en parafina)

En el estudio piloto sobre métodos de erosión corneal *in vivo*
En el experimento de diluciones s-PRGF
En el experimento del Bioadhesivo

12.3.2. Inmunohistoquimia

12.3.2.1. En experimento de diluciones s-PRGF (incluidos en parafina)

CK3 (diferenciación)

CK15 (indiferenciación)
ZO-1 (efecto barrera)
 α -SMA (estroma)

12.3.2.2. En experimento del Bioadhesivo (incluidos en OCT, congelados)

CK3 (diferenciación)
CK15 (indiferenciación, Stemness)
Ki67 (proliferación)
Integrina β 4 (adhesión)
ZO-1 (ef barrera)
 α -SMA (estroma)

Resultados

I. ESTUDIO PILOTO DE PRODUCCIÓN DE DEFECTO EPITELIAL CORNEAL

Con la intención de establecer un modelo *in vivo* de defecto epitelial corneal realizamos un ensayo inicial utilizando cuatro protocolos distintos de inducción de la lesión corneal en ojos de conejos New Zealand White.

Se analizaron los resultados para cada caso, atendiendo al examen de parámetros clínicos en el ojo del animal, a la evolución del daño corneal así como a la estructura histológica de los tejidos procesados e incluidos en parafina.

Obtuvimos los resultados que a continuación se detallan.

1. NaOH

Mediante este procedimiento, el cierre epitelial se retrasa mucho respecto a los casos en los que realizamos raspado epitelial (con/sin etanol) y queda un leucoma central (Fig.1). La utilización de NaOH implica un componente inflamatorio exagerado debido a la quemadura química, y podría interferir sustancialmente con los resultados del efecto *in vivo* del s-PRGF.

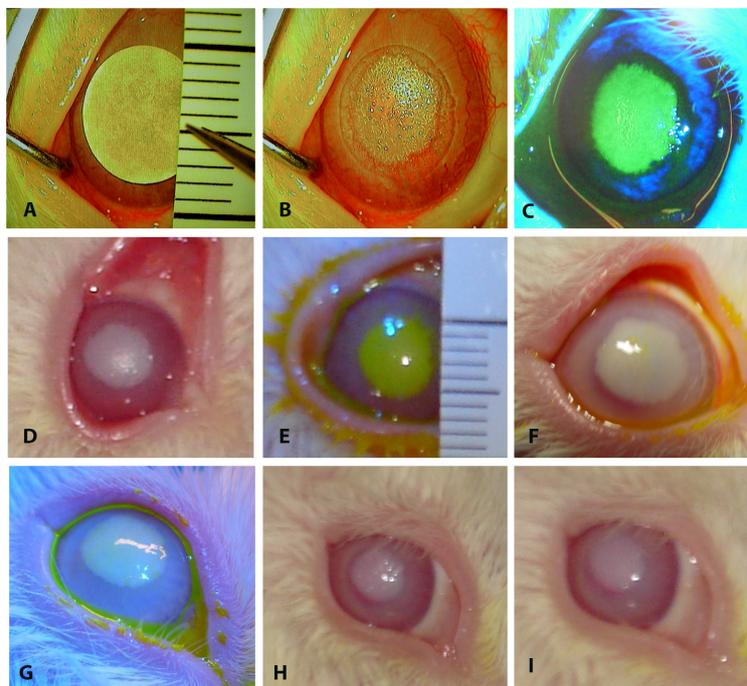


Fig. 1. Cierre del defecto epitelial cuando se uso NaOH para crearlo.

A: Día 0: aplicación del papel de nitrocelulosa impregnado en NaOH. **B:** Día 0: aspecto inmediatamente después de retirar el papel. **C:** Día 0: tinción fluoresceína. **D:** Día 1: postoperatorio. **E:** Día 1: tinción fluoresceína. **F:** Día 3: postoperatorio. **G:** Día 4: tinción fluoresceína. **H:** Día 5: postoperatorio. **I:** Día 7: postoperatorio.

2. Raspado epitelial junto con etanol.

La retirada del epitelio resulta mucho más sencilla en el caso de usar etanol de forma previa al raspado epitelial, además de permitir una mayor precisión de raspado en los bordes de la herida. Este hecho es muy importante, ya que el éxito del estudio depende de la precisión y reproducibilidad en la realización inicial de todas las heridas corneales. Por otra parte, el cierre del defecto se completa hacia los 7 días tras la cirugía (Fig. 2). El tratamiento con etanol 20% de forma previa al raspado se utiliza habitualmente en la práctica clínica de la fotoqueratectomía refractiva (PRK), y hace que el desbridamiento epitelial sea más sencillo.

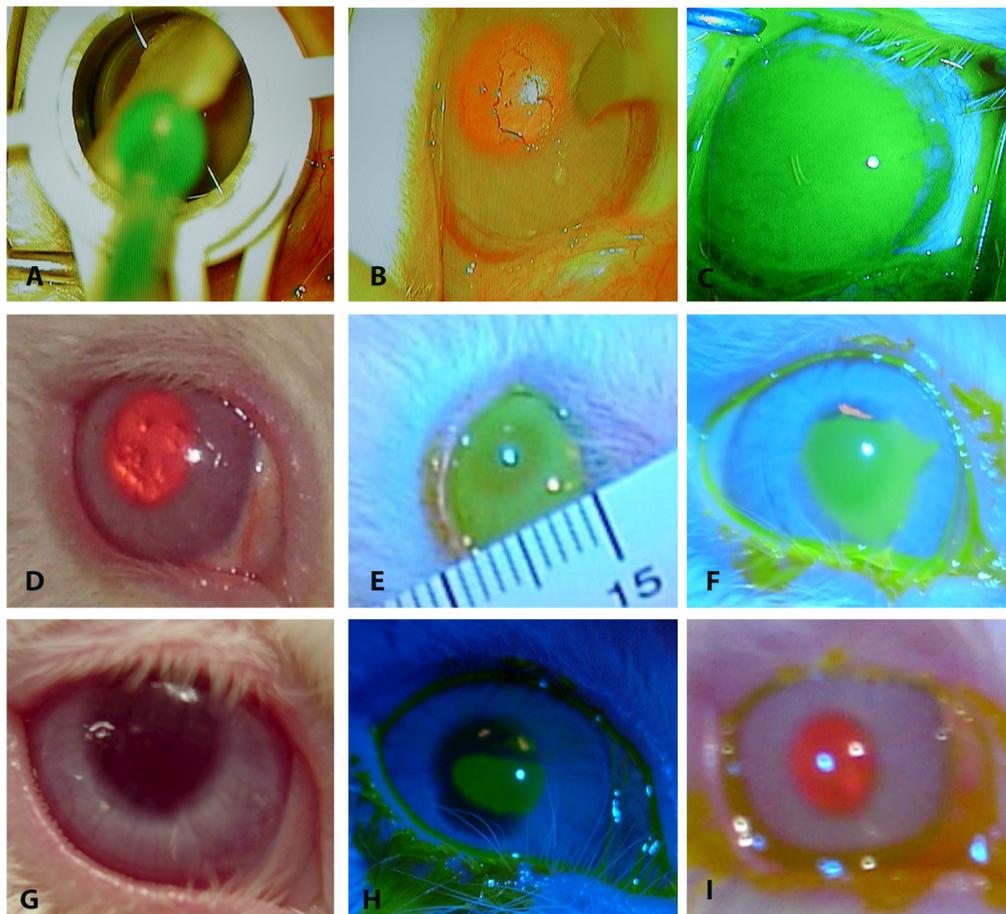


Fig 2. Cierre del defecto epitelial cuando se usó etanol seguido de raspado epitelial para crearlo. **A:** Día 0: aplicación etanol y su retirada con hemosteta. **B:** Día 0: raspado operatorio. **C:** Día 0: tinción fluoresceína. **D:** Día 1: postoperatorio. **E:** Día 1: tinción fluoresceína. **F:** Día 3: tinción fluoresceína. **G:** Día 4: postoperatorio. **H:** Día 4: tinción fluoresceína. **I:** Día 7: postoperatorio.

3. Raspado epitelial sin etanol coadyuvante.

La retirada del epitelio en un conejo sano resulta en ocasiones dificultosa debido a la adherencia del epitelio a las capas subyacentes. Este hecho tiene como consecuencia una menor precisión en el raspado de los bordes de la herida corneal, de forma que el borde externo de la herida queda con forma irregular, siendo, por lo tanto, menos precisa y repetitiva el área inicial de la herida en todas las córneas del estudio (Fig. 3).

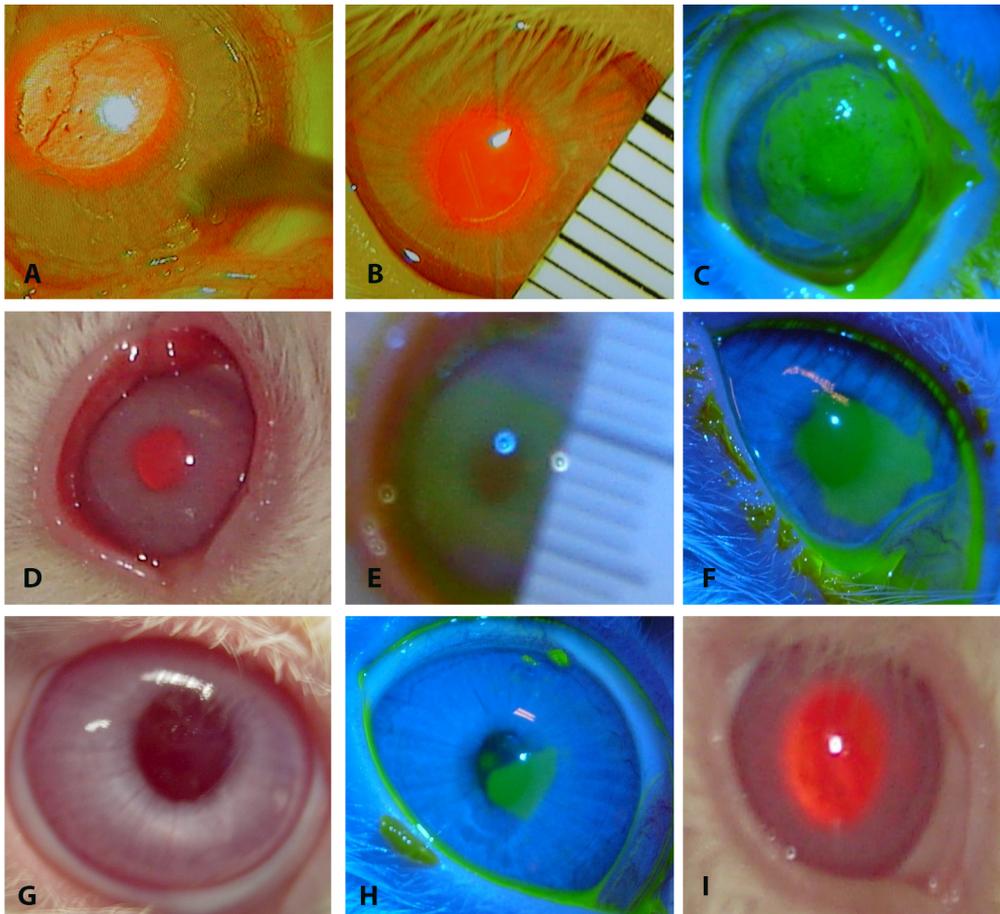


Fig. 3. Cierre del defecto epitelial cuando se usó raspado epitelial para crearlo.

A: Día 0: raspado epitelial operatorio. **B:** Día 0: medición del área raspada. **C:** Día 0: tinción fluoresceína. **D:** Día 1: postoperatorio. **E:** Día 1: tinción fluoresceína. **F:** Día 3: tinción fluoresceína. **G:** Día 5: postoperatorio. **H:** Día 5: tinción fluoresceína. **I:** Día 7: postoperatorio.

4. Queratectomía estromal superficial anterior.

El cierre del defecto epitelial provocado mediante queratectomía superficial, en la que junto con el epitelio y su membrana basal se retira la parte anterior del estroma, retrasa considerablemente el cierre del defecto epitelial respecto a los otros casos estudiados, además de ofrecer mayores signos de inflamación ocular (Fig. 4). Mediante este método, se añade un factor más al defecto epitelial, que es el daño estromal. Este punto podría ser un factor de confusión en nuestros resultados, al incorporar de manera sustancial a la re-epitelización el papel del estroma corneal, por lo que decidimos usar un modelo de raspado epitelial puro.

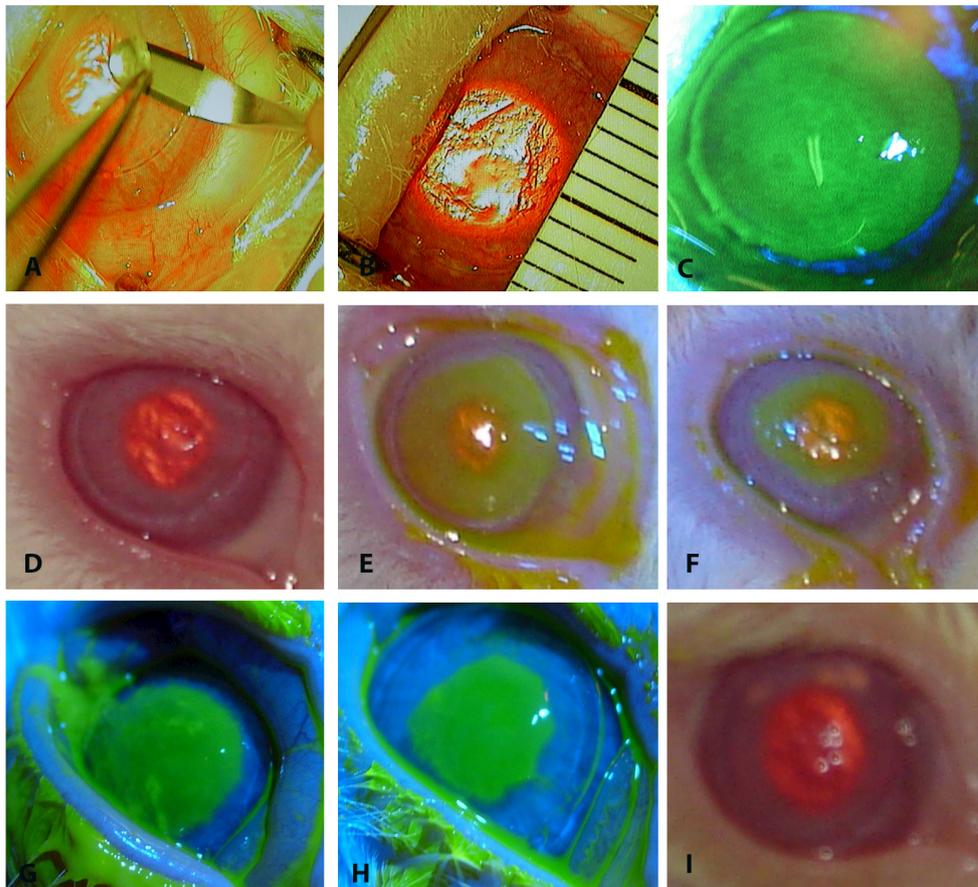


Fig. 4. Cierre del defecto epitelial cuando se usó queratectomía superficial para crearlo. **A:** Día 0: queratectomía superficial operatorio. **B:** Día 0: medición del área con queratectomía. **C:** Día 0: tinción fluoresceína. **D:** Día 1: postoperatorio. **E:** Día 1: tinción fluoresceína. **F:** Día 2: tinción fluoresceína. **G:** Día 3: tinción fluoresceína. **H:** Día 4: tinción fluoresceína. **I:** Día 5: postoperatorio.

5. Valoración histológica.

El análisis histológico mostró, en el caso del daño mediante NaOH, que la herida había re-epitelizado en toda su superficie una semana tras la cirugía. Sin embargo, en el momento del análisis histológico (2 semanas tras la cirugía) el epitelio mostraba una única capa de células epiteliales en la región central de la herida (Fig. 5), mientras que hacia la periferia de la misma, se observaban un epitelio de 2-3 capas celulares, pero de morfología aplanada. Además, el estroma anterior presentaba una estructura normal de la matriz extracelular, pero ausencia de queratocitos en la mayor parte de la extensión de la herida.

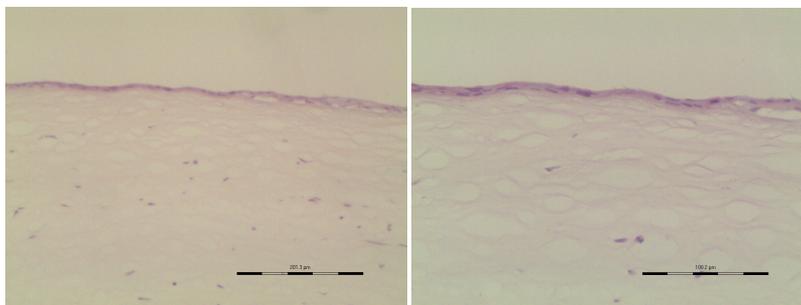


Fig. 5. Re-epitelización del defecto epitelial corneal inducido con NaOH. Cortes histológicos teñidos con H-E. Objetivo 20x.

En los casos en los que hicimos raspado epitelial con etanol (Fig, 6) o simplemente raspado epitelial (Fig. 7), el cierre de la herida se produjo en ambos casos una semana después de la cirugía. El estudio histológico mostró que no había diferencias en la morfología de las capas histológicas. A las dos semanas tras la cirugía, los cortes histológicos mostraron un epitelio corneal pluriestratificado plano no queratinizado, con aspecto totalmente normal y con 5-6 capas celulares. Sin embargo, se observó la ausencia de queratocitos en el tercio anterior del estroma corneal, de igual forma que cuando utilizamos NaOH. Estos resultados sugieren que la utilización de sustancias tóxicas como el NaOH o el etanol durante la cirugía afecta a la supervivencia de los queratocitos del estroma anterior.

En el caso de la erosión corneal inducida mediante queratectomía estromal superficial anterior el cierre epitelial se produjo más tarde que en los casos

Resultados

anteriores. En los cortes histológicos observamos epitelios más finos con 2-3 capas de células epiteliales (Fig. 8). El estroma anterior mostró presencia de queratocitos en toda su extensión.

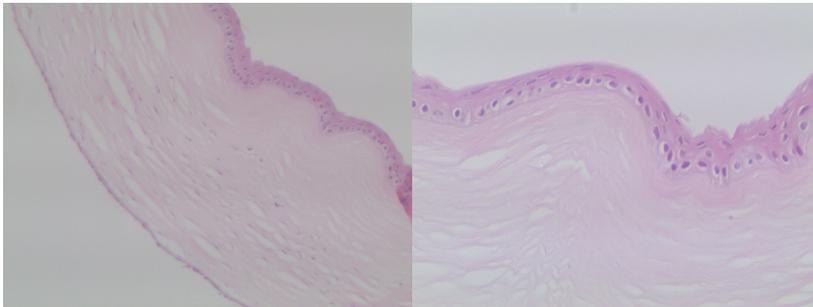


Fig. 6. Re-epitelización de defecto epitelial corneal inducido con etanol seguido de raspado epitelial. Cortes histológicos teñidos con H-E. Objetivo 4x y 20x.

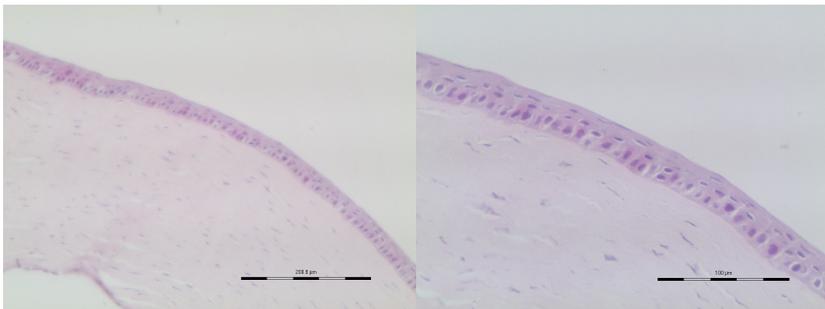


Fig. 7. Re-epitelización del defecto epitelial corneal inducido mediante raspado epitelial. Cortes histológicos teñidos con H-E. Objetivo 4x y 20x

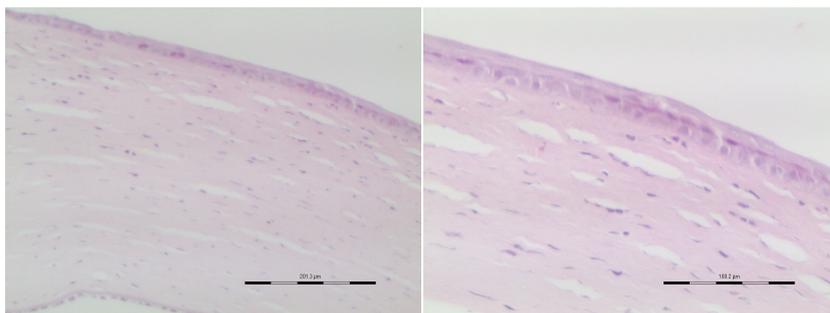


Fig. 8. Re-epitelización del defecto epitelial corneal inducido mediante queratectomía estromal superficial anterior. Cortes histológicos teñidos con H-E. Objetivo 4x y 20x

A la luz de los resultados encontrados en este estudio piloto, decidimos realizar los estudios *in vivo* mediante la inducción del daño corneal con raspado epitelial, aplicando previamente en la superficie ocular durante 20 segundos etanol 20%, para facilitar el desbridamiento.

II. EFECTO DEL HEMODERIVADO s-PRGF EN LA RESOLUCIÓN DE LA EROSIÓN CORNEAL

1. Ensayos *in vitro*

1.1. Proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE

Para estudiar cómo afecta la concentración de s-PRGF a la proliferación de los cultivos RPCE, se realizaron ensayos mediante el método MTT. Se utilizaron concentraciones de s-PRGF del 10%, 20% y 50%, y se determinó la viabilidad celular a tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas.

Los resultados mostraron que todas las concentraciones de s-PRGF producen un patrón de proliferación tiempo-dependiente (Fig. 1 y Tabla 1). Sin embargo no hay una asociación dosis-dependiente estadísticamente significativa.

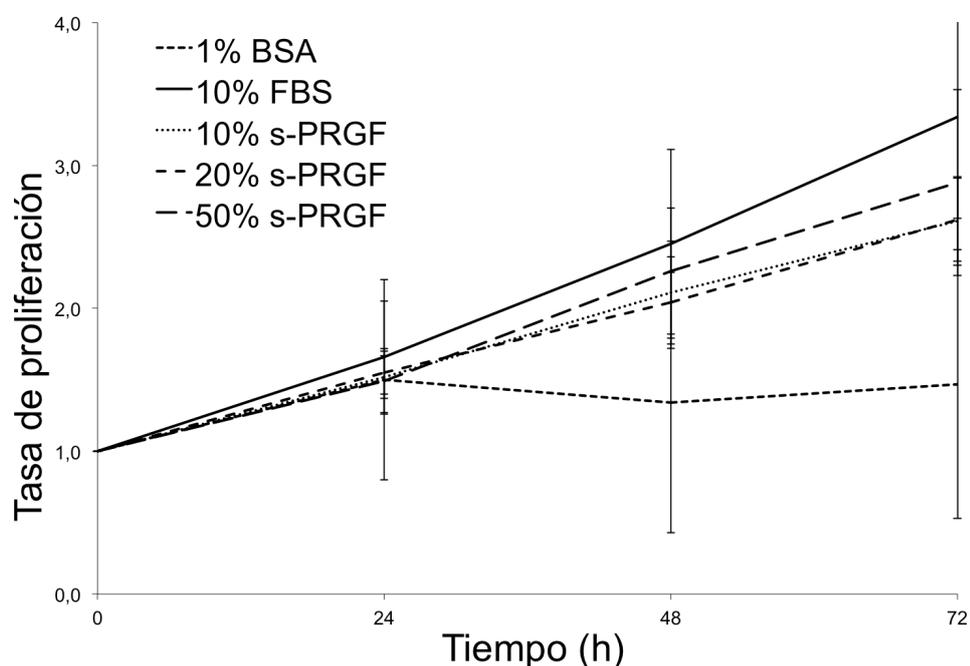


Fig. 1. Efecto del s-PRGF sobre el patrón de proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE). Los cultivos fueron expuestos durante 24, 48 y 72 horas a distintas concentraciones de s-PRGF, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como el ratio de proliferación \pm la desviación estándar con respecto al número de células a tiempo 0 horas. Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre 1% BSA y el resto de los tratamientos a 48 y 72 horas ($p \leq 0,05$, Test de U Mann–Whitney).

Resultados

Tabla 1. Ratio de proliferación de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE) expuestos a distintas concentraciones de s-PRGF, 10% FBS y 1% BSA (como control) a 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como el promedio del ratio de proliferación \pm la desviación estándar con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

Tratamiento	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
1% BSA	1.5 \pm 0.7	1.34 \pm 0.91	1.47 \pm 0.94
10% FBS	1.66 \pm 0.39	2.45* \pm 0.66	3.34* \pm 0.71
10% s-PRGF	1.52 \pm 0.15	2.11* \pm 0.36	2.61* \pm 0.31
20% s-PRGF	1.55 \pm 0.15	2.04* \pm 0.32	2.62* \pm 0.29
50% s-PRGF	1.49 \pm 0.23	2.26* \pm 0.44	2.88* \pm 0.65

* Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p \leq 0.05$, test de U Mann-Whitney)

Solo observamos una débil tendencia a una mayor tasa de proliferación con la concentración del 50% de s-PRGF, comparado con los tratamientos del 10% o 20% de s-PRGF (Figs. 1 y 2). Por otro lado, sí encontramos una tasa de proliferación significativamente mayor en cualquier concentración de s-PRGF (10%, 20% o 50%) respecto al 1% BSA, tanto a 48 como a 72 horas. Notoriamente, no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa en la proliferación de los cultivos tratados con 10% FBS respecto a los cultivos tratados con cualquiera de las concentraciones, 10, 20 o 50% de s-PRGF, en ningún punto temporal de medida. Este resultado es importante, ya que el cultivo de las células con FBS es la condición de cultivo estándar o de referencia para la mayoría de los cultivos celulares.

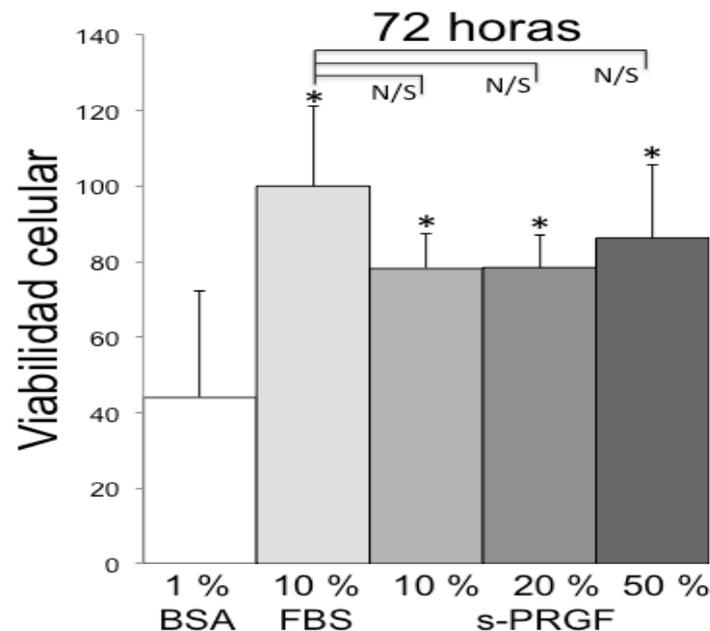


Fig. 2. Viabilidad de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE expuestos durante 72 horas a distintas concentraciones de s-PRGF, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de la viabilidad celular respecto al cultivo tratado con FBS. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna concentración de s-PRGF y el 10% FBS. *Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p \leq 0.05$, Test de U Mann–Whitney). N/S, no significativo.

1.2. Reepitelización de células epiteliales RPCE (*Wound Healing Assay*): migración

Realizamos ensayos de cierre epitelial mediante el “método de la herida” (*scratch wound-healing*) en cultivos de células RPCE para determinar la capacidad del s-PRGF de promocionar la migración *in vitro* y la reepitelización. Tras crear una herida circular en monocapas de cultivo celular de RPCE, dichos defectos epiteliales fueron tratados con 50% s-PRGF, 10% FBS y 1% BSA (como control). El motivo para elegir la dilución del 50% de s-PRGF para estos experimentos fue el haber encontrado una tendencia a los mejores resultados en los ensayos de proliferación con dicha concentración. Encontramos que el s-PRGF acelera la recuperación de la monocapa de células RPCE cuando lo comparamos al control (1% BSA) (Fig. 3), siendo diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos de tiempo.

A pesar de que el FBS no es usado habitualmente en los ensayos de cicatrización, la realidad es que es un suplemento habitual utilizado al 10% para mantener y proliferar

Resultados

los cultivos celulares. Por dicho motivo, lo incluimos en este experimento. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en el cierre de la herida epitelial *in vitro* entre el uso de s-PRGF y FBS (Fig. 3 y Tabla 2).

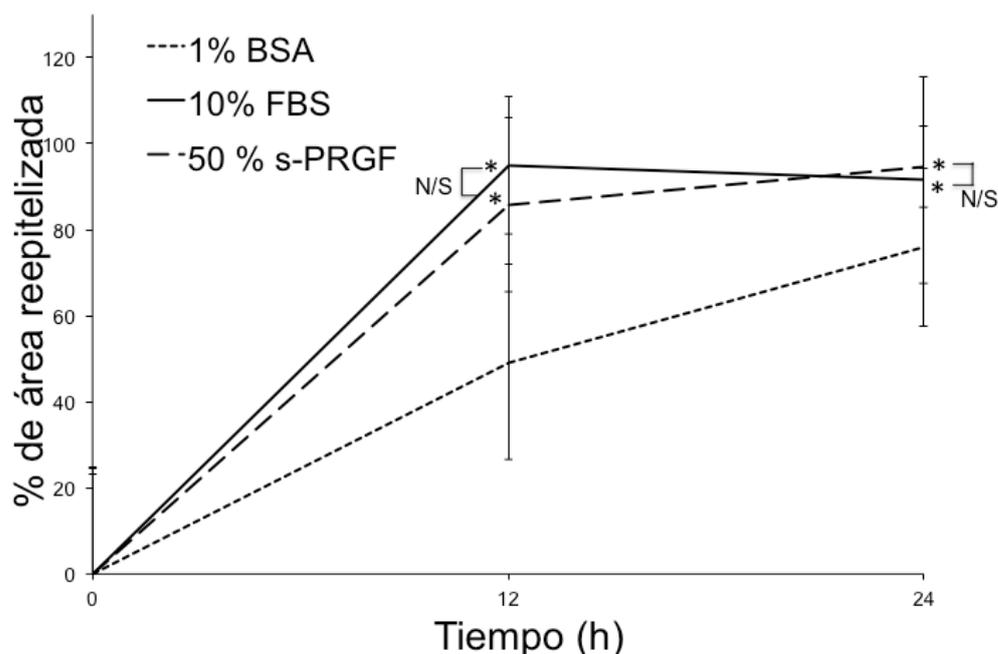


Fig. 3. Porcentaje de área reepitelizada de cultivos con células corneales epiteliales primarias de conejo (RPCE) tras incubación de 12 horas con 50% s-PRGF, 10% FBS y 1% BSA (como control). Tanto s-PRGF como FBS estimulan la migración de células RPCE comparados con el control. No hay diferencias estadísticamente significativas entre s-PRGF y 10%FBS.

* Diferencias estadísticamente significativas respecto a 1% BSA ($p \leq 0.05$, Test de U Mann-Whitney). N/S: No significativo.

Tabla 2. Experimento de reepitelización *in vitro* mostrando el cierre de defectos epiteliales inducidos en cultivos primarios de células de epitelio corneal de conejo (RPCE) al ser expuestos a medios de cultivo con 50% s-PRGF, 10% FBS y 1% BSA (como control). Los resultados se expresan en áreas desnudas \pm desviación estándar (en mm^2).

Tratamiento	Tiempo		
	0 horas	12 horas	24 horas
1% BSA	0.629 \pm 0.145	0.318 \pm 0.142	0.152 \pm 0.116
10% FBS	0.649 \pm 0.16	0.033* \pm 0.103	0.055* \pm 0.156
50% s-PRGF	0.631 \pm 0.154	0.089* \pm 0.128	0.034* \pm 0.059

* Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p \leq 0.05$, test de U Mann-Whitney)

2. *In vivo*

2.1 Reepitelización *in vivo* en modelo animal de conejo

Motivados por los efectos *in vitro* del s-PRGF en proliferación y reepitelización de células RPCE, realizamos un estudio *in vivo* para estudiar la reepitelización en un modelo animal. El objetivo era comprobar la seguridad y la eficacia del s-PRGF *in vivo* con objeto de tener un apoyo que soporte su uso en defectos epiteliales corneales en humanos. Inducimos quirúrgicamente defectos epiteliales del mismo tamaño en diferentes conejos, siendo asignado cada uno de ellos a un grupo de tratamiento de forma aleatoria: 20%, 50%, 100% s-PRGF o lágrimas artificiales como control.

No se observó ningún efecto adverso, como inflamación o neovascularización, en ninguno de los grupos del estudio ni durante el proceso de cierre epitelial ni cuando la reepitelización completa de la herida se había conseguido (Fig. 4). Todos los conejos siguieron sanos y siguieron ganando peso progresivamente como correspondía.

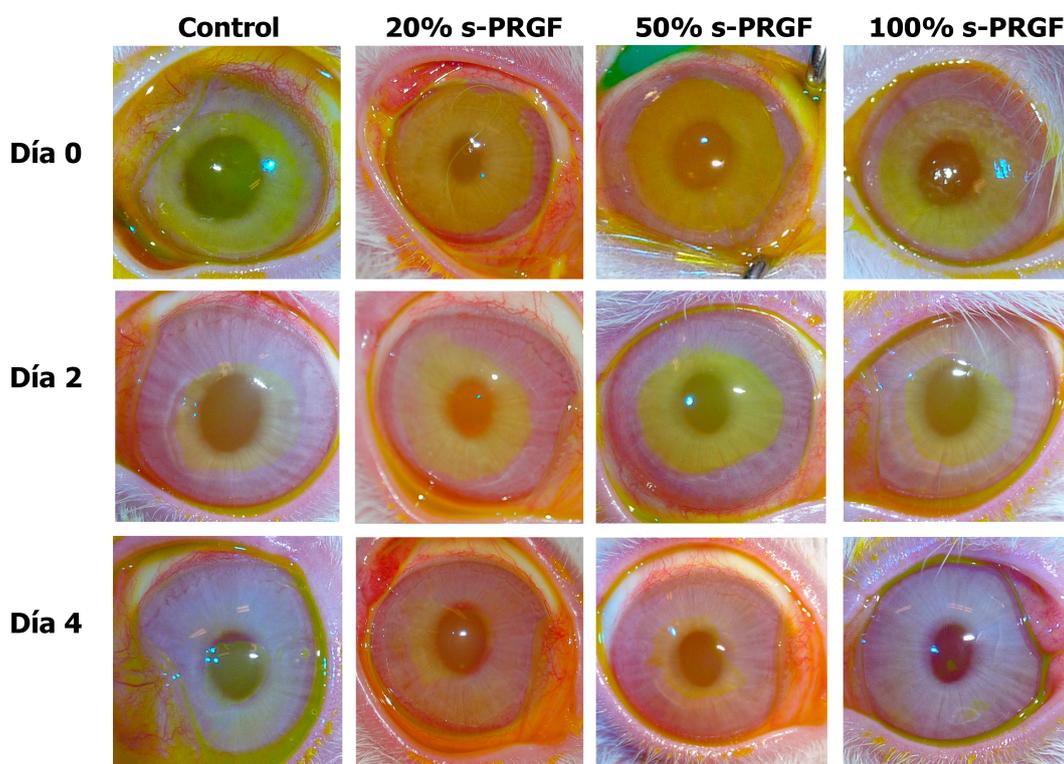


Fig. 4. Evolución del defecto epitelial *in vivo* en los ojos de conejo tratados con concentraciones crecientes de s-PRGF o lágrimas artificiales (como control). El defecto epitelial fue monitorizado con tinción de fluoresceína. Se observa que el 100% s-PRGF favorece una cicatrización epitelial significativamente más rápida que cualquier otro tratamiento.

Resultados

Sí se observó que el 100% s-PRGF promueve un cierre de la herida epitelial corneal más rápido que cualquiera de los otros tratamientos (Tabla 3).

Es de destacar que la herida epitelial estaba totalmente cerrada en la mayoría de los conejos tratados con 100% s-PRGF para el día 4 postcirugía, y en todos los conejos en el día 5, mostrando un tiempo medio de cierre epitelial completo 4.8 ± 0.45 días (Fig. 5).

Es más, esta media era significativamente menor respecto a los tiempos medios de cierre con cualquiera de los otros tres tratamientos, siendo de 5.8 ± 3.50 días para los ojos con 20% s-PRGF, 5.8 ± 3.47 días para los ojos con 50% s-PRGF y 6.2 ± 1.30 días para los ojos con control de lágrimas artificiales.

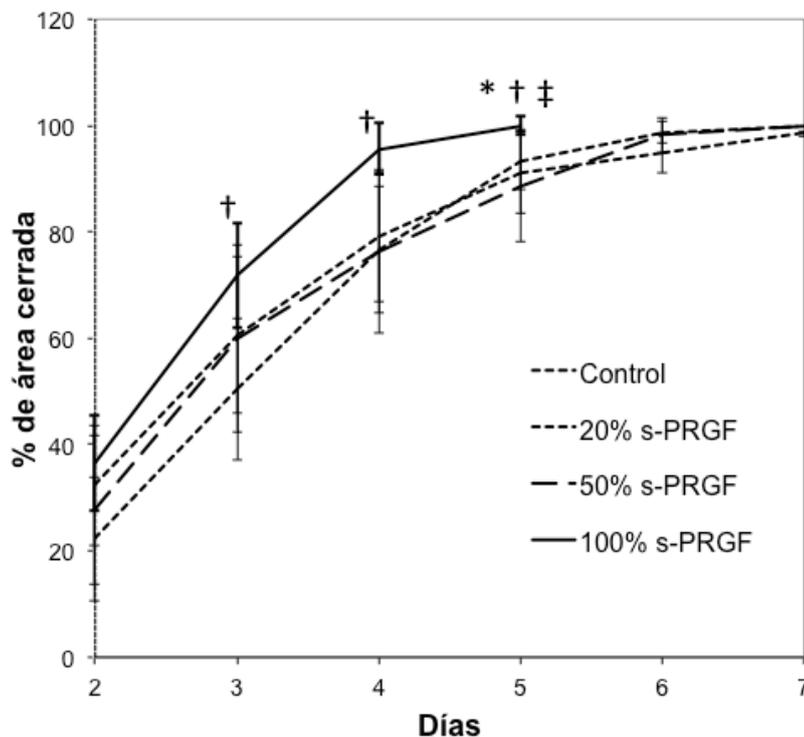


Fig. 5. Evolución del defecto epitelial *in vivo* en los ojos de conejo. Porcentaje del área inicial de la herida epitelial quirúrgica que ha cerrado en función de los días postcirugía y el tratamiento utilizado (diferentes concentraciones s-PRGF y lágrimas artificiales). Los ojos tratados con 100% s-PRGF cierran mucho más rápido que cualquiera de los otros tratamientos utilizados, y de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$, test de U Mann-Whitney) respecto al tratamiento control (*); respecto al 20% s-PRGF (†); respecto al 50% s-PRGF (‡).

Tabla 3. Experimento *in vivo* mostrando la progresión del cierre epitelial en conejos tratados con distintas concentraciones de s-PRGF o lágrimas artificiales como control. Los resultados se expresan como la media de herida corneal abierta (en mm²) ± la desviación estándar. El área de defecto epitelial en el día 0 era el mismo en todos los tratamientos.

Tratamiento	TIEMPO (días)					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Control	61.1 ± 7.6	41.3 ± 11.4	24.9 ± 14.7	13.3 ± 12.3	6.0 ± 7.8	1.8 ± 3.8
20% s-PRGF	57.2 ± 9.3	44.8 ± 11.7	29.2 ± 13.3	14.3 ± 11.8	4.2 ± 5.4	0.6 ± 2.0
50% s-PRGF	56.2 ± 8.2	41.5 ± 14.1	23.8 ± 17.7	14.5 ± 15.3	7.1 ± 10.6	0.9 ± 3.4
100% s-PRGF	55.3 ± 8.9	35.6 ± 9.8	15.6 ± 4.7 †	2.8 ± 1.7 †	0.0 * †‡	

Diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento control (*), al 20% s-PRGF (†) y al 50% s-PRGF (‡) ($p \leq 0.05$, Test U Mann-Whitney).

Resultados

Si nos centramos en el día 5 postcirugía, todos los defectos epiteliales que estuvieron tratados con 100% s-PRGF habían cerrado (5/5), mientras que solo el 30-40% de ellos habían epitelizado cuando se usó el 20% s-PRGF (3/9), 50% s-PRGF (4/9) o el control (2/5) (Fig. 6). Finalmente, no encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos entre sí los grupos control, 20% y 50% s-PRGF en ninguno de los tiempos medidos durante el proceso de cierre epitelial corneal.

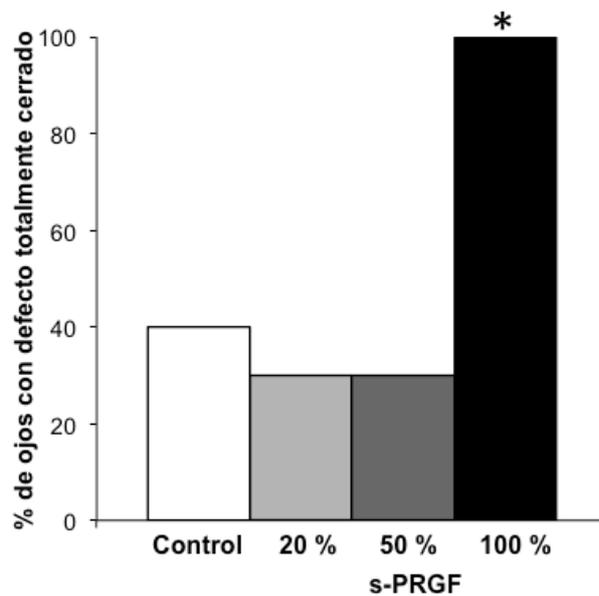


Fig. 6. Porcentaje de defectos epiteliales completamente resueltos para el día 5 postcirugía. Todos los ojos tratados con 100% s-PRGF habían cerrado, mientras que solo el 30-40% con 20% s-PRGF, 50% s-PRGF o grupo control lo habían hecho. *Diferencia estadísticamente significativa respecto a todo el resto de tratamientos ($p < 0.05$, Test Chi cuadrado).

2.2. Análisis histológico

2.2.1 Hematoxilina-eosina

Se realizaron cortes histológicos de la córnea central de los conejos después de la cicatrización epitelial, y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los resultados mostraron que en todos los ojos de conejos había cerrado correctamente el defecto epitelial. La reparación epitelial era normal, observándose un epitelio pluriestratificado, no queratinizado y bien organizado (Fig. 7). Solo se apreció, como algo reseñable, que ocurre una hiperplasia focal de una o dos capas más de células epiteliales en todas las córneas reepitelizadas respecto a secciones histológicas de córnea sana. No se apreciaron alteraciones en el endotelio. El grosor estromal se mantuvo a lo largo de toda la córnea, con fibras de colágeno sanas. Sin embargo, encontramos que en los conejos que habían sido sacrificados 7 días después de la cirugía de desepitelización, los queratocitos desaparecieron del tercio anterior del estroma en aquellos casos en los que estaban bajo tratamiento control (Fig. 8). Es interesante destacar que la densidad de queratocitos se incrementa progresivamente a medida que aumenta la concentración de s-PRGF, desde el 20%, al 50% y al 100% de s-PRGF (Tabla 4). Así, el número de queratocitos fue 1.5 ± 1.64 para los ojos bajo tratamiento control, 2.7 ± 1.75 para los ojos con 20% s-PRGF, 7.0 ± 4.34 para los ojos con 50% s-PRGF, y 34.7 ± 2.31 para los ojos con 100% s-PRGF. Es más, a los 7 días tras la inducción quirúrgica de la herida, los ojos que estuvieron con 100% s-PRGF ya tenían todo el grosor estromal con queratocitos. Encontramos que las diferencias en cuanto al número de queratocitos estromales eran estadísticamente significativas en ojos tratados con 50% y 100% s-PRGF respecto a los ojos con tratamiento control ($p=0.020$ y $p=0.019$, respectivamente). Solo los ojos tratados con 100% s-PRGF tenían diferencias significativas en el número de queratocitos con todos los tratamientos, incluyendo el 50% s-PRGF ($p=0,020$).

Por otro lado, en los defectos epiteliales inducidos 30 días antes de la eutanasia, independientemente del tratamiento recibido, incluidos los ojos con tratamiento control, los queratocitos ocupaban todas las capas del estroma, (Fig. 9)

Resultados

Tabla 4. Número de queratocitos en el tercio anterior del estroma corneal según el tratamiento recibido. La cuantificación se realizó 7 días tras la inducción quirúrgica de la herida. Los resultados se expresan como la media \pm la desviación estándar del número de células. Las células se contaron con objetivo 20x en 3 campos aleatorios del estroma anterior de 3 conejos por tratamiento.

	Control	20% s-PRGF	50% s-PRGF	100% s-PRGF
X \pm SD	1.5 \pm 1.64	2.7 \pm 1.75	7.0 \pm 4.34	34.7 \pm 2.31
Control	-	N/S	*	*
20% s-PRGF	-	-	N/S	*
50% s-PRGF	-	-	-	*
100% s-PRGF	-	-	-	-

* Diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($p \leq 0.05$, Test U Mann-Whitney)

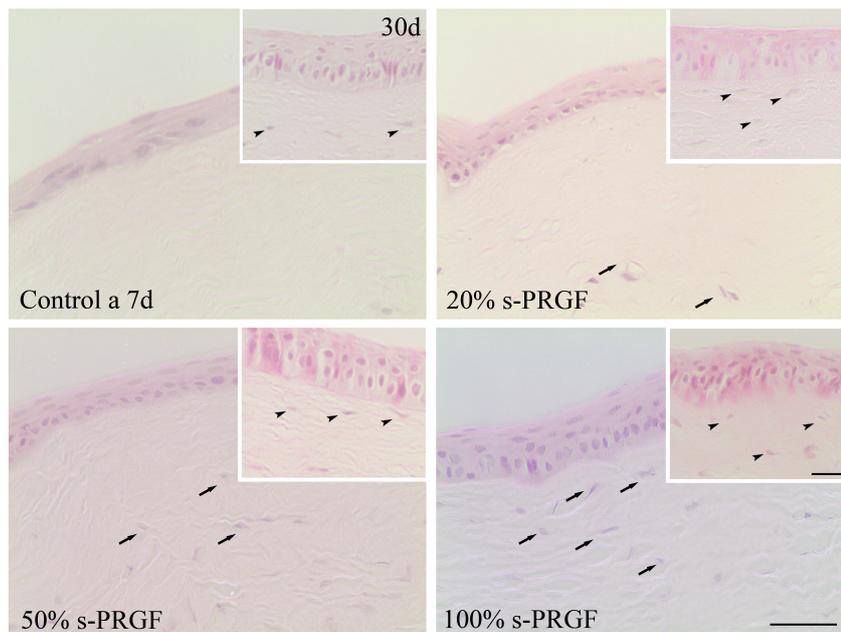


Fig. 7: Secciones histológicas de cornea central de conejo, tras reepitelización in vivo tras ser tratadas con diferentes concentraciones de colirio de s-PRGF o lágrimas artificiales. Tinción Hematoxilina-eosina. Las corneas fueron procesadas 7 días tras la cirugía de desepitelización (fotografías grandes, barra de escala de medida 50 μ m), o a los 30 días (fotografías pequeñas, recuadros arriba a la derecha, barra de escala de medida 25 μ m). Se aprecia reparación epitelial completa con histología normal del epitelio en todas las corneas, independientemente del tratamiento recibido. Cuando la eutanasia fue realizada 7 días después de la cirugía, el número de queratocitos en el tercio anterior del estroma estaba en relación a la concentración de s-PRGF usado. A 30 días, independientemente del tratamiento usado, los queratocitos ocupaban todo el espesor del estroma. Las flechas indican localización de queratocitos.

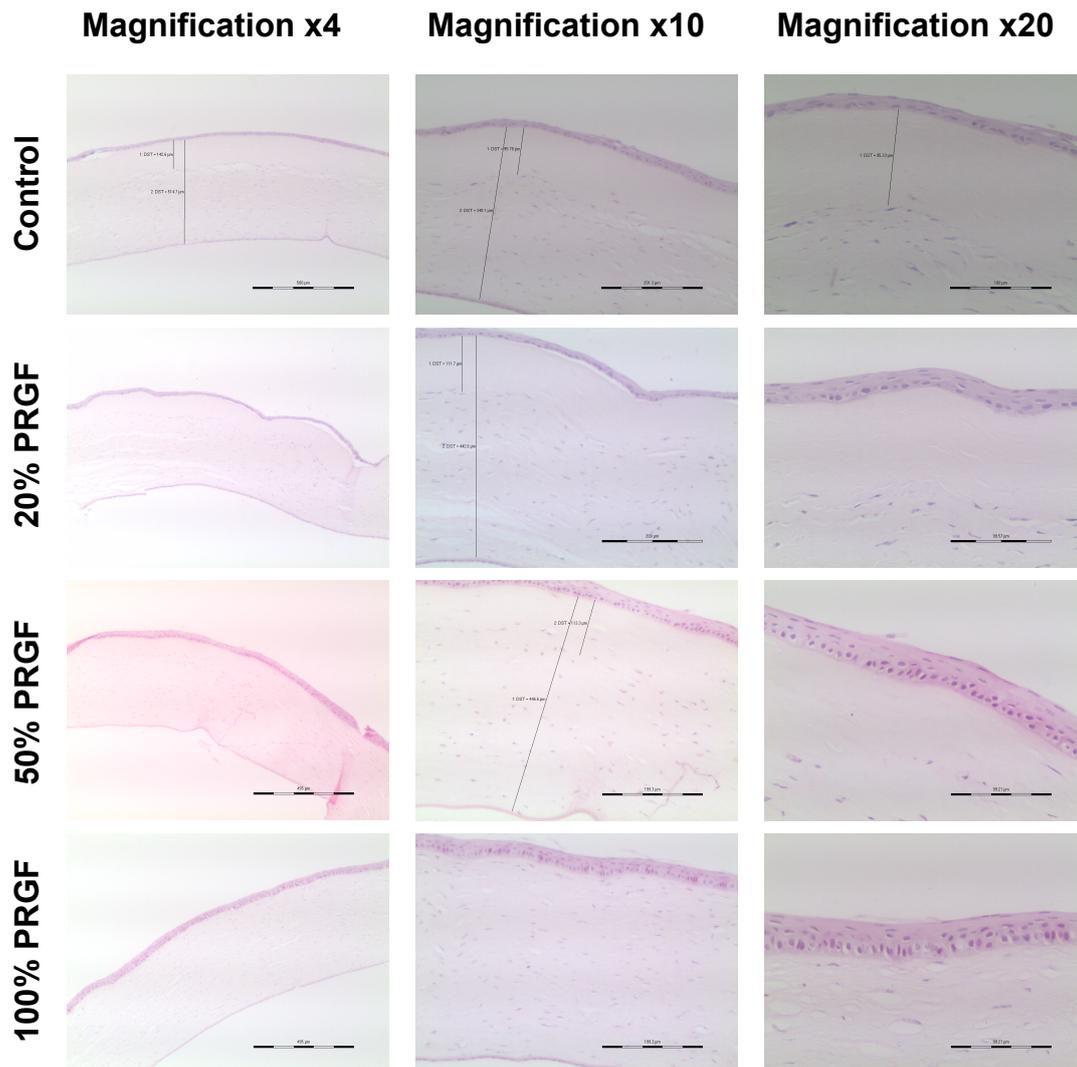


Fig. 8: Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina mostrando áreas centrales de las corneas ya epitelizadas de conejos tratados con diferentes concentraciones de s-PRGF o lágrimas artificiales como control. Se observa una completa reparación con histología normal del epitelio en todas las corneas. Cuando la eutanasia se realiza 7 días después de la cirugía el número de queratocitos en el tercio anterior del estroma aumentaba conforme lo hacía la concentración de s-PRGF utilizado. Barra escala 500 μm (objetivo 4x); 200 μm (objetivo 10x); 100 μm (objetivo 20x).

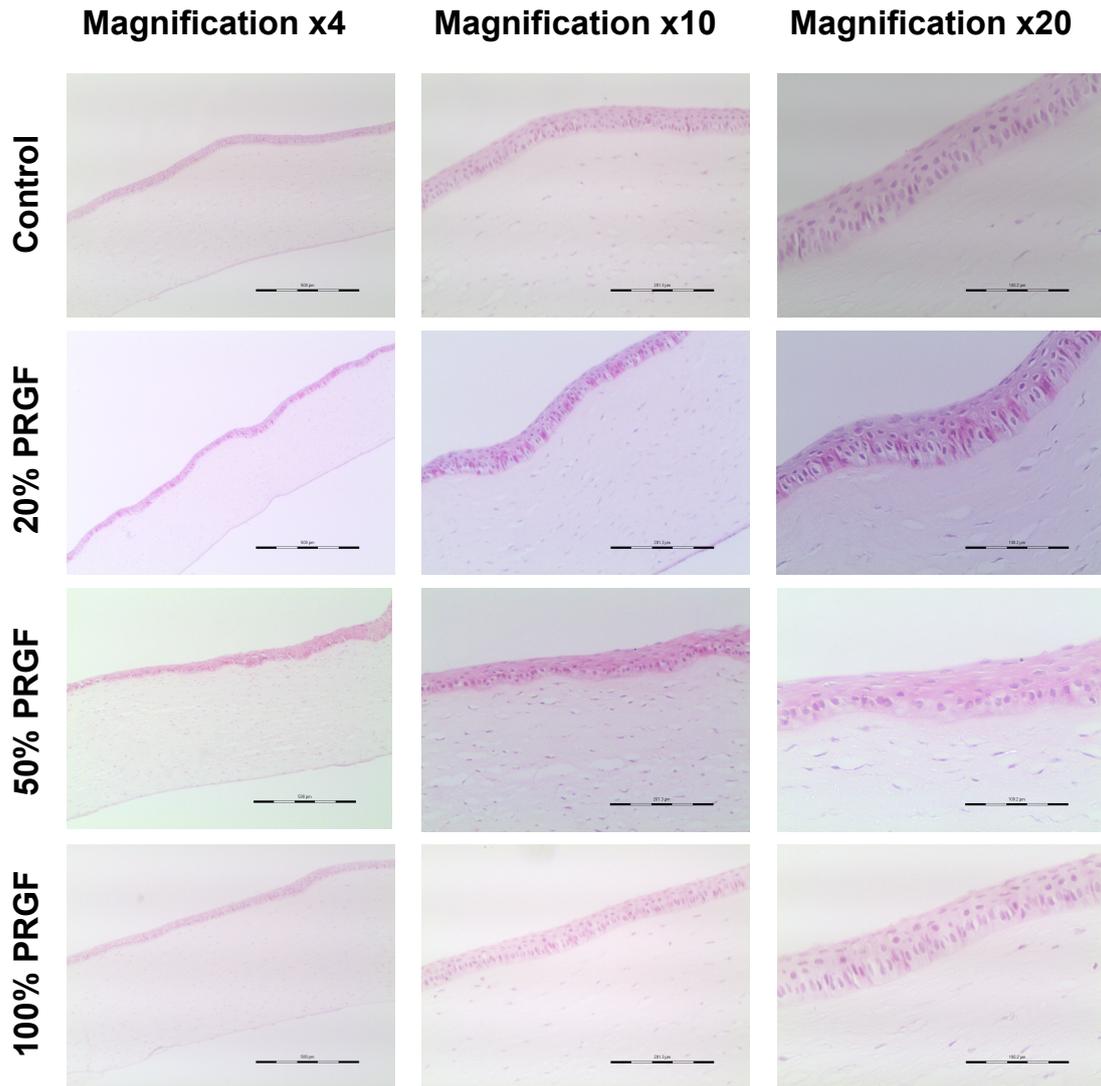


Fig. 9: Cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina mostrando áreas centrales de las córneas ya epitelizadas de conejos tratados con diferentes concentraciones de s-PRGF o lágrimas artificiales como control. Se observa una completa reparación con histología normal del epitelio en todas las córneas. Cuando la eutanasia se realiza 30 días después de la cirugía había queratocitos en todo el espesor del estroma corneal, independientemente del tratamiento usado. Barra escala 500 μm (objetivo 4x); 200 μm (objetivo 10x); 100 μm (objetivo 20x).

2.2.1.1 Migración e invasión de queratocitos (Ensayo tipo Transwell)

Para confirmar este hallazgo sobre un posible efecto quimiotáctico del s-PRGF sobre los queratocitos del estroma corneal de conejo, diseñamos un ensayo *in vitro* de migración e invasión de tipo Transwell. Teniendo en cuenta que estos experimentos duran sólo 24 horas y con el objetivo de usar la concentración máxima de s-PRGF, comparamos el potencial quimiotáctico sobre queratocitos entre 50%, 80% s-PRGF, 10% FBS y 1% BSA (tratamiento control). Encontramos que las tasas más altas de migración se dieron con las dos concentraciones utilizadas de s-PRGF (Tabla 5), siendo estadísticamente significativas respecto a las conseguidas con FBS o BSA. Es más, encontramos que la estimulación de la migración de queratocitos con 50% s-PRGF fue significativamente mayor que cuando se usa 80% s-PRGF. Por otro lado, independientemente del medio usado, no se encontraron diferencias en la capacidad de invasión de los queratocitos (Tabla 5 y Fig.10).

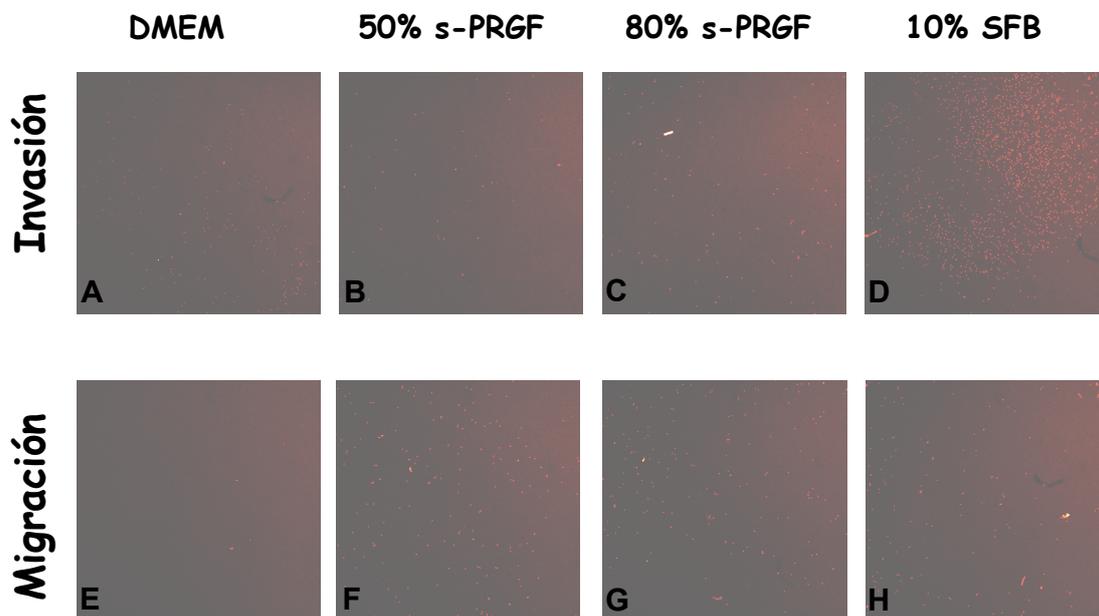


Fig. 10. Número de células que migran a través del filtro o invaden el Matrigel según los distintos tratamientos recibidos. Los filtros se tiñeron con DAPI y se fotografiaron con un microscopio confocal.

Resultados

Tabla 5. Experimento de quimiotaxis de queratocitos. Número de queratocitos \pm desviación estándar que migran a través del filtro (tras 7 horas) o invaden el Matrigel (tras 1 día) de incubación con uno de los siguientes tratamientos: 50% s-PRGF, 80% s-PRGF, 10% FBS o 1% BSA (como control).

Tratamiento	Migración	Invasión
1% BSA	31.77\dagger \pm 12.91	304.66 \pm 34.37
50% s-PRGF	283* \pm 28.10	206.22 \pm 68.04
80% s-PRGF	208.56*\dagger \pm 94.11	215.88 \pm 65.28
10%FBS	162.44\dagger \pm 88.04	1102.58 \pm 1125.49

Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (*) o respecto al 50% s-PRGF (\dagger). ($p \leq 0.05$, test de U Mann-Whitney).

2.2.2. Análisis inmunohistoquímicos (cortes en parafina)

Para evaluar los mecanismos a través de los cuales el s-PRGF autólogo favorece el cierre de la herida epitelial corneal usamos técnicas inmunohistoquímicas en cortes de parafina de córneas de conejo obtenidas tras la cicatrización epitelial, y analizamos una serie de marcadores celulares.

2.2.2.1 Análisis del marcador CK3/76

La citoqueratina 3 ó K3, junto con la K12, son citoqueratinas descritas como marcadores de células diferenciadas del epitelio corneal. Estas citoqueratinas aparecen expresadas en todas las capas de los epitelios corneales y en las capas suprabasales del epitelio limbar en las córneas sanas.

Las figura 12 muestra un aumento en el número de capas celulares de epitelio que tiñen para la citoqueratina K3, así como un aumento de la intensidad de la tinción a medida que aumenta la concentración de s-PRGF utilizado y el tiempo transcurrido desde la cirugía. Se observa que la tinción es especialmente evidente a los 30 días tras la cirugía en ojos que habían recibido el tratamiento con 100% s-PRGF (Fig. 11).

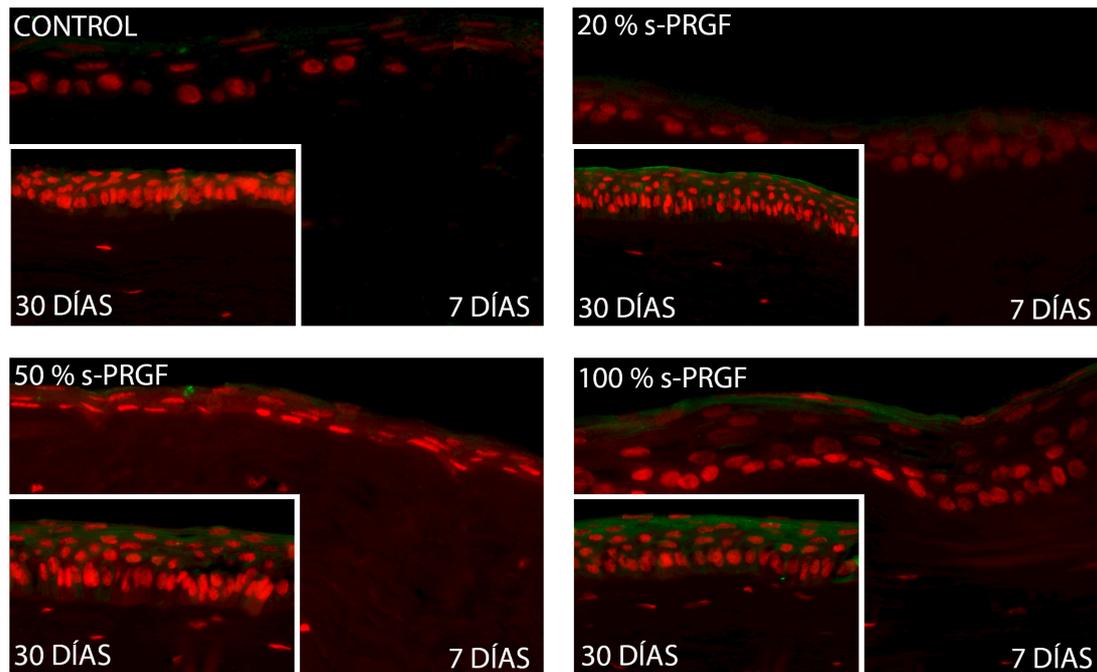


Fig. 11. Inmunomarcaje fluorescente para Citoqueratina 3 (K3) (verde) en la córnea central de conejo tras el cierre del defecto epitelial. Las córneas fueron tratadas con diferentes concentraciones tópicas de s-PRGF o lágrimas artificiales y fueron extraídas tras la eutanasia a los 7 o 30 días tras la cirugía de desepitelización. Se observa un aumento en el número de capas de células epiteliales que se tiñen con K3, así como un aumento en la intensidad de la tinción a medida que aumenta la concentración de s-PRGF y el tiempo que pasa desde la cirugía. La tinción es especialmente evidente a los 30 días tras la cirugía y en ojos que fueron tratados con 100% s-PRGF. Barra escala: 50 µm.

2.2.2.2 Análisis del marcador ZO-1

ZO-1 pertenece a la familia de proteínas *zona occludens proteins*. Son proteínas localizadas en la membrana plasmática de células epiteliales y endoteliales que forman parte de los complejos de unión intercelulares conocidos como uniones estrechas, uniones ocluyentes, *zonula occludens* o *tight junctions*. Su función consiste en crear una barrera de impermeabilidad, impidiendo que haya un libre flujo de sustancias entre las células y, obligando de este modo, a que el paso de las mismas se haga de forma selectiva a través de las células.

En la córnea, la presencia de ZO-1 es un indicativo de la existencia de células epiteliales diferenciadas superficiales, así como del establecimiento del efecto de barrera corneal, coherente con un epitelio corneal funcional.

La figura 13 muestra un aumento en el número de capas celulares de epitelio que se marcan para la proteína ZO-1, así como un aumento de la intensidad de la tinción a medida que aumenta la concentración de s-PRGF utilizado y el tiempo transcurrido

Resultados

desde la cirugía. La tinción es especialmente evidente a los 30 días de la cirugía en ojos que habían recibido el tratamiento con 100% s-PRGF (Fig. 12).

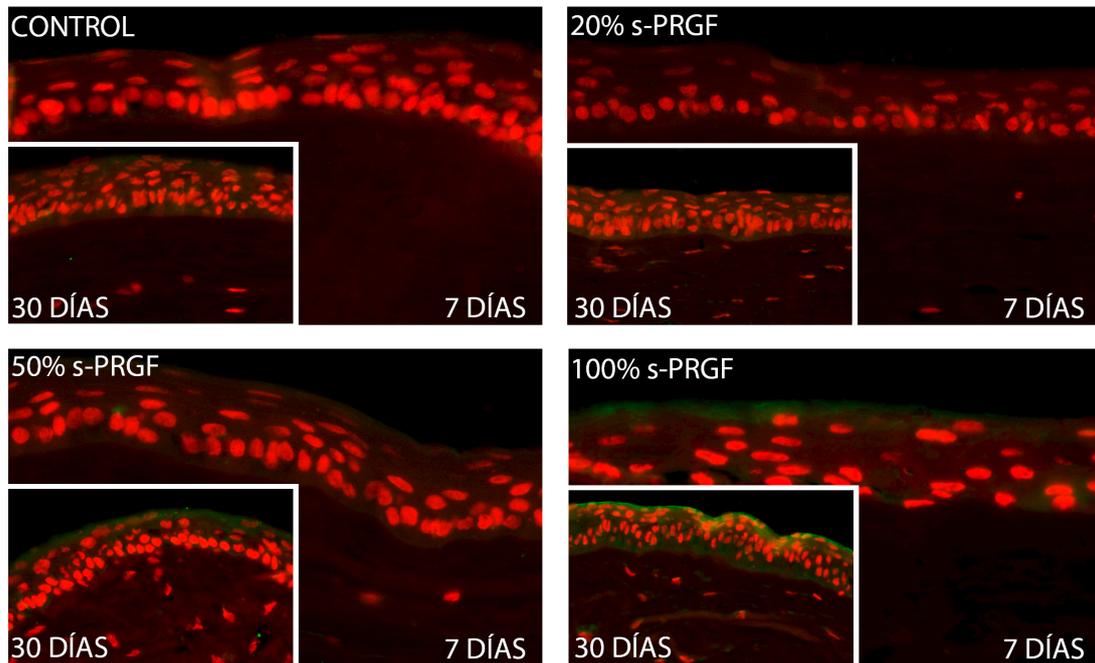


Fig. 12. Inmunomarcaje fluorescente para *zonula occludens-1* (ZO-1) (verde) en la córnea central de conejo tras el cierre del defecto epitelial. Las córneas fueron tratadas con diferentes concentraciones tópicas de s-PRGF o lágrimas artificiales y fueron extraídas tras la eutanasia a los 7 o 30 días tras la cirugía de desepitelización. Se observa un aumento en el número de capas de células epiteliales que se tiñen con ZO-1, así como un aumento en la intensidad de la tinción a medida que aumenta la concentración de s-PRGF y el tiempo que pasa desde la cirugía. Barra escala: 50 µm.

2.2.2.3 Análisis del marcador CK15

Cuando analizamos el limbo esclerocorneal, donde residen las células progenitoras del epitelio corneal, utilizamos el marcador de células progenitoras limbares citoqueratina 15 ó K15, apreciando una tinción positiva en limbo, que se incrementaba en intensidad a medida que aumentaba la concentración de s-PRGF utilizado. Tiene especial relevancia la presencia de clusters prominentes de células no diferenciadas K15 positivas en el epitelio limbar basal de ojos que recibieron tratamiento con 100% s-PRGF y fueron sacrificados a los 30 días tras la cirugía (Fig. 13).

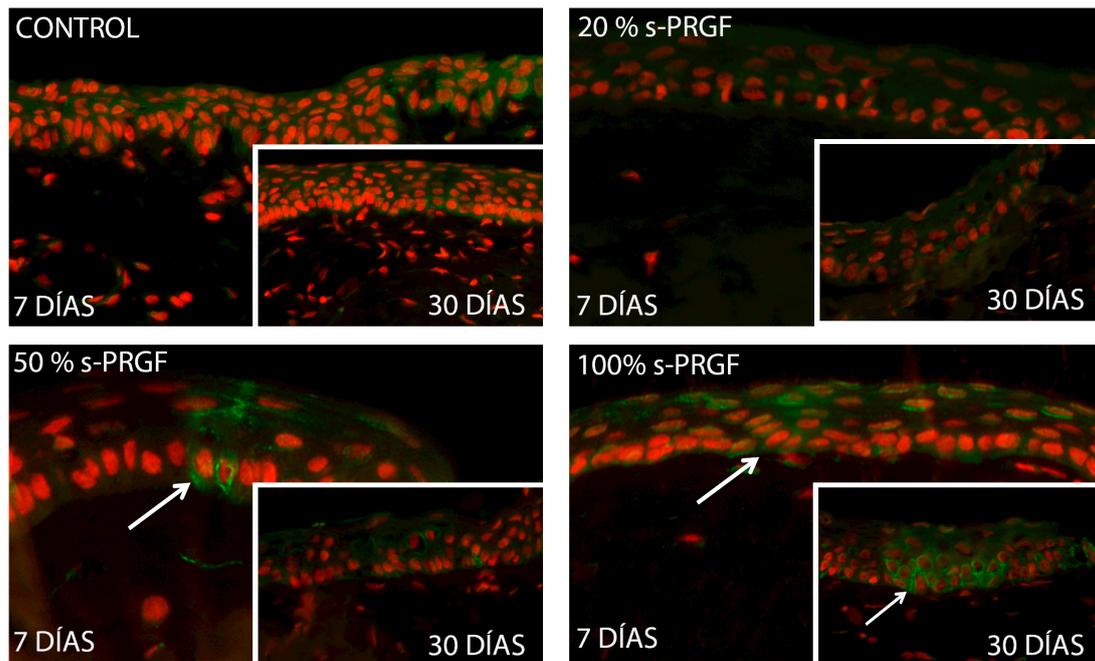


Fig. 13. Inmunomarcaje fluorescente para Citoqueratina 15 (K15) (verde) en la zona limbar de las córneas de conejo tras el cierre del defecto epitelial. Las córneas fueron tratadas con diferentes concentraciones tópicas de s-PRGF o lágrimas artificiales y fueron extraídas tras la eutanasia a los 7 o 30 días tras la cirugía de desepitelización. Se observa un aumento de la tinción a medida que aumenta la concentración de s-PRGF utilizado. Notoriamente, se aprecian prominentes *clusters* de células indiferenciadas (positivas para k15) en el epitelio basal del limbo de ojos tratados con 100% s-PRGF. Barra escala: 50 μ m.

2.2.2.4 Análisis del marcador α -SMA

Cuando se produce un daño corneal, algunos queratocitos del estroma se transforman en fibroblastos corneales y posteriormente en miofibroblastos. Los miofibroblastos son células fibroblásticas con algunas características ultraestructurales y fisiológicas de las células de músculo liso, como la presencia de prominentes haces de microfilamentos o fibras de estrés. Esto les permite ejercer fuerzas contráctiles y dirigir la reorganización de la matriz extracelular en el lugar de la herida (Jester, 1995).

La actina alfa de músculo liso (α -SMA) es un marcador de células de músculo liso, pero también de fibroblastos corneales y de miofibroblastos.

Los resultados mostraron que, a día 7 tras la cirugía, la tinción α -SMA de los citoplasmas de las células estromales fue claramente detectada sólo en corneas que recibieron tratamiento con 100% s-PRGF. A día 30 tras cirugía, la tinción α -SMA de las córneas que habían recibido 100% s-PRGF disminuía marcadamente, quedando solo una leve expresión positiva de la misma (Fig. 14).

Resultados

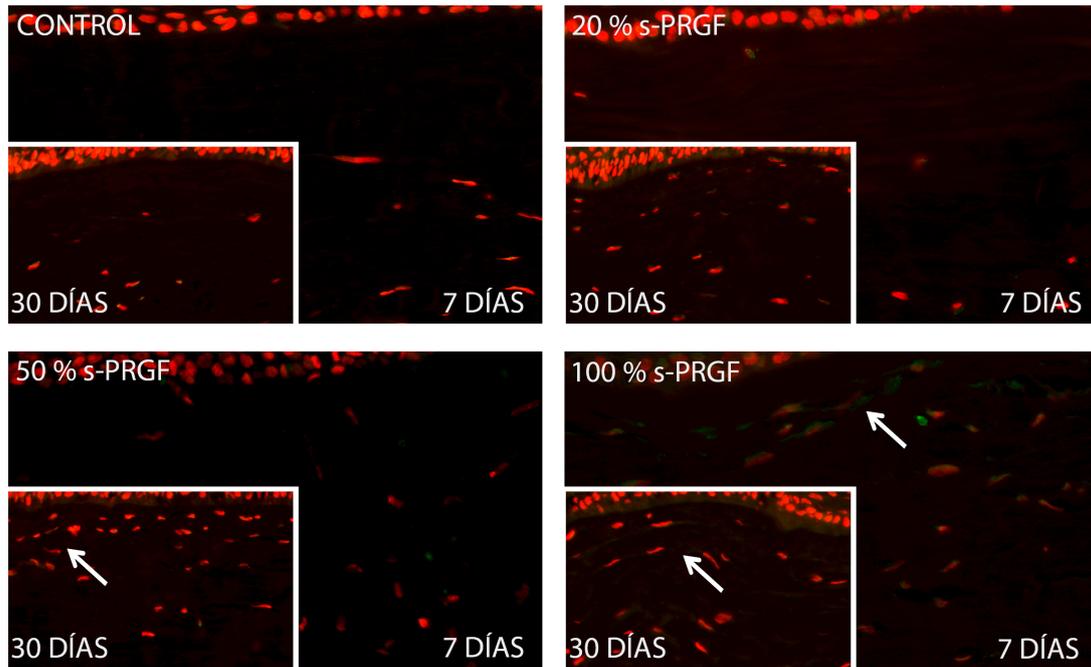


Fig. 14. Inmunomarcaje fluorescente para la actina alfa de músculo liso (α -SMA) (verde) en la córnea central de conejo tras el cierre del defecto epitelial. Las córneas fueron tratadas con diferentes concentraciones tópicas de s-PRGF o lágrimas artificiales y fueron extraídas tras la eutanasia a los 7 o 30 días tras la cirugía de desepitelización. En el día 7 tras la cirugía, la tinción α -SMA del citoplasma de las células estromales se detecta claramente sólo en córneas tratadas con 100% s-PRGF. En el día 30 tras la cirugía, la tinción α -SMA en las corneas tratadas con 100% s-PRGF disminuye marcadamente, quedando únicamente una leve expresión residual. Barra escala: 50 μ m.

III. EFECTO DEL USO COMBINADO DE UN BIOPOLÍMERO ADHESIVO CON EL s-PRGF EN LA RESOLUCIÓN DE LA EROSIÓN CORNEAL

1. Ensayos *in vitro*

1.1. Proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE

Basados en la hipótesis de que la utilización conjunta del s-PRGF con el biopolímero adhesivo ácido hialurónico (HaNa) podría favorecer significativamente la cicatrización corneal, estudiamos mediante el método MTT la proliferación de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (células RPCE) sometidos a los siguientes tratamientos: 45% s-PRGF, 45% s-PRGF + 0,1% HaNa (combinado), 0,1% HaNa, 10% FBS y 1% BSA como tratamiento control, determinando la viabilidad celular a tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas.

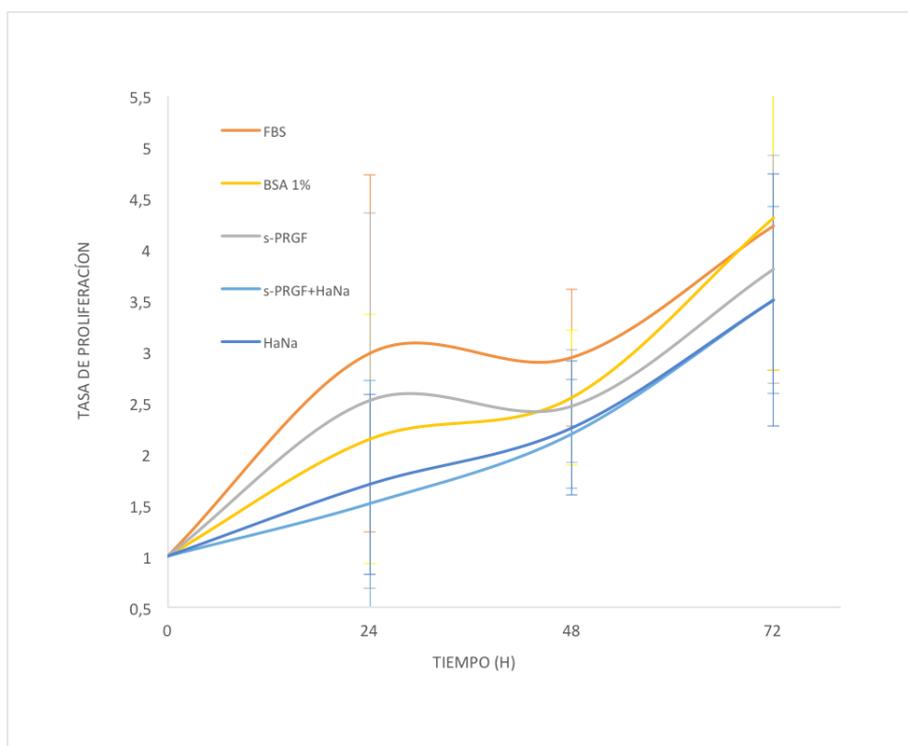


Fig 1. Efecto del tratamiento conjunto de s-PRGF con HaNa sobre el patrón de proliferación de cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE). Los cultivos fueron expuestos durante 24, 48 y 72 horas a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como el ratio de proliferación \pm la desviación estándar con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

Resultados

Los resultados mostraron que todos los tratamientos producen un patrón de proliferación tiempo-dependiente, sin diferencias significativas en el ratio de proliferación entre los distintos tratamientos a 72h de cultivo (Fig. 1 y Tabla 1).

Tabla 1. Ratio de proliferación de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE) expuestos a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como control) a 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como el promedio del ratio de proliferación \pm la desviación estándar. El cálculo del ratio se realiza con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

Tratamiento	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
1% BSA	2,14 \pm 1.22	2.55 \pm 0.66	4.31 \pm 1.49
10% FBS	2.98 \pm 1.75	2.94 \pm 0.67	4.23 \pm 1.41
45% s-PRGF	2.52 \pm 1.84	2.47 \pm 0.55	3.81 \pm 1.12
45% s-PRGF+ HaNa	1.51^{†††#} \pm 1.2	2.19^{††} \pm 0.53	3.5 \pm 0.91
0,1% HaNa	1.70[†] \pm 0.88	2.25[†] \pm 0.66	3.50 \pm 1.23

Diferencias estadísticamente significativas respecto al FBS ([†]) o respecto al s-PRGF ([#]). (Test de Dunn-Bonferroni: [†]p \leq 0.05; ^{††}p \leq 0,01; ^{†††}p \leq 0,001; n/s, no significativo).

La viabilidad de los cultivos RPCE expuestos a los distintos tratamientos fue muy similar en todos los casos. Observamos que en las primeras 24-48 horas la viabilidad fue superior, en general, con el FBS, medio de cultivo estándar de referencia. Sin embargo, las diferencias se fueron igualando a lo largo del tiempo, especialmente con el cultivo tratado con s-PRGF y con el tratamiento control (Fig. 2 y Tabla 2).

Así, a las 24 horas observamos diferencias altamente significativas entre el tratamiento con FBS y los tratamientos con HaNa, tanto solo como combinado con el hemoderivado, así como diferencias muy significativas entre el FBS y el tratamiento control. Sin embargo, a 24 horas no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el FBS y el s-PRGF (p=0,42). Además, se encontraron diferencias significativas entre el s-PRGF y ambos tratamientos con HaNa. Por lo tanto, la proliferación de los cultivos RPCE a 24 horas fue similar para aquellos tratados con FBS y el hemoderivado s-PRGF, y muy superior al resto de tratamientos.

A 48 horas se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos respecto al FBS, siendo éstas menores que a 24 horas, y que desaparecieron por completo a las 72h.

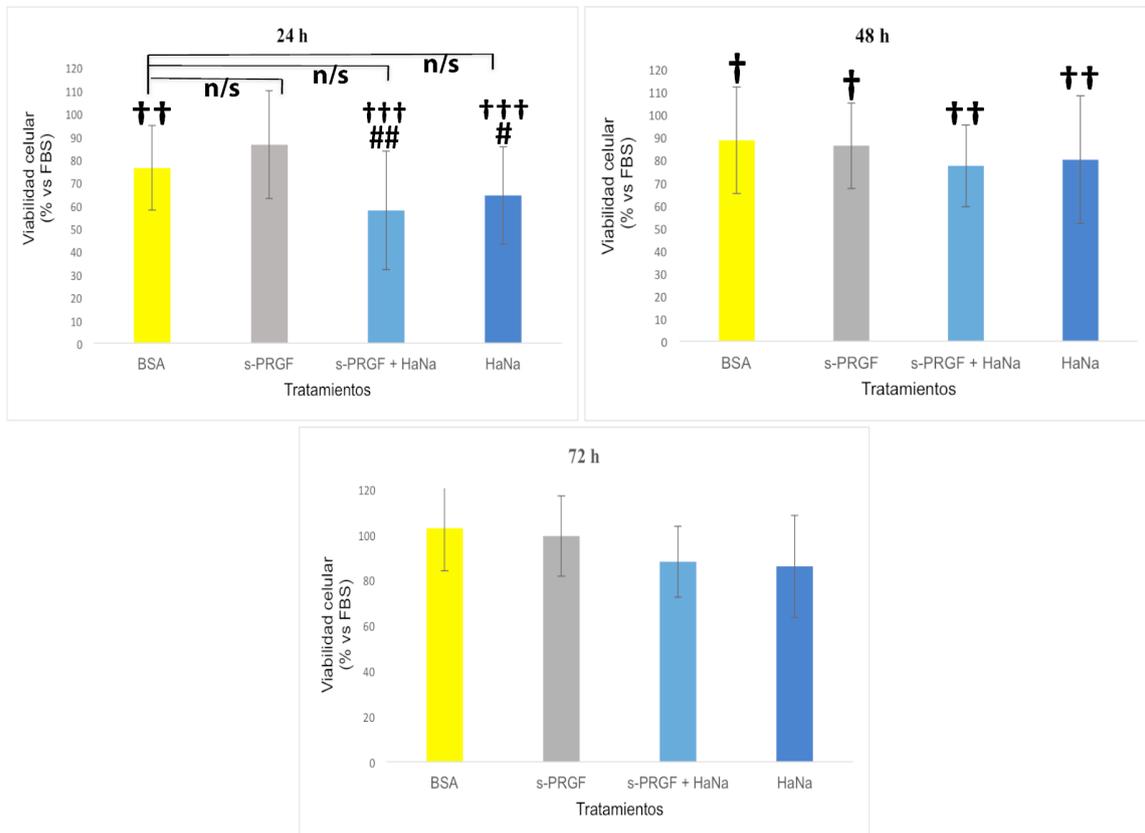


Fig 2. Viabilidad de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE expuestos durante 24, 48 y 72 horas a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de la viabilidad celular respecto al cultivo tratado con FBS (control +: 100% de viabilidad). Diferencias estadísticamente significativas respecto al FBS (†) o respecto al s-PRGF (#). (Test de Dunn-Bonferroni: † $p \leq 0.05$; †† $p \leq 0.01$; ††† $p \leq 0.001$; n/s, no significativo)

Así pues, el bioadhesivo no aportó mayor capacidad proliferativa ni mayor viabilidad a las células RPCE en ninguna de sus formas (en solitario o combinado con s-PRGF).

Resultados

Tabla 2. Porcentajes de viabilidad de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo (RPCE) expuestos a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como control) a 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como el promedio del porcentaje \pm la desviación estándar de la viabilidad para cada tratamiento tomando como 100% la viabilidad de los cultivos tratados con FBS.

Tratamiento	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
1% BSA	76.22^{††} \pm 18.34	88.49[†] \pm 23.40	102.66 \pm 18.78
45% s-PRGF	86.42 \pm 23.49	86.12[†] \pm 18.86	99.19 \pm 17.72
45% s-PRGF+ HaNa	57.72^{†††##} \pm 25.78	77.25^{††} \pm 18.01	87.9 \pm 15.63
0,1% HaNa	64.27^{†††#} \pm 21.28	79.98^{††} \pm 28.18	85.88 \pm 22.49

Diferencias estadísticamente significativas respecto al FBS ([†]) o respecto al s-PRGF ([#]). (Test de Dunn-Bonferroni: [†]p \leq 0,05; ^{††}p \leq 0,01; ^{†††}p \leq 0,001; n/s, no significativo).

1.2. Proliferación de células de epitelio corneal humano HCE

De manera similar a como se realizó con los cultivos RPCE, se determinó la viabilidad celular mediante el método MTT tras 0, 24, 48 y 72 horas de cultivo de las células HCE en presencia de 45% s-PRGF, 45% s-PRGF + 0,1% HaNa (combinado), 0,1% HaNa, 10% FBS y 1% BSA como tratamiento control.

Los resultados mostraron un patrón de proliferación tiempo-dependiente con todos los tratamientos estudiados excepto con 1% BSA, si bien, el tratamiento s-PRGF tanto solo como combinado con bioadhesivo mostró una pequeña disminución de la proliferación celular en las primeras 24 horas, que no fue estadísticamente significativa (Fig 3 y tabla 3). Todos los tratamientos, y especialmente el 10% FBS, ofrecieron una tasa de proliferación significativamente superior al tratamiento control. Asimismo, observamos una tendencia a mayor proliferación cuando las células se cultivaron con el bioadhesivo (HaNa) respecto a aquellas cultivadas con s-PRGF o con la combinación de ambos. De hecho, en las primeras 48 h no hubo diferencias significativas en la tasa de proliferación entre los tratamientos con FBS y HaNa.

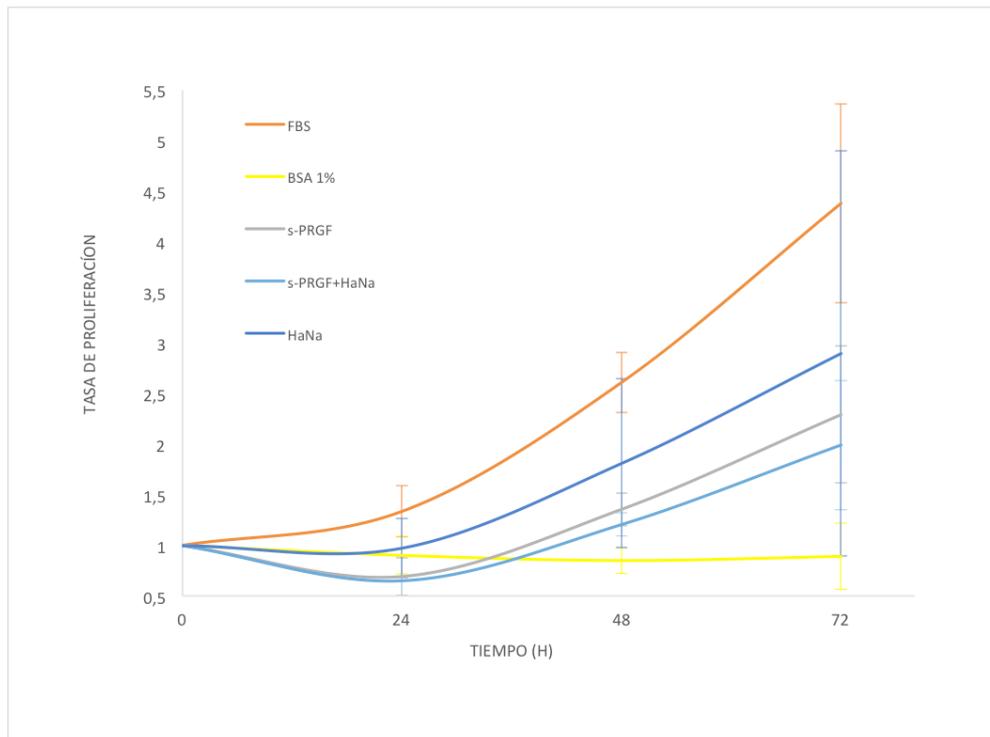


Fig 3. Efecto del tratamiento conjunto de s-PRGF con HaNa sobre el patrón de proliferación de células de epitelio corneal humano (HCE). Los cultivos fueron expuestos durante 24, 48 y 72 horas a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como el ratio de proliferación \pm la desviación estándar, con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

Tabla 3. Ratio de proliferación de los cultivos de células de epitelio corneal humano (HCE) expuestos a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como control) a 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como el promedio del ratio de proliferación \pm la desviación estándar. El cálculo del ratio se realiza con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

Tratamiento	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
1% BSA	0.9[†] \pm 0,19	0.85^{†††} \pm 0.13	0.89^{†††} \pm 0.32
10% FBS	1.33 \pm 0.25	2.61 \pm 0.3	4.38 \pm 0.98
45% s-PRGF	0.69^{†††} \pm 0.19	1.36^{†**} \pm 0.16	2.29^{†*} \pm 0.68
45% s-PRGF+ HaNa	0,65^{†††\$} \pm 0.24	1.21^{††} \pm 0.11	1.99^{††} \pm 0.64
0,1% HaNa	0.97 \pm 0.29	1.81^{**} \pm 0.84	2.89^{†*} \pm 2.0

Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (*), al FBS ([†]) o respecto al HaNa (^{\$}). (Test de Dunn-Bonferroni: *p \leq 0.05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; n/s, no significativo).

Resultados

La viabilidad de las células HCE al ser expuestas a los distintos tratamientos, en comparación con el 10% FBS, se muestra inferior al mismo en la mayoría de los casos, sobre todo en tiempos avanzados (48-72 horas). Sin embargo, no existen diferencias significativas respecto al tratamiento con HaNa en las primeras 48h. Por otra parte, además del FBS, sólo los tratamientos en solitario (s-PRGF o HaNa), y no el combinado, muestran diferencias significativas (s-PRGF) o muy significativas (HaNa) con el tratamiento control a las 48 y 72h (Fig 4 y Tabla 4).

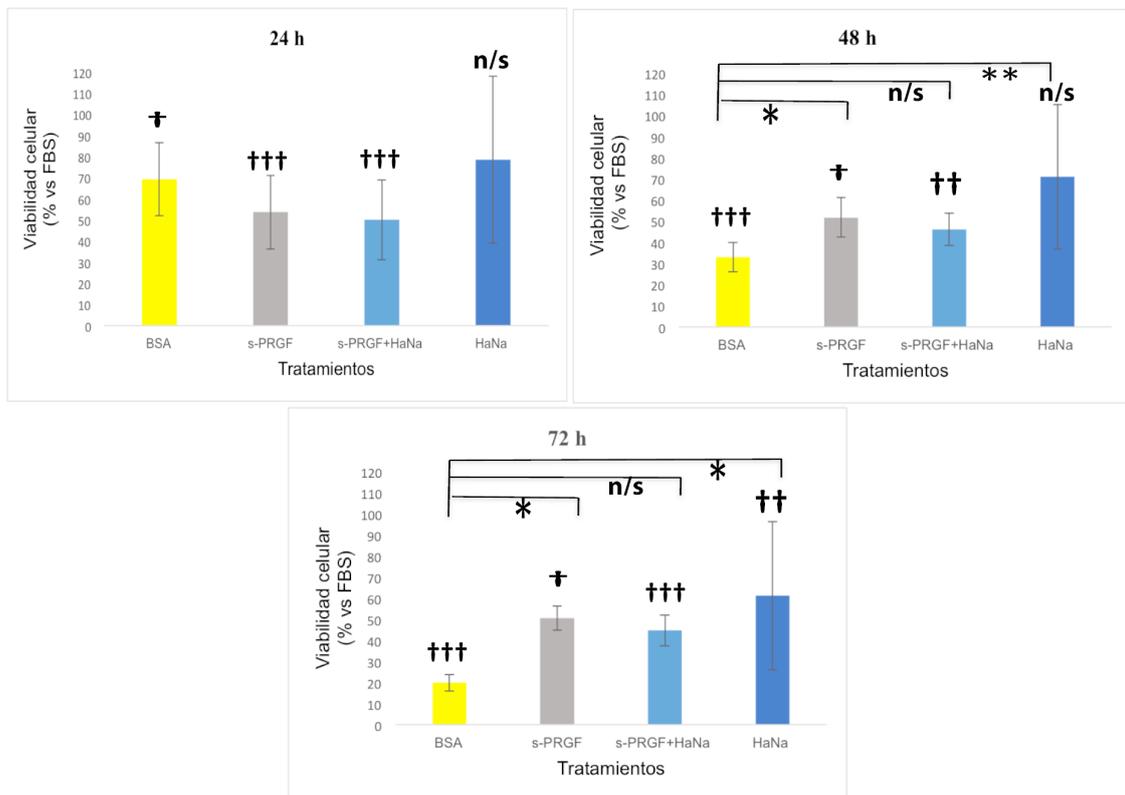


Fig 4. Viabilidad de los cultivos primarios de epitelio corneal de conejo HCE expuestos durante 24, 48 y 72 horas a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de la viabilidad celular respecto al cultivo tratado con FBS (100% de viabilidad). Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (*) o respecto al FBS (†). (Test de Dunn-Bonferroni: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; n/s, no significativo).

Tabla 4. Porcentajes de viabilidad de los cultivos de células de epitelio corneal humano (HCE) expuestos a s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como control) a 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresan como el promedio del porcentaje \pm la desviación estándar de la viabilidad para cada tratamiento tomando como 100% la viabilidad de los cultivos tratados con FBS.

Tratamiento	Tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
1% BSA	69.17[†] \pm 17.2	33.02^{†††} \pm 6.87	19.95^{†††} \pm 3.95
45% s-PRGF	53.55^{†††} \pm 17.32	51.81^{†*} \pm 9.28	50.66^{†*} \pm 5.81
45% s-PRGF+ HaNa	50.04^{†††} \pm 18.9	46.1^{††} \pm 7.56	44.79^{†††} \pm 7.35
0,1% HaNa	78.43 \pm 39.45	70.98^{**} \pm 34.25	61.27^{††*} \pm 35.23

Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (*) o al FBS ([†]). (Test de Dunn-Bonferroni: *p \leq 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001; n/s, no significativo).

Así pues, en tiempos cortos (hasta 48 h), el HaNa en solitario estimula la proliferación de la línea establecida de epitelio corneal HCE de forma similar a como lo hace el FBS.

1.3. Reepitelización de células epiteliales RPCE (Wound Healing Assay): Migración

Realizamos ensayos de cierre epitelial mediante el “método de la herida” (*scratch wound-healing assay*) en cultivos de células RPCE para determinar la capacidad del bioadhesivo de promover la migración *in vitro* y la reepitelización. Tras crear una herida circular en monocapas de cultivo celular de RPCE, dichos defectos epiteliales fueron tratados con 45% s-PRGF, 45% s-PRGF + 0,1% HaNa (combinado), 0,1% HaNa, 10% FBS y 1% BSA (como control). Se observaron y fotografiaron los cultivos a lo largo del tiempo con la intención de valorar la capacidad de cada tratamiento para promover el cierre de la erosión.

Cuando evaluamos la evolución de cierre de las erosiones epiteliales (promedio de mm² de superficie reepitelizada), no encontramos diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos utilizados y a ninguno de los tiempos estudiados (Fig. 5 y Tabla 5).

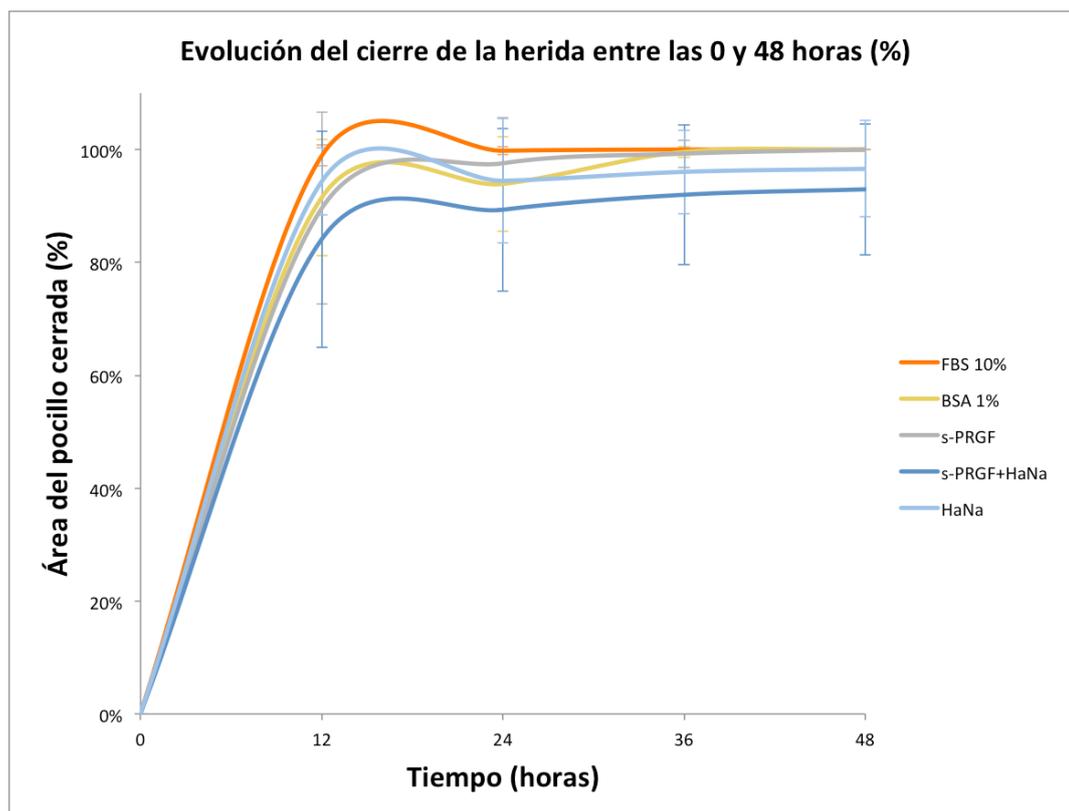


Fig. 5 . Progresión del recubrimiento de la monocapa de células RPCE incubadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de área recubierta respecto al defecto inicial (0%) \pm la desviación estándar. (Análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 5 . Progresión del recubrimiento de la monocapa de células RPCE incubadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de área recubierta respecto al defecto inicial (0%) \pm la desviación estándar.

Tratamiento	Tiempo			
	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
1% BSA	91.5 \pm 10.3	93.9 \pm 8.4	99.6 \pm 0.9	Cerrado
10% FBS	98.9 \pm 1.8	99.8 \pm 0.7	Cerrado	Cerrado
45% s-PRGF	89.6 \pm 17.02	97.6 \pm 8.1	99.27 \pm 2.4	Cerrado
45% s-PRGF+ HaNa	84.1 \pm 19.2	89.3 \pm 14.4	92 \pm 12.4	92.9 \pm 11.6
0,1% NaHa	94.4 \pm 5.9	94.5 \pm 11.0	96.1 \pm 7.4	96.6 \pm 8.6

Análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis. No hay diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos en ninguno de los puntos temporales de corte..

Sin embargo, al estudiar el número de defectos epiteliales completamente cerrados (número de pocillos en los que la monocapa celular se ha reepitelizado totalmente), encontramos diferencias evidentes en los cultivos tratados con HaNa (solo o combinado) respecto al resto, observándose un número menor y estadísticamente significativo a partir de las 48h de pocillos cerrados en los cultivos correspondientes al tratamiento combinado (Fig. 6 y Tabla 6).

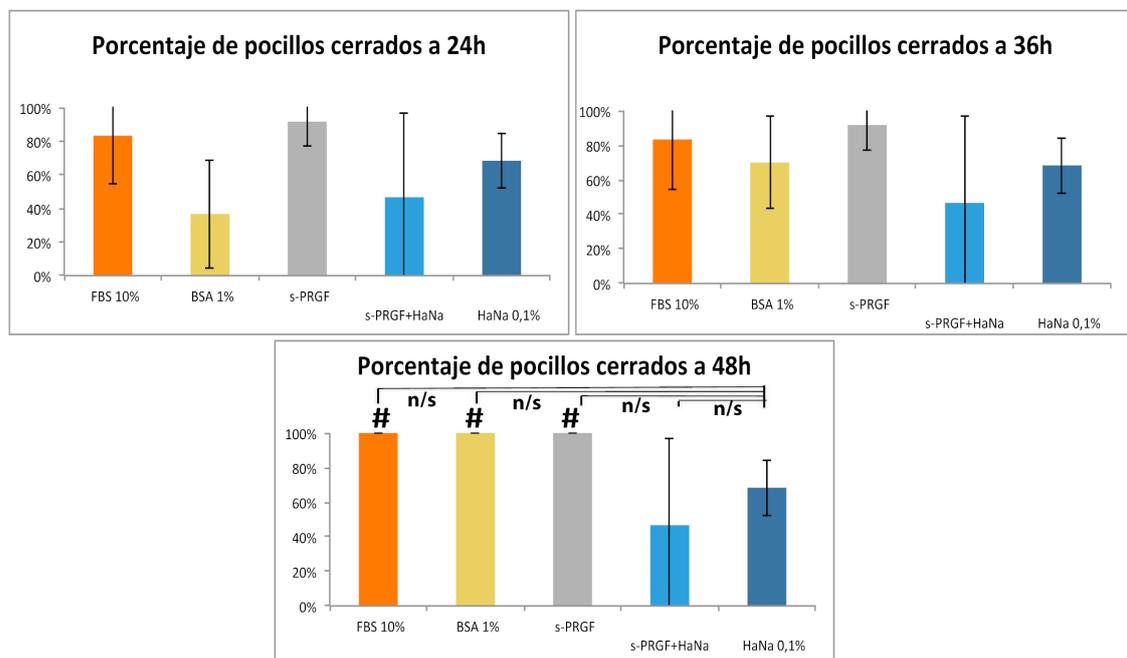


Fig. 6. Porcentaje de pocillos con células RPCE en los que el defecto en la monocapa celular fue completamente resuelto tras el tratamiento durante 24, 36 y 48h con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento combinado (s-PRGF + HaNa) (#). (Prueba Chi cuadrado y prueba exacta de Fischer: # $p \leq 0.05$; n/s, no significativo).

Por lo tanto, en los cultivos primarios de epitelio corneal el HaNa no favorece la reepitelización, e incluso obstaculiza el efecto reepitelizante del hemoderivado s-PRGF.

Resultados

Tabla 6. Porcentaje de pocillos con células RPCE en los que el defecto en la monocapa celular fue completamente resuelto tras el tratamiento durante 12 a 60h con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de pocillos cerrados respecto al porcentaje inicial (0%) \pm la desviación estándar.

Tratamiento	Tiempo					
	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas	72 horas
1% BSA	13.3 \pm 23.1	36.7 \pm 32.2	70 \pm 26.5	100 [#]	100 [#]	100
10% FBS	59.9 \pm 8.4	83.3 \pm 28.9	83.3 \pm 28.9	100 [#]	100 [#]	100
45% s-PRGF	60 \pm 52.9	91.7 \pm 14.4	91.7 \pm 14.4	100 [#]	100 [#]	100
45% s-PRGF+ HaNa	30 \pm 26.5	46.7 \pm 50.3	46.7 \pm 50.3	46.7 \pm 50.3	46.7 \pm 50.3	46.7 \pm 50.3
0,1% NaHa	13.3 \pm 23.1	68.3 \pm 16.1	68.3 \pm 16.1	68.3 \pm 16.1	68.3 \pm 16.1	93.3 \pm 11.6

Diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento combinado s-PRGF + HaNa ([#]). (Prueba Chi cuadrado y prueba exacta de Fischer: [#]p \leq 0.05).

1.4 Reepitelización de células de epitelio corneal HCE (Wound Healing Assay): Migración

De forma similar a como se realizó con los cultivos RPCE, se determinó en células HCE la capacidad del bioadhesivo de favorecer la migración *in vitro* y la reepitelización. Para ello, utilizamos el “método de la herida” (*scratch wound-healing*) en cultivos de células HCE tratados con 45% s-PRGF, 45% s-PRGF + 0,1% HaNa (combinado), 0,1% HaNa, 10% FBS y 1% BSA (como control).

Cuando evaluamos la evolución de cierre de las erosiones epiteliales (promedio de mm² de superficie reepitelizada), observamos que, ya desde las 12 h de tratamiento, el s-PRGF en solitario o combinado, además del FBS, aceleran la recuperación de la monocapa de células HCE respecto al control (BSA) y al HaNa en solitario. Las diferencias entre ambos grupos fueron estadísticamente significativas en todos los tiempos estudiados (Fig. 7 y Tabla 7). No hubo diferencias estadísticamente

significativas entre el s-PRGF (solo o combinado) y el FBS, y tampoco entre el control y el HaNa en ninguno de los tiempos estudiados.

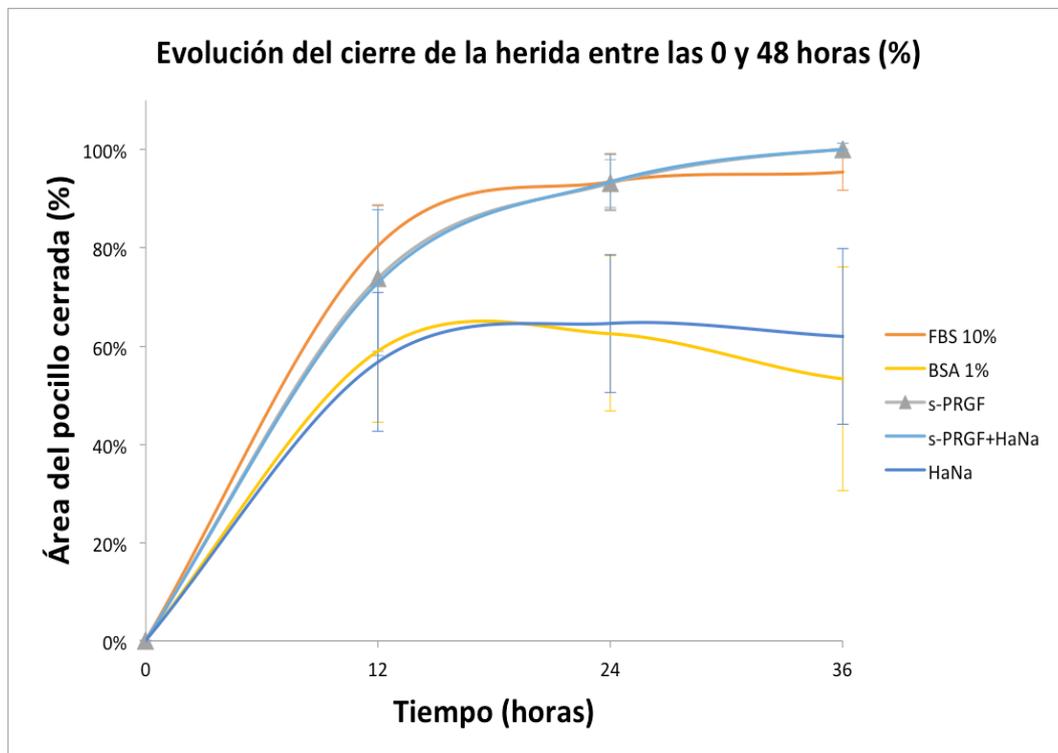


Fig. 7 . Progresión del recubrimiento de la monocapa de células HCE incubadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de área recubierta respecto al defecto inicial (0%) \pm la desviación estándar. (Análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis).

Tabla 7 . Progresión del recubrimiento de la monocapa de células HCE incubadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de área recubierta respecto al defecto inicial (0%) \pm la desviación estándar.

Tratamiento	Tiempo			
	12 horas	24 horas	36 horas	48 horas
1% BSA	59.5 \pm 14.5	63.7 \pm 15.8	54.0 \pm 22.7	49.1 \pm 17.1
10% FBS	79.8 ^{****} \pm 8.2	95.0 ^{****} \pm 5.8	98.6 ^{****} \pm 3.7	100 ^{****}
45% s-PRGF	74.3 ^{***} \pm 14.9	97.47 ^{****} \pm 4.9	100 ^{****}	100 ^{****}
45% s-PRGF+ HaNa	73.6 ^{**} \pm 14.9	97.0 ^{****} \pm 5.6	99.6 ^{****} \pm 1.36	100 ^{****}
0,1% NaHa	56.3 \pm 14.1	63.9 \pm 14.1	61.3 \pm 17.9	58.6 \pm 14.5

Diferencias estadísticamente significativas respecto al BSA (*) o respecto al HaNa ([†]). (Prueba de Kruskal-Wallis: *p \leq 0.05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001).

Resultados

En cuanto al número de defectos epiteliales completamente cerrados (número de pocillos en los que la monocapa celular se ha reepitelizado totalmente), nuevamente el s-PRGF solo o combinado, así como el FBS, muestran diferencias altamente significativas respecto al control y el HaNa. A las 36h de tratamiento casi el 100% de los pocillos incubados con s-PRGF, el tratamiento combinado o FBS han cerrado, mientras que sólo entre el 50-60% de los pocillos lo han hecho con los otros dos tratamientos. Finalizado el experimento a las 60h de seguimiento, ninguno de estos dos tratamientos logra cerrar todos los pocillos (Fig. 8 y Tabla 8).

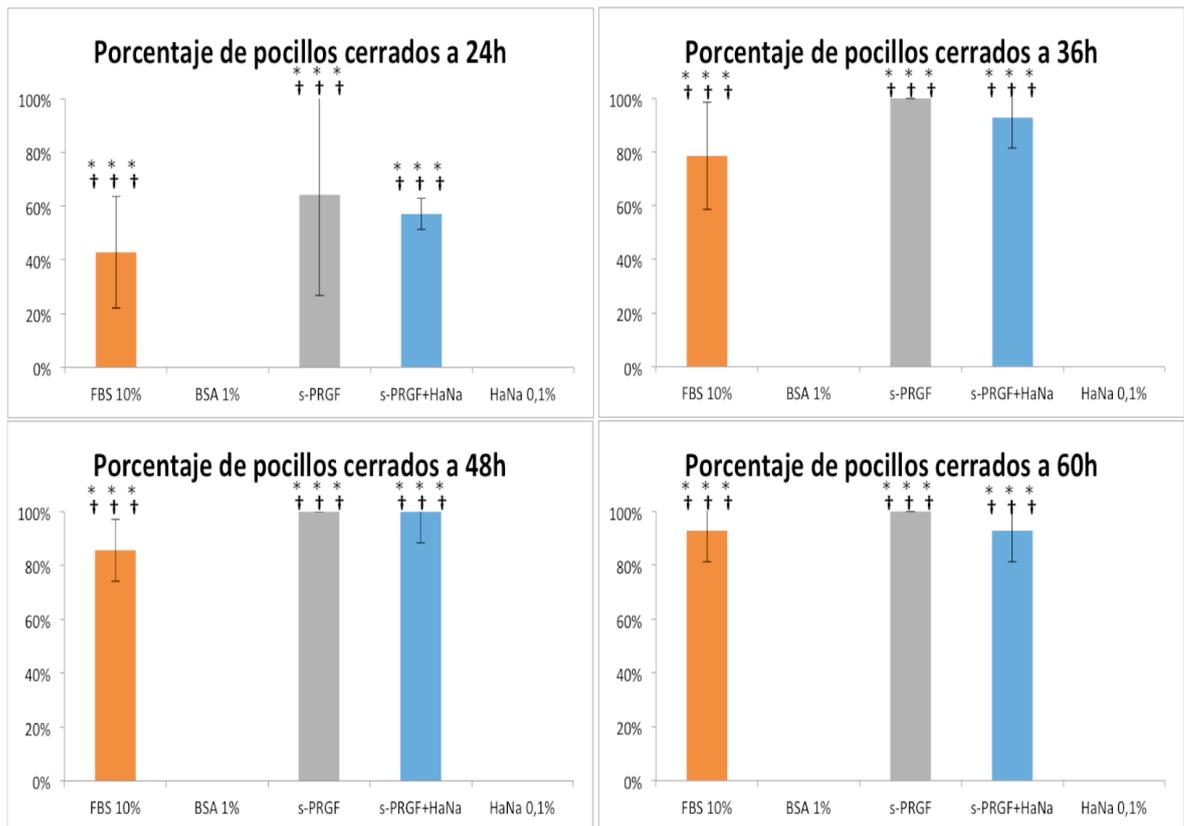


Fig. 8. Porcentaje de pocillos con células HCE en los que el defecto en la monocapa celular fue completamente resuelto tras el tratamiento durante 24, 36 y 48h con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Diferencias estadísticamente significativas respecto a la BSA (*) y al HaNa (†). (Prueba Chi cuadrado y prueba exacta de Fischer: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Tabla 8. Porcentaje de pocillos con células RPCE en los que el defecto en la monocapa celular fue completamente resuelto tras el tratamiento durante 12 a 60h con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa, 10% FBS o 1% BSA (como tratamiento control). Los resultados se expresan como porcentaje promedio de pocillos cerrados respecto al porcentaje inicial (0%) \pm la desviación estándar.

Tratamiento	Tiempo			
	24 horas	36 horas	48 horas	60 horas
1% BSA	0	0	0	0
10% FBS	43.3^{*****} \pm 20.8	80^{*****} \pm 20	86.7^{*****} \pm 11.5	93.3^{*****} \pm 11.5
45% s-PRGF	61.7^{*****} \pm 37.5	100^{*****}	100^{*****}	100^{*****}
45% s-PRGF+ HaNa	56.7^{*****} \pm 5.7	93.3^{*****} \pm 11.5	93.3^{*****} \pm 11.5	93.3^{*****} \pm 11.5
0,1% NaHa	0	0	0	0

Diferencias estadísticamente significativas respecto a la BSA (*) y al HaNa ([†]). (Prueba Chi cuadrado y prueba exacta de Fischer: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Por lo tanto, en células de la línea establecida de epitelio corneal HCE el s-PRGF promueve la reepitelización celular de forma similar al FBS. Para esta línea celular, el HaNa no consigue favorecer la migración celular, pero tampoco impide que el s-PRGF lo haga cuando se utilizan conjuntamente.

Cabe recordar que las células HCE se trataron previamente con mitomicina C para inhibir la proliferación celular, ya que son experimentos de tiempos superiores a 24 h. Así, hemos neutralizado la ventaja proliferativa que el FBS había mostrado en las HCE frente al resto de tratamientos. En estas circunstancias, observamos que aunque el FBS es superior al resto de tratamientos en favorecer la proliferación celular, no lo es respecto al s-PRGF (solo o combinado) en su capacidad de promover la migración celular.

De los experimentos de proliferación y migración celular con las células HCE podemos deducir que el s-PRGF favorece la migración de las células de epitelio corneal, mientras que el HaNa estimula la proliferación de las mismas.

2. Ensayos *in vivo*

2.1. Reepitelización *in vivo* en el modelo animal de conejo

Con el fin de confirmar *in vivo* los resultados obtenidos *in vitro*, se realizaron ensayos de reepitelización en un modelo animal de conejo. Para ello, se indujo quirúrgicamente un defecto epitelial en córneas de conejo (n=33), que se trataron dos veces al día con uno de los siguientes tratamientos: 90% s-PRGF en PBS, 90% s-PRGF + 0,2 % HaNa en PBS (tratamiento combinado), 0,2% HaNa en PBS, o PBS como tratamiento control. No se observó ningún evento adverso, tales como inflamación o neovascularización de la córnea en ninguno de los ojos de los conejos de estudio, ya sea durante el proceso de reepitelización o tras la completa regeneración de las heridas corneales (Figura 9). Además, todos los animales se mostraron sanos y ganaron peso progresivamente.

Al analizar la progresión de cierre de la herida, se observó que en la fase inicial (1 día tras la cirugía) todos los tratamientos provocaron una respuesta similar, hallándose en todos los casos un área muy similar pendiente de reepitelizar. Sin embargo a partir del segundo día, el proceso de cicatrización de las heridas corneales se acelera en los ojos tratados con s-PRGF en comparación con el resto de tratamientos, los cuáles produjeron una evolución de reepitelización muy similar entre sí y menor a la del s-PRGF (Figura 9 , Tabla 9). Así, los tamaños de herida corneal más pequeños en todos los tiempos analizados se dieron en el grupo de tratamiento del s-PRGF (Tabla 9). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la evolución del cierre epitelial entre ninguno de los tratamientos.

En concreto, el tiempo medio para completar el cierre del defecto epitelial en los ojos tratados con s-PRGF fue de $3,11 \pm 0,22$ días, mientras que en los otros dos tratamientos (HaNa y combinación s-PRGF+HaNa) y el control el tiempo medio de cierre fue mayor, $3,31 \pm 0,37$, $3,31 \pm 0,37$ y $3,31 \pm 0,37$ días, respectivamente, no siendo significativo.

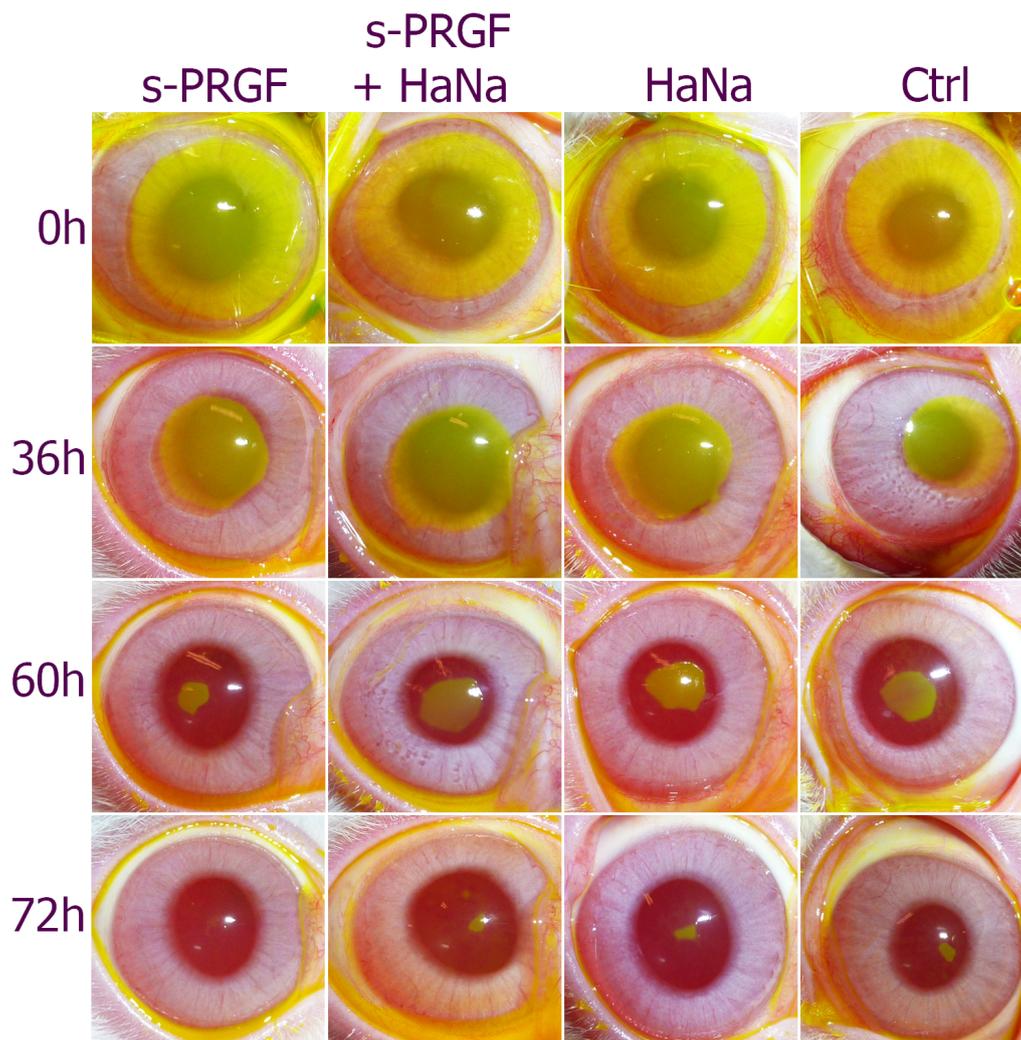


Fig. 9. Evolución del defecto epitelial, monitorizado con tinción de fluoresceína, en los ojos de conejo tratados con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control.

Si nos centramos en el número de defectos corneales cerrados en un tiempo concreto para los determinados tratamientos, observamos que, a día 3 tras la cirugía, el 78% de los defectos epiteliales habían cerrado en los ojos tratados con s-PRGF, mientras que sólo el 50% lo había hecho para el resto de tratamientos. A día 3,5 tras la cirugía, momento en que todos los defectos epiteliales habían cerrado en los ojos tratados con s-PRGF, sólo el 88% lo habían hecho para el resto de tratamientos. No obstante, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos en el número de eventos cerrados (Prueba Chi cuadrado y prueba exacta de Fisher).

Resultados

Tabla 9. Experimento *in vivo* mostrando la progresión del cierre epitelial en conejos tratados con s-PRGF, ácido hialurónico (Bioadhesivo), combinación de s-PRGF y Bioadhesivo o lágrimas artificiales como control. Los resultados se expresan en media de herida corneal abierta \pm desviación standard en mm².

Tratamiento	TIEMPO (días)						
	Día 0	Día 1	Día 1,5	Día 2	Día 2,5	Día 3	Día 3,5
Control	72,32 \pm 7,32	47,02 \pm 4,84	33,28 \pm 3,06	12,93 \pm 3,36	6,12 \pm 3,24	0,53 \pm 0,99	0,06 \pm 0,16
PRGF	71,91 \pm 4,39	46,19 \pm 4,06	30,22 \pm 4,09	10,00 \pm 3,15	3,65 \pm 2,79	0,05 \pm 0,10	0
BIOADH	72,48 \pm 5,13	45,32 \pm 4,20	36,72 \pm 7,74	12,46 \pm 5,17	5,98 \pm 3,69	0,65 \pm 1,23	0,10 \pm 0,27
PRGF+ BIOADH	72,57 \pm 2,77	48,06 \pm 8,97	37,44 \pm 7,63	13,59 \pm 5,26	6,14 \pm 3,71	0,46 \pm 0,76	0,02 \pm 0,06

No hay diferencias estadísticamente significativas entre ningún tratamineto ($p \leq 0.05$). (Test Kruskal Wallis)

2.2. Análisis histológico

2.2.1. Hematoxilina-eosina

Una vez terminado el experimento *in vivo* obtuvimos las córneas de conejo y las procesamos para su estudio histológico. Parte de las córneas se incluyeron en parafina y, posteriormente, obtuvimos cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina.

Las imágenes muestran un epitelio de aspecto normal y estructura correcta tanto a 7 como a 30 días e independientemente del tratamiento utilizado para la cicatrización corneal (Figura 10). Si bien, se observa que el epitelio en las imágenes B y D, que corresponden a los tratamientos con s-PRGF solo o combinado, tanto a 7 como a 30 días, es algo más grueso que en las imágenes A y C. Por otra parte, el epitelio correspondiente al tratamiento con HaNa a 7d tras la cirugía (C) muestra una capa basal del epitelio corneal con falta de compactación con las capas suprabasales, sugiriendo que podría haber deficiencias en la adhesión entre las capas epiteliales o incluso entre el epitelio y estroma subcorneal.

En todas las imágenes, la población celular en el área del estroma más próxima al epitelio (tercio anterior) es mucho menor a 7 días que a 30 días. Esta variación en la población celular se ve influenciada por el tratamiento al que han sido sometidos los tejidos. Así, a 7 días es el tratamiento combinado (D) el único que muestra células en todo el estroma corneal, mientras que a 30 días las corneas expuestas a HaNa (solo o combinado) son las que presentan una densidad celular mayor en el tercio anterior del estroma corneal (C y D).

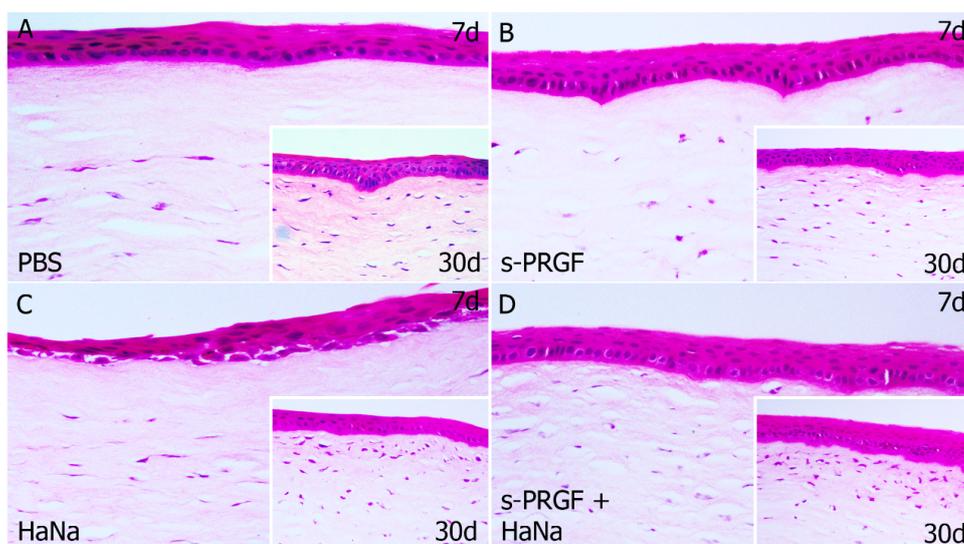


Figura 10 . Tinción con hematoxilina-eosina de secciones transversales de córnea de conejo a los 7 y 30 días después de la inducción de la herida. (A) Tratamiento con PBS. (B) Tratamiento con s-PRGF. (C) Tratamiento con HaNa. (D) Tratamiento combinado con s-PRGF + HaNa. Imágenes tomadas con objetivo 20x

2.2.2. Análisis inmunohistoquímicos (cortes en OCT)

Quisimos analizar los mecanismos a través de los cuáles actuaban los tratamientos utilizados para la reepitelización corneal. Para ello, realizamos técnicas inmunohistoquímicas con marcaje fluorescente para identificar distintas moléculas implicadas en procesos corneales fisiológicos así como patológicos. Concretamente, estudiamos la diferenciación, proliferación, adhesión y efecto barrera de las células del epitelio corneal, así como la fibrosis del estroma corneal.

Para ello, hicimos cortes histológicos de corneas incluidas en OCT y procesadas a 7 y a 30 días tras la cirugía. Todas las corneas fueron tratadas durante los 7 días siguientes a la cirugía, por lo que las corneas procesadas a 30 días, recibieron un tratamiento de 7 días y estuvieron otras tres semanas sin tratamiento hasta su obtención. Además, incluimos en el estudio inmunohistoquímico dos controles: una córnea sana de conejo, que fue procesada en las mismas condiciones que las corneas de estudio, pero a la que no se le practicó la desepitelización mecánica (control SANO); y una córnea de conejo sometida a la desepitelización mecánica, pero procesada tan sólo 48 horas tras dicha cirugía (control Wound healing o W-H).

2.2.2.1. Análisis de los marcadores CK3 y CK 15

En primer lugar, realizamos un doble inmunomarcaje para detectar la citoqueratina 3/76 (CK3), marcador de epitelio corneal diferenciado, junto con la citoqueratina 15 (CK15), supuesto marcador de células madre epiteliales. Lo estudiamos tanto en la córnea central, zona de la córnea en la que habíamos producido la desepitelización mecánica, como en la región del limbo esclerocorneal, en la que se localizan las células madre del limbo. Estas células son las encargadas de la renovación fisiológica del epitelio corneal. Además, se activan cuando se produce un daño epitelial.

Las imágenes mostraron que en todos los casos, excepto en el control W-H, se produce marcaje exclusivamente con K3 en la zona del epitelio corneal (Figura 11).

Como corresponde a la región central de la córnea, la K15 está ausente en la zona del epitelio corneal regenerado. En el control W-H, la línea de puntos indica el límite entre el epitelio y el estroma. En este caso, la ausencia de marcaje K3 positivo corresponde a la ausencia de epitelio, ya que la herida corneal no ha cerrado completamente.

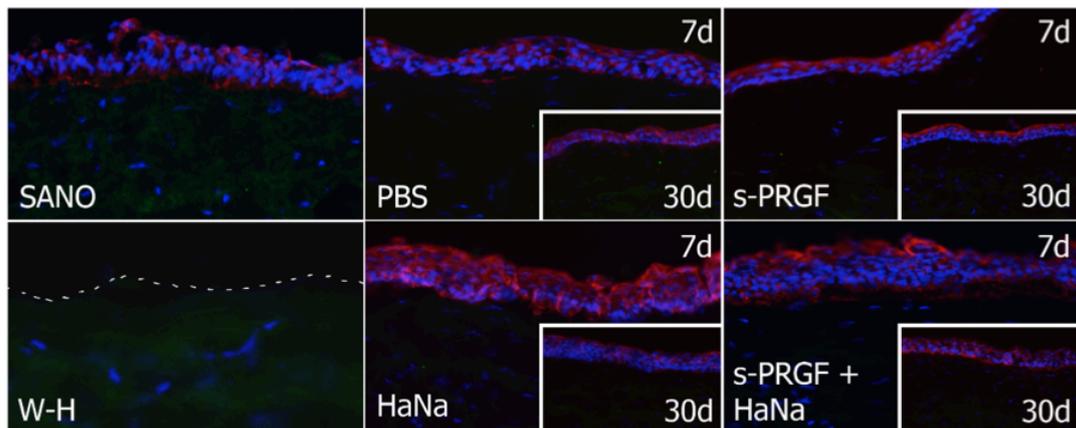


Figura 11. Inmunomarcaje fluorescente para las citoqueratinas CK3 (rojo) y CK15 (verde) en el área de la córnea central. Las córneas de conejo fueron tratadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control, y se procesaron 7 y 30 días tras la cirugía corneal. La imagen SANO corresponde a una córnea de conejo no sometida a cirugía. La imagen W-H corresponde a una córnea de conejo sometida a cirugía y procesada tan sólo 48 horas tras la cirugía. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

En la región de transición entre la córnea periférica y el limbo esclero-corneal, la imagen correspondiente al control sano muestra el marcaje transicional habitual de las citoqueratinas corneales, observándose un marcaje CK15 positivo (verde) relegado a las capas basal y suprabasales del epitelio del limbo corneal, y un marcaje CK3 positivo (rojo) en todo el grosor de la córnea periférica y únicamente en capas superficiales de la zona limbar.

Este marcaje se observa de igual manera en las córneas sometidas a los distintos tratamientos, no siendo evidentes diferencias entre los mismos. También se observa en el control W-H, en el que el marcaje de la CK15 es especialmente intenso (Fig.12).

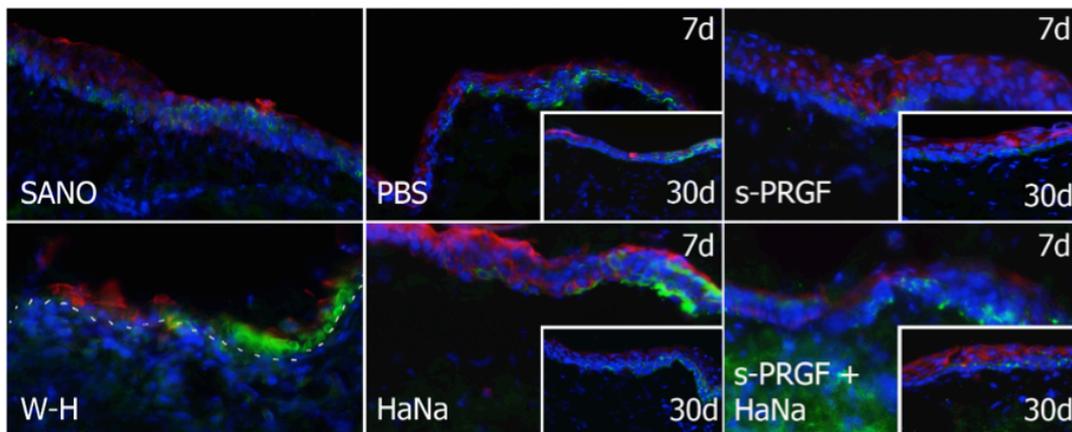


Figura 12. Inmunomarcaje fluorescente para las citoqueratinas CK3 (rojo) y CK15 (verde) en el área del limbo esclero-corneal. Las córneas de conejo fueron tratadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control, y se procesaron 7 y 30 días tras la cirugía corneal. La imagen SANO corresponde a una córnea de conejo no sometida a cirugía. La imagen W-H corresponde a una córnea de conejo sometida a cirugía y procesada tan sólo 48 horas tras la cirugía. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

2.2.2.2. Análisis del marcador Ki-67

Estudiamos también el marcador de proliferación celular Ki-67. En las imágenes observamos que aparece un mayor número de células marcadas a los 7 días que a los 30 días (Fig. 13). Además, a los 7 días se observa que el marcaje no está únicamente confinado al epitelio corneal, sino que también aparece en el tercio anterior del estroma.

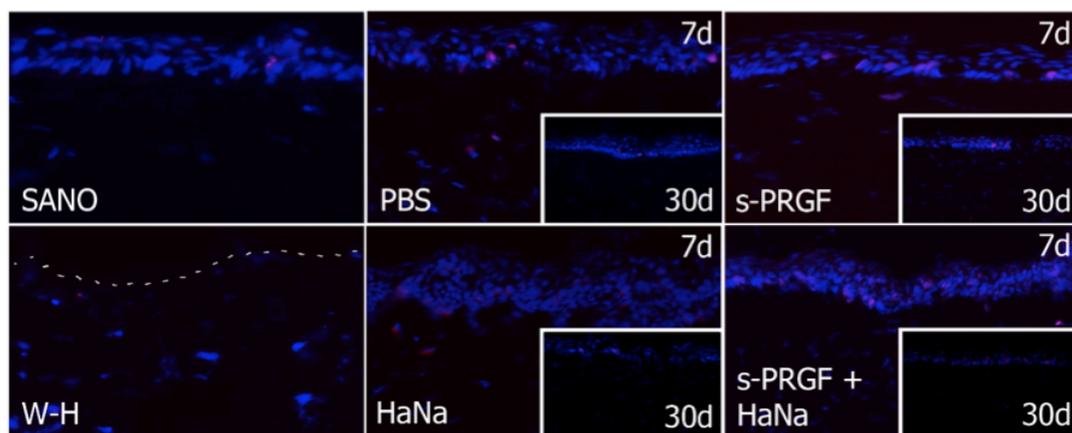


Figura 13. Inmunomarcaje fluorescente para Ki67 en el área de la córnea central. Las córneas de conejo fueron tratadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control, y se procesaron 7 y 30 días tras la cirugía corneal. La imagen SANO corresponde a una córnea de conejo no sometida a cirugía. La imagen W-H corresponde a una córnea de conejo sometida a cirugía y procesada tan sólo 48 horas tras la cirugía. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

Se realizó un recuento de las células marcadas tanto en el epitelio como en el estroma anterior de las corneas sometidas a los distintos tratamientos. Para ello, se obtuvieron imágenes panorámicas de los tejidos procesados mediante la unión de fotos solapantes que abarcaban toda la zona de la herida en la córnea central (Fig.14).

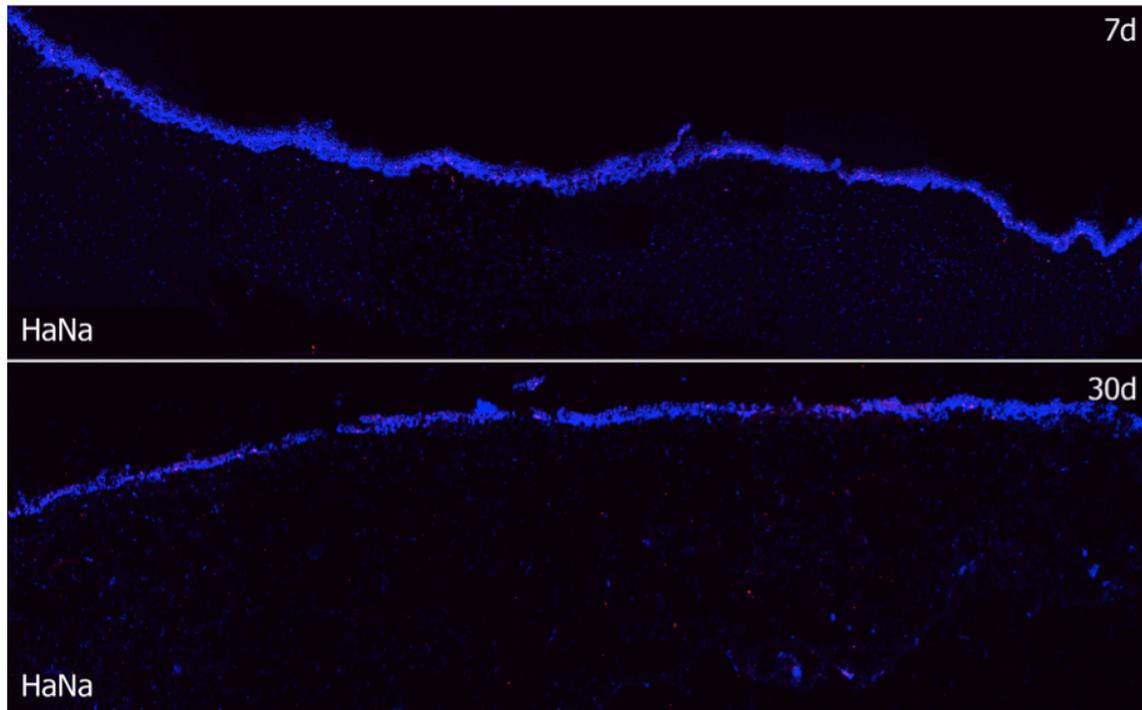


Figura 14. Inmunomarcaje fluorescente para Ki67 en el área de la córnea central. Montaje fotográfico que abarca toda la zona de la herida en la córnea central. Las corneas de conejo fueron tratadas con HaNa y procesadas a los 7 y 30 días tras la cirugía corneal. Imágenes tomadas a 100 aumentos.

El recuento demuestra que hay un mayor número de células marcadas con Ki-67 a los 7 días que a los 30 días (Tabla 10). Además, también se puede observar que a ese tiempo hay un mayor número de células proliferativas en los casos en los que se utiliza HaNa en solitario, tanto en el epitelio como en el estroma anterior.

Este resultado es coherente con los resultados de proliferación celular realizados en las células de epitelio corneal HCE mediante el ensayo MTT, en el que se mostraba que el HaNa estimula en tiempos cortos la proliferación celular en igual medida que el FBS y de forma superior al resto de tratamientos.

A los 30 días tras la cirugía, la proliferación celular queda prácticamente relegada al epitelio corneal.

Tabla 10. Número de células marcadas con Ki-67 en el epitelio y el estroma corneal en imágenes panorámicas de cortes transversales de córneas de conejo.

Tiempo post cirugía	Tratamiento			
	PBS	s-PRGF	PBS + HaNa	s-PRGF + HaNa
7 días	167	53	306	91
Epitelio	153	43	274	82
Estroma	14	10	32	9
30 días	98	33	20	30
Epitelio	94	31	17	28
Estroma	4	2	3	2

2.2.2.3. Análisis del marcador Integrina β 4

La integrina β 4 (Int β 4) es una proteína transmembrana que se localiza en la membrana plasmática de distintos tipos celulares en forma de heterodímeros $\alpha\beta$. La Int β 4 forma heterodímeros únicamente con la Integrina α 6, y se une a proteínas de adhesión de la matriz extracelular como la laminina 5, formando estructuras de unión tipo hemidesmosomas entre el epitelio y el tejido conectivo subyacente. Analizamos la presencia de esta molécula para estudiar la propiedad de adhesión del epitelio regenerado al estroma corneal.

En las imágenes se puede observar que ya a los 7 días hay diferencias en el marcaje para la Int β 4 entre los distintos tratamientos, siendo aquellos tratados con s-PRGF, solo o combinado, los que dan un marcaje más intenso y continuo (Figura 15). A los 30 días se puede apreciar un marcaje lineal entre el epitelio y el estroma en todos los casos.

En el control W-H, a pesar de que se puede observar una fina capa de células aplanadas (azul) que corresponde a la primera capa del epitelio corneal regenerado, no se aprecia positividad para la Int β 4.

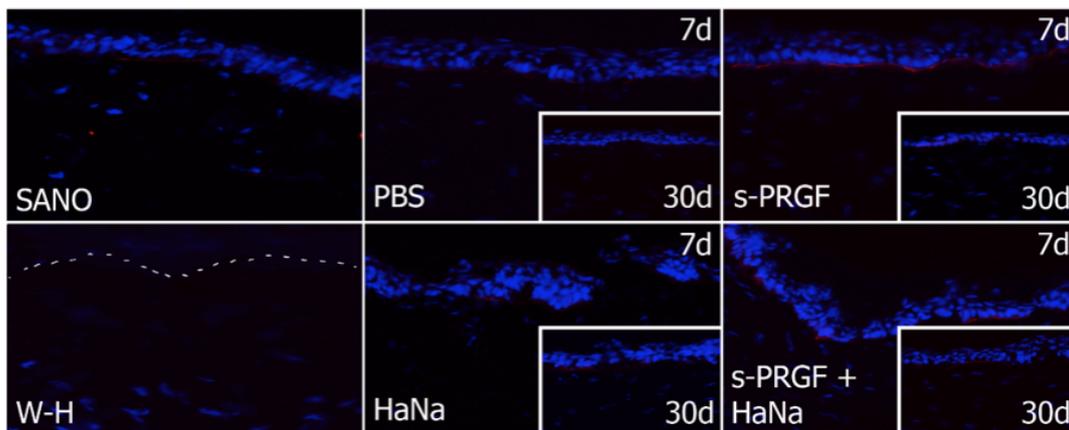


Figura 15 . Inmunomarcaje fluorescente para Int β 4 en el área de la córnea central. Las córneas de conejo fueron tratadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control, y se procesaron 7 y 30 días tras la cirugía corneal. La imagen SANO corresponde a una córnea de conejo no sometida a cirugía. La imagen W-H corresponde a una córnea de conejo sometida a cirugía y procesada tan sólo 48 horas tras la cirugía. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

2.2.2.4. Análisis del marcador ZO-1

Al analizar el marcador de uniones estrechas o *tight junctions* ZO-1, indicativo de la existencia de células epiteliales diferenciadas superficiales, así como del establecimiento del efecto de barrera corneal, observamos un marcaje mucho más intenso en los epitelios analizados a 30 días tras la cirugía que en aquellos de 7 días (Figura 16). Sin embargo, en todos los tratamientos a 7 días se observa el marcaje positivo en la parte anterior del epitelio corneal. Curiosamente, también puede observarse el marcaje en el control W-H, en el que sólo hay una capa epitelial a las 48 horas tras la cirugía. Este resultado demuestra que el establecimiento del efecto barrera es prioritario en el cierre de la herida corneal.

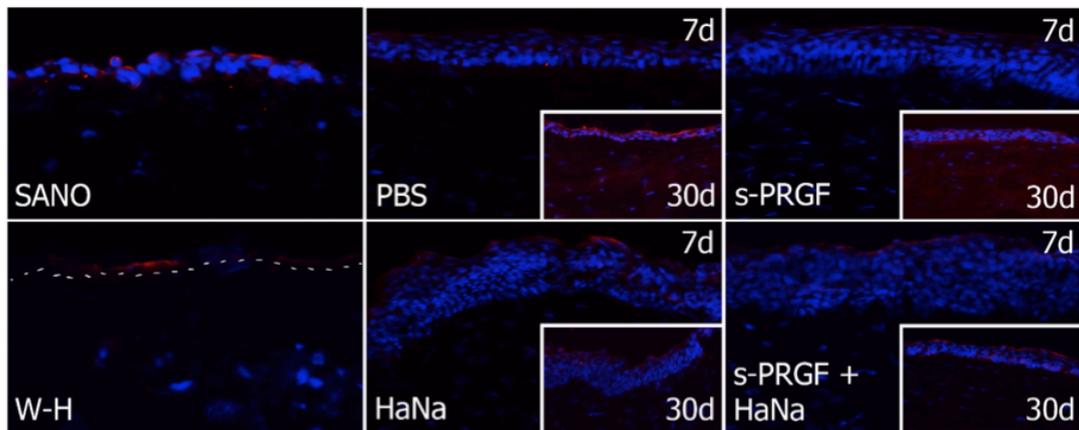


Figura 16. Inmunomarcaje fluorescente para ZO-1 en el área de la córnea central. Las córneas de conejo fueron tratadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control, y se procesaron 7 y 30 días tras la cirugía corneal. La imagen SANO corresponde a una córnea de conejo no sometida a cirugía. La imagen W-H corresponde a una córnea de conejo sometida a cirugía y procesada tan sólo 48 horas tras la cirugía. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

2.2.2.5. Análisis del marcador α -SMA

Al estudiar el marcador de fibroblastos corneales y miofibroblastos en los cortes histológicos criopreservados, no apreciamos en ningún caso marcaje en las células del estroma de la zona central de la córnea (Figura 16). Sin embargo, en las imágenes se puede observar que en los tratamientos con PBS y s-PRGF, ambos a los 7 días, se produce un punteado a lo largo del epitelio, a diferencia de en los dos tratamientos con HaNa, que no dan marcaje epitelial. Ese mismo marcaje solo se observa a 30 días en el caso del tratamiento combinado de s-PRGF + HaNa.

En el limbo sí pudimos observar el marcaje α -SMA en las células endoteliales de los vasos sanguíneos, así como en algunos miofibroblastos (datos no mostrados).

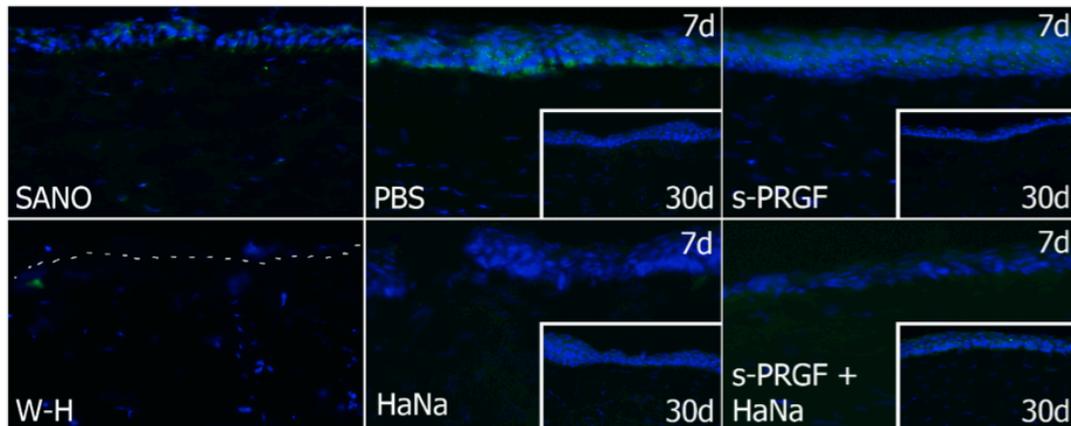


Figura 16 . Inmunomarcaje fluorescente para α -SMA en el estroma de la córnea central. Las córneas de conejo fueron tratadas con s-PRGF, s-PRGF + HaNa, HaNa o PBS como control, y se procesaron 7 y 30 días tras la cirugía corneal. La imagen SANO corresponde a una córnea de conejo no sometida a cirugía. La imagen W-H corresponde a una córnea de conejo sometida a cirugía y procesada tan sólo 48 horas tras la cirugía. Imágenes tomadas a 200 aumentos.

Quisimos analizar el marcaje α -SMA en cortes incluidos en parafina. Para ello, realizamos la técnica inmunohistoquímica en cortes de tejido proveniente de corneas sometidas al mismo tratamiento posoperatorio (control), y procesadas mediante su inclusión tanto en parafina como en OCT. En la Figura 17 observamos en la muestra incluida en parafina (A), el marcaje positivo habitual para α -SMA en las células endoteliales con capacidad contráctil que rodean los vasos sanguíneos, así como en las células fibroblásticas del estroma anterior. En muestra incluida en OCT (B) el marcaje es prácticamente nulo.

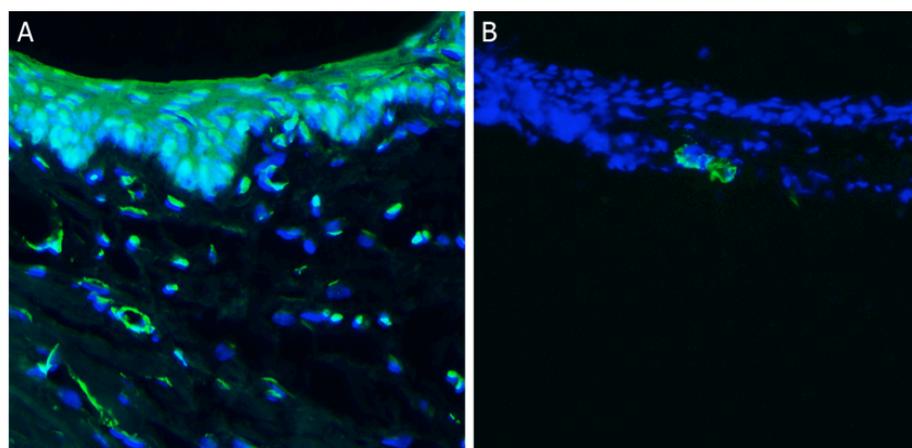


Figura 17 . Inmunomarcaje fluorescente para α -SMA en secciones transversales de córneas incluidas en parafina (A) o en OCT (B). Imágenes tomadas a 200 aumentos.

Resultados

Una vez visto que los resultados para el estudio de esta molécula dependen de la metodología de preservación de la córnea (parafina o criopreservados en OCT), pensamos que nuestros resultados para el α -SMA no son concluyentes.

IV. EFECTO *in vitro* DE LA ALBÚMINA EN COMBINACIÓN O NO CON s-PRGF

1. Cuantificación de la Albúmina en el s-PRGF de sujetos sanos

En primer lugar, quisimos cuantificar la concentración de Albúmina en s-PRGF de 14 sujetos sanos, con intención de comprobar si su valor tenía mucha dispersión interindividual.

Para ello, se extrajo sangre a 14 voluntarios sanos (11 mujeres y 3 hombres), elaborándose s-PRGF con cada una de las muestras, y se cuantificó la Albúmina (Tabla 1). Los resultados muestran que, salvo en una persona, las concentraciones de Albúmina son muy poco dispersas, observándose una media de 3,4 g/ml y una desviación media de 0,36 g/dl, aproximadamente el 10%, es decir, muy similar a la concentración que se encuentra en sangre completa.

Tabla 1. Cuantificación de la Albúmina (g/dl) en s-PRGF de sujetos sanos

	Sexo	Edad (años)	Alb (g/dl)
1	Mujer	40	2,4
2	Mujer	60	3,2
3	Mujer	60	3,8
4	Mujer	80	3,3
5	Mujer	70	3,6
6	Hombre	64	3,1
7	Mujer	72	3,2
8	Hombre	59	3,4
9	Mujer	76	3,5
10	Mujer	89	3,5
11	Mujer	41	3,5
12	Mujer	91	3,6
13	Hombre	42	3,7
14	Mujer	67	3,8
		MEDIA	3,4
		SD	0,36

2. Experimentación *in vitro*

2.1. Proliferación células epiteliales HCE

Encontramos que a las 24 horas de tratamiento la Albúmina humana induce la tasa de proliferación más alta en las células de epitelio corneal humano HCE (Fig 1), siendo estadísticamente significativo con respecto al resto de los tratamientos ($p < 0.01$; test Kruskal-Wallis). A las 72 horas de incubación, la Albúmina sola o combinada con 20% o 50% s-PRGF muestra una tasa de proliferación de células HCE significativamente mayor que cualquier concentración de s-PRGF no combinada con Albúmina ($p < 0.01$). No se encontró ninguna diferencia estadísticamente significativa en la proliferación de células HCE cuando se cultivan con Albúmina humana, 20% s-PRGF junto con la Albúmina o 50% s-PRGF junto con la Albúmina.

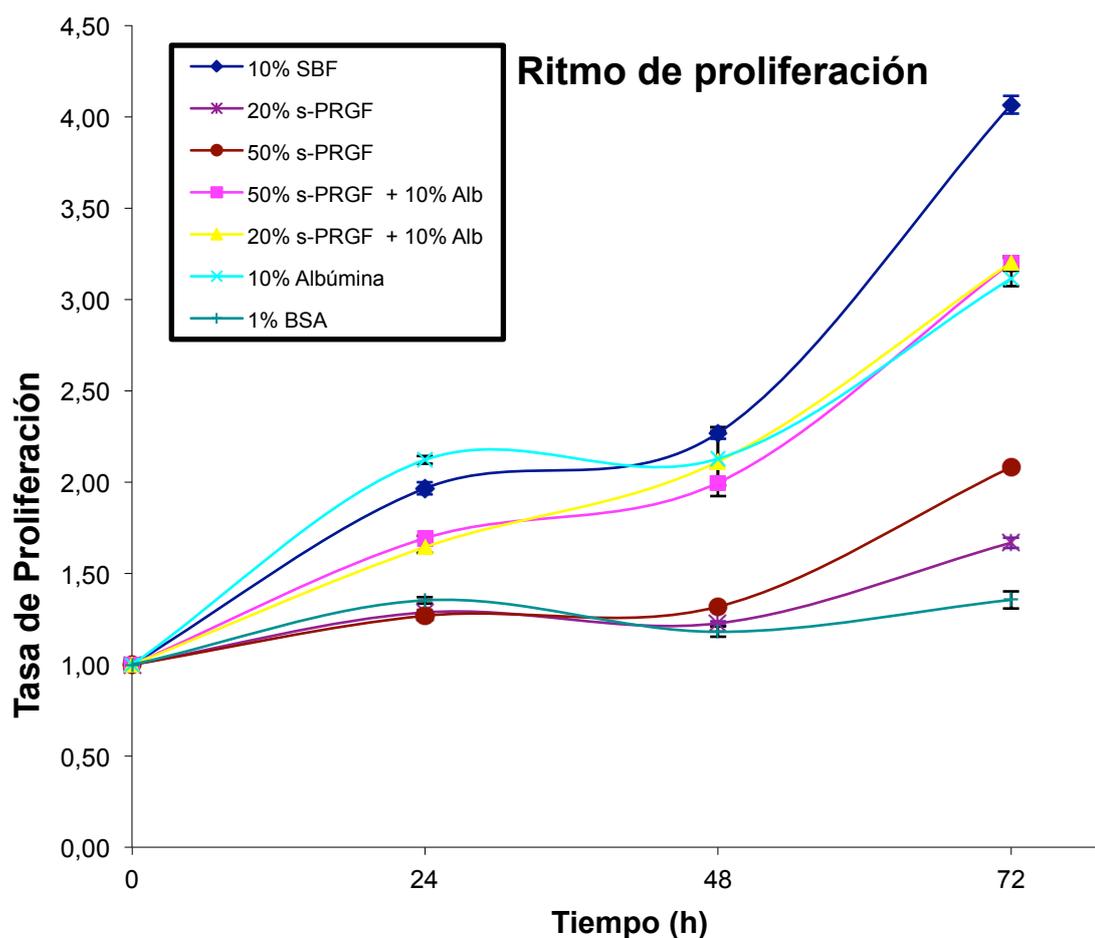


Fig. 1. Efecto del tratamiento con Albúmina humana, s-PRGF y la combinación de ambos sobre el patrón de proliferación de células de epitelio corneal humano (HCE). Los cultivos fueron expuestos durante 24, 48 y 72 horas, siendo el tratamiento 1% BSA el control. Los resultados se expresan como el ratio de proliferación \pm la desviación estándar con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

El tratamiento de referencia 10% FBS (cultivo celular estándar) sí muestra diferencias significativas respecto a cualquiera de los demás tratamientos a las 72 horas, obteniendo las tasa más altas de proliferación a dicho tiempo (Fig 1 y Tabla 2).

Tabla 1. Ratio de proliferación de los cultivos de células de epitelio corneal humano (HCE) expuestos a los distintos tratamientos, siendo el tratamiento 1% BSA el tratamiento control. Los resultados se expresan como el promedio del ratio de proliferación \pm la desviación estándar. El cálculo del ratio se realiza con respecto al número de células a tiempo 0 horas.

	TIEMPO (h)		
	24	48	72
10% FBS	1,97 \pm 0,033	2,27 \pm 0,032	4,07 \pm 0,049
50% s-PRGF	1,27^{†††} \pm 0,012	1,32^{†††} \pm 0,017	2,08^{†††} \pm 0,014
20% s-PRGF	1,29^{†††} \pm 0,014	1,23^{†††} \pm 0,012	1,67^{†††} \pm 0,029
50% s-PRGF +10% Alb	1,69^{††} \pm 0,13	2 \pm 0,011	3,2 \pm 0,024
20% s-PRGF +10% Alb	1,64^{††} \pm 0,032	2,11 \pm 0,189	3,2 \pm 0,036
10% Albúmina	2,12 \pm 0,022	2,13 \pm 0,151	3,11 \pm 0,042
1% BSA	1,35^{†††} \pm 0,019	1,18^{†††} \pm 0,028	1,35^{†††} \pm 0,047

Diferencias estadísticamente significativas respecto a la Albúmina ([†]). (Test de Kruskal- Wallis: [†]p \leq 0.05; ^{††}p \leq 0,01; ^{†††}p \leq 0,001; n/s, no significativo).

2.2. Reepitelización de células epiteliales HCE (Wound Healing Assay). Migración

Los tratamientos con 10% Albúmina sola o combinada con 20% o 50% s-PRGF no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos o respecto al control negativo (1% BSA), no mostrando mejora en la re-epitelización. Sólo los tratamientos con 20% y 50% s-PRGF en solitario aceleraban la recuperación de la monocapa celular respecto a cualquier otro tratamiento a las 12 horas del raspado celular, con diferencias significativas (p<0.05) (Figs.2 y 3).

Resultados

Tabla 2 Progresión del recubrimiento de la monocapa de células HCE expuestas a los distintos tratamientos, siendo el tratamiento 1% BSA el tratamiento control. Los resultados se expresan como el promedio del área recubierta en mm² ± la desviación estándar.

	TIEMPO (h)			
	0	12	24	36
10% Albúmina	0,67 ± 0,15	0,46* ± 0,14	0,11*† ± 0,09	0,06*† ± 0,07
20% s-PRGF	0,64 ± 0,20	0,33 ± 0,12	Cerrado†	Cerrado†
20% s-PRGF + 10% Alb	0,58 ± 0,16	0,42* ± 0,14	0,06*† ± 0,09	0,03*† ± 0,03
50% s-PRGF	0,66 ± 0,24	0,39 ± 0,21	0,02† ± 0,04	Cerrado†
50% s-PRGF + 10% Alb	0,70 ± 0,26	0,48* ± 0,25	0,06*† ± 0,07	0,03*† ± 0,03
1% BSA (control)	0,68 ± 0,18	0,46* ± 0,14	0,34* ± 0,14	0,29* ± 0,14

Diferencias estadísticamente significativas respecto al control (†) o respecto al s-PRGF (*). (One Way ANOVA: *p ≤ 0.05)

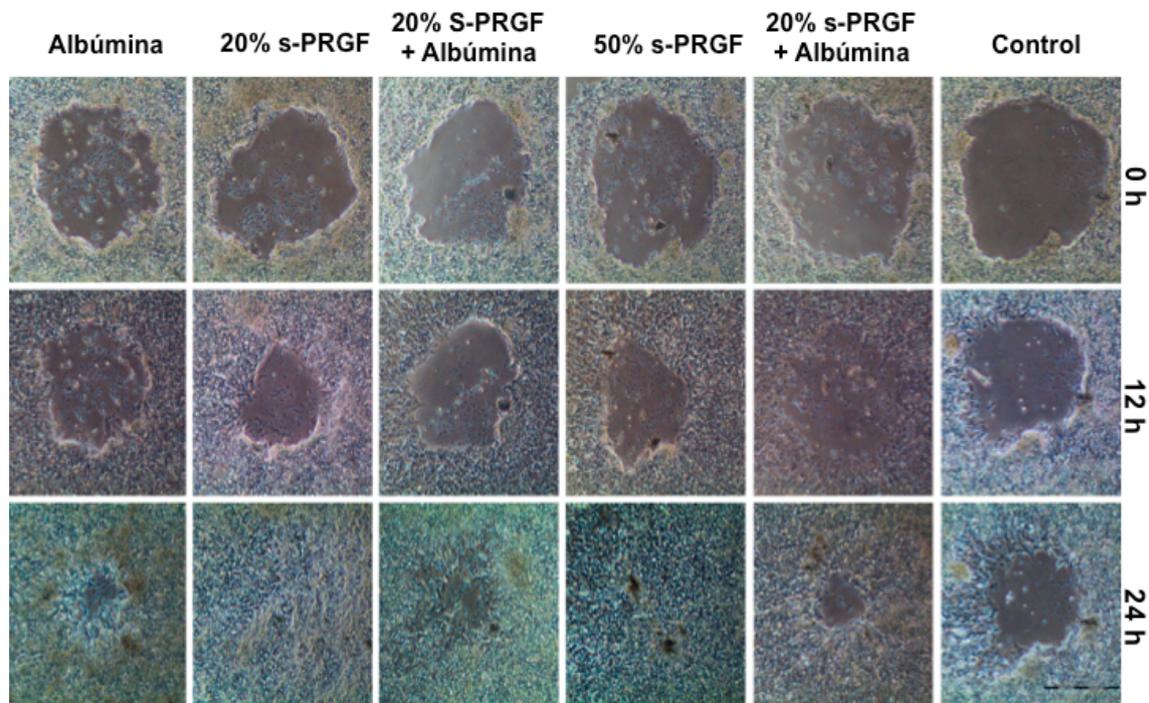


Fig. 3. Fotografías de microscopía de contraste de fases que ilustran la evolución de las áreas desnudas en cultivos de células HCE tras 12 y 24 horas de incubación con los distintos tratamientos. Barra de escala 200 μm.

De hecho, el 100% de los pocillos que estuvieron con 20% o 50% s-PRGF tenían la monocapa totalmente cerrada a las 36 horas, mientras que esto solo ocurrió en el 70% de los pocillos con s-PRGF combinado con Albúmina y en menos del 20% de los pocillos tratados con Albúmina en solitario (Fig. 4). Ningún pocillo se re-epitelizó por completo a este tiempo con el tratamiento control.

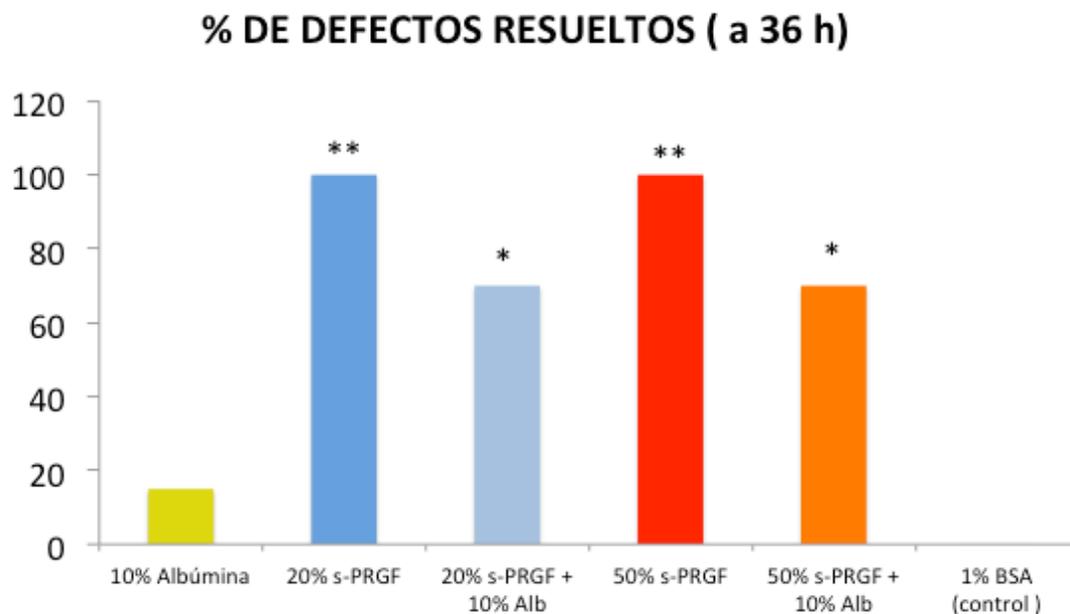


Fig . 4. Porcentaje de pocillos en los que el defecto en la monocapa de células HCE fue completamente resuelto tras el tratamiento durante 36 horas. Los tratamientos utilizados fueron: Albúmina 10%, s-PRGF 20%, s-PRGF 20% junto con Albúmina 10%, s-PRGF 50%, s-PRGF 50% junto con Albúmina 10% ó 1% BSA como tratamiento control. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, test Chi cuadrado).

Todos los tratamientos que contenían s-PRGF (con o sin Albúmina) mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a la Albúmina en solitario o al tratamiento control, siendo las diferencias significativas en los tratamientos combinados y muy significativas cuando se utilizó s-PRGF en solitario.

Discusión

I. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE DILUCIONES DEL s-PRGF

En los últimos años, las terapias con PRP están siendo cada vez más usadas en Oftalmología, al ser consideradas como una fuente autóloga de factores de crecimiento y moléculas señalizadoras (Liu et al. 2006). Su uso se basa en la premisa de que las plaquetas que contienen los PRPs constituyen un reservorio crítico de factores de crecimiento que, una vez liberado, modulan una serie de procesos biológicos incluyendo la inflamación, angiogénesis, proliferación celular, migración, diferenciación y síntesis de matriz extracelular. Además, se ha descrito que la concentración de factores de crecimiento es mayor cuando las plaquetas son activadas respecto a cuando no lo están (Liu et al. 2006).

En el PRP utilizado en este estudio, el s-PRGF, las células blancas son excluidas inicialmente, ante la hipótesis teórica de que pudieran exacerbar el daño de tejidos vía diferentes mecanismos. Por ejemplo, los leucocitos segregan citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , interferón- γ , IL-6 y -1b, que pudieran producir destrucción celular a través de la producción de MMP (metaloproteasas) 1, -3 and -13 (Anitua et al. 2015b). Quizá esta sea la razón por la que la tolerancia del s-PRGF sea muy buena (López-Plandolit et al. 2010; López-Plandolit et al. 2011). Otros grupos ponen en entredicho la afirmación de que el PRP no deba tener leucocitos ya que estas células tienen funciones beneficiosas como antimicrobianas (Moojen et al., 2008; Cieslik-Bielecka et al, 2012), control del exceso de inflamación (aunque la inflamación es necesaria para una correcta respuesta de cicatrización) en las primeras fases del proceso ya que los leucocitos contienen citoquinas antiinflamatorias (IL-4, -10, -13), contienen factores antiálgicos (opioides), factores de crecimiento (Bielecki et al., 2012). Además, está descrito que la depleción de leucocitos no afecta a la capacidad del PRP de cicatrización de los fibroblastos y endotelio *in vitro* (Giusti et al., 2018). En este sentido el L-PRP (leukocyte-rich PRP) parece que tiene más efecto antiinflamatorio y anabólico según algunos autores (Carmona et al, 2016), o todo lo contrario según otros autores (Assirelli et al., 2015). Sobre esta cuestión de si los leucocitos son deseables o no en un PRP, en un futuro habrá que avanzar en qué tipo de leucocitos son los deseables en función de la patología a tratar, buscando según ello protocolos de centrifugación, teniendo en cuenta que la propia centrifugación puede activar los leucocitos o estimularlos patológicamente o destruirlos (Dohan Ehrenfest et al, 2018)

Nuestro grupo fue el primero en utilizar el s-PRGF en Oftalmología (López-Plandolit et al. 2010), así como en adaptar su fabricación al modelo de conejo (Freire et al., 2014). A pesar de que la fracción que está inmediatamente por encima de la fracción blanca o *buffy coat* (fracción F3) es la más rica en plaquetas, nuestro grupo ha utilizado con éxito la fracción completa que hay sobre la fracción blanca para el tratamiento de distintas patologías de la superficie ocular (López-Plandolit et al 2010; López-Plandolit et al. 2011). Pensamos que este punto es realmente importante ya que la fracción justo por encima de la serie blanca es muy pequeña y, en caso de solo utilizar esa fracción, sería necesaria la extracción de una gran cantidad de sangre del paciente en el caso de tratamiento de enfermedades crónicas, como es el caso del síndrome de ojo seco en Oftalmología, el cual tiene un componente neuropático (Craig et al, 2017) . En relación a este punto, existe un estudio *in vitro* comparativo que corrobora nuestros resultados al demostrar la misma efectividad del s-PRGF al usar solo F3 (663,000 plaquetas/ μ l) vs usar todo el sobrenadante por encima de la fracción blanca (481,000 plaquetas/ μ l) en términos de proliferación, migración e inhibición de la diferenciación de queratocitos estromales (Anitua et al. 2011). Además, otros estudios han demostrado que los PRPs con concentraciones intermedias de plaquetas de alrededor de 300–600% sobre las concentraciones basales (es decir, entre 503.000 - 1.729.000 plaquetas/ μ l-PRP respecto a las 150.000 - 400.000 plaquetas/ μ l-sangre de la concentración basal) son necesarias para conseguir regeneración ósea (Marx et al. 1998; Weibrich et al. 2004). Mientras que las preparaciones con concentraciones de plaquetas más altas, tienen una influencia inhibitoria sobre la actividad osteoblástica, probablemente debido a que la dosis umbral de ciertas moléculas inflamatorias disueltas en el PRP se haya excedido y produzca efectos inhibitorios de actividad osteoblástica (Weibrich et al., 2004).

De forma similar a otros autores, nuestro grupo ha demostrado que el s-PRGF y otros hemoderivados ricos en factores de crecimiento favorecen la proliferación celular de células epiteliales corneales humanas (HCE) (Liu et al., 2006; Freire et al., 2012; Anitua et al., 2013). En el presente estudio, hemos demostrado la gran capacidad del s-PRGF para estimular la proliferación celular de cultivos primarios de células epiteliales corneales de conejo (RPCE). Este punto es importante, ya que los cultivos primarios tienen unas características más similares a la situación *in vivo* que las líneas celulares establecidas. Nuestros resultados actuales también indican que el s-PRGF favorece la migración celular de las células epiteliales corneales de cultivos primarios de conejo (RPCE) de una forma más rápida que la ya observada sobre las células epiteliales corneales humanas de una línea celular ya establecida, HCE (Freire et al. 2014). En los

cultivos primarios, el efecto sobre la migración celular no es dosis dependiente, mostrando que no hay diferencias significativas cuando las exponemos a distintas concentraciones de s-PRGF o, incluso, todavía más llamativo, cuando las exponemos a 10% de suero fetal bovino (10% FBS). Este hallazgo sugiere que los cultivos de células epiteliales primarias podrían ser llevados a cabo con medios conteniendo este hemoderivado autólogo como alternativa al FBS, evitando el uso de este producto xenogénico para realizar la expansión de células con uso terapéutico.

Sorprendentemente, el s-PRGF y el 10% FBS tienen la misma capacidad de promover la reepitelización de células RPCE *in vitro*. Las áreas denudadas de células en ambos grupos de tratamiento se cierran prácticamente del todo a las 12 horas del experimento del raspado celular.

Un resultado destacable es el obtenido en el ensayo *in vivo* en ojos de conejo, en el que el cierre epitelial tras producirse una herida es más rápido a medida que incrementamos las concentraciones de s-PRGF, siendo solamente estadísticamente significativa la diferencia cuando usamos s-PRGF no diluido (100% s-PRGF). Así, no hemos encontrado diferencias significativas en la reepitelización corneal *in vivo* en conejos sanos cuando empleamos lágrimas artificiales (control), colirio de 20% s-PRGF o colirio de 50% s-PRGF. De acuerdo con esta observación, otros autores también concluyen que los hemoderivados diluidos no tienen efectos significativos sobre la reparación de heridas corneales (Shahriari et al., 2008). Sospechamos que este hallazgo puede ser debido a que los conejos sanos tienen unas vías neuronales intactas y, de este modo, a pesar de que se observa una tendencia (no significativa) a una reepitelización más rápida a medida que aumentamos la concentración del s-PRGF, el 20 o 50% s-PRGF son insuficientes para acelerar el cierre epitelial espontáneo de modo significativo respecto al control. Muy posiblemente, en casos patológicos de úlceras neurotróficas (con vías neuronales afectadas), consideramos que incluso concentraciones más bajas de s-PRGF podrían acelerar de modo significativo el cierre de heridas corneales epiteliales comparado al control con lágrimas artificiales, pero esta hipótesis debería ser comprobada experimentalmente en un modelo animal de neurotrofia. De hecho, nuestro grupo ha observado que la aplicación de colirios de 50% s-PRGF es efectiva como tratamiento para la restauración de la superficie ocular en pacientes con defecto epitelial persistente que no respondieron a otros tratamientos (López-Plandolit et al., 2010). De todos modos, actualmente pensamos que, incluso en pacientes con vías neuronales dañadas en los cuales el colirio de 50% s-PRGF puede ser estadísticamente efectivo, el 100% s-PRGF sería la concentración óptima de uso para mejorar la sensibilidad corneal ya que contiene la máxima concentración de factores

neurotróficos y mantenedores del epitelio (López–Plandolit et al., 2010; Matsumoto et al., 2004).

Otros resultados de nuestro grupo, realizados con otros hemoderivados, muestran una reepitelización algo más rápida *in vivo* en córneas de conejo cuando usamos s-PRGF que cuando usamos otros hemoderivados (incluido suero autólogo), especialmente en los primeros días de la reparación de la herida corneal. Consistentemente, otros estudios, han demostrado que, en los primeros días de tratamiento sobre conejos sanos con heridas de piel, estos defectos dermatológicos cicatrizan mucho más rápido con PRGF que cuando usamos un tratamiento control (Molina–Miñano et al., 2009).

Nuestros estudios histológicos han demostrado la correcta reepitelización de todos los epitelios en todas las córneas de conejo un mes después de la cirugía. Aún así, encontramos diferencias en la distribución de queratocitos en las capas estromales anteriores a medida que aumentamos la concentración de s-PRGF y también según el tiempo que ha pasado desde la cirugía. Específicamente, cuando las córneas son procesadas a los 7 días desde la cirugía del daño epitelial, la población de queratocitos en las capas superficiales del estroma anterior está directamente relacionada con la concentración usada de s-PRGF. De hecho, la población de queratocitos en capas superficiales del estroma a los 7 días del daño corneal sólo fue normal en los casos en que usamos 100% s-PRGF. Sin embargo, cuando las córneas fueron procesadas un mes tras la cirugía del daño corneal, independientemente de la concentración usada de s-PRGF, todo el estroma anterior contenía queratocitos. Fisiológicamente, se ha descrito que después del desbridamiento del epitelio corneal, los queratocitos adyacentes a la herida empiezan a fragmentarse y sufren muerte celular, creando una estrecha zona acelular en el estroma anterior (Fini & Stramer, 2005). Los queratocitos adyacentes se activan y progresan hacia la mitosis. Además, los queratocitos empiezan a migrar hacia el área dañada en 24 horas, llegando a la herida hacia las 48 horas con la típica morfología de fibroblastos (Fini & Stramer, 2005; Zieske et al. 2001). Entonces, los fibroblastos activados secretan diferentes moléculas que reestructuran la matriz extracelular y soportan la migración y adhesión de células epiteliales (Fini & Stramer, 2005). Hemos demostrado, de acuerdo con otros autores (Anitua et al., 2015c), en ensayos de quimiotaxis *in vitro* que el s-PRGF tiene una capacidad quimioatrayente sobre queratocitos mayor que la que tienen el FBS o el control. En este sentido, se ha descrito que la adición de suero bovino fetal a un cultivo *in vitro* de queratocitos inicia su activación, y entran en el ciclo celular con un cambio de fenotipo muy similar al de los

fibroblastos (Fini & Stramer, 2005). Nuestros hallazgos inmunohistoquímicos sobre α -SMA, una proteína asociada a la activación de fibroblastos y miofibroblastos (Wilson, 2012), muestran células positivas para α -SMA en el estroma anterior de córneas tratadas con 100% s-PRGF. Es más, las corneas con tratamiento con 100% s-PRGF fueron las únicas que tenían células α -SMA positivas en todo el espesor del estroma, incluyendo el tercio anterior. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que las interacciones epitelio-estroma son importantes en el desarrollo de miofibroblastos corneales (Wilson, 2012).

En nuestros experimentos, la tinción α -SMA positiva fue muy leve en las corneas extraídas a los 30 días tras el daño epitelial, aunque fueran tratadas con 100% s-PRGF (corneas que habían sido tratadas durante 7 días tras el desbridamiento epitelial y que se mantuvieron otras 3 semanas ya sin ningún tratamiento antes de la eutanasia y la extracción de la cornea). En este sentido, la activación y diferenciación de los queratocitos hacia miofibroblastos es un evento necesario y fisiológico en la reparación del daño corneal. Los miofibroblastos segregan grandes cantidades de matriz extracelular, además de mostrar capacidades contráctiles, sirviendo así a la reparación del tejido mediante la organización de la matriz extracelular en la herida y la contracción de la misma (Wilson, 2012). De todos modos, la matriz extracelular opaca secretada por los miofibroblastos suele contribuir a la opacidad estromal en un tejido (la cornea) que debe ser transparente. Por ello, debe ser reabsorbido posteriormente por los queratocitos, con intención de restaurar la transparencia normal y evitar el *haze* (opacidad) corneal. Considerando que la expresión del α -SMA disminuye en pocas semanas tras acabar el tratamiento con s-PRGF no diluido, podríamos decir que este PRP parece un producto muy deseable para el tratamiento de defectos epiteliales corneales, al inducir un fenotipo α -SMA positivo en las primeras fases tras la herida corneal y reducirlo posteriormente para evitar una opacidad corneal. Este PRP promueve una respuesta regenerativa rápida y parece que previene la formación de cicatriz en la córnea, ya que no observamos ninguna opacidad en las córneas de conejo al usar la lámpara de hendidura portátil. Además, las secciones teñidas con H-E muestran un tejido normal bien estructurado y la expresión α -SMA disminuye muy rápidamente después de acabar el tratamiento.

Es conocido que la proliferación, migración y diferenciación de los queratocitos está mediada por multitud de factores de crecimiento que están presentes en el s-PRGF: TGF, PDGF y FGF (Andresen et al., 1997). De hecho, en el s-PRGF, hay un alto contenido de PDGF, siendo 10 veces mayor que en la película lagrimal (Vesaluoma et

al., 1997). *In vitro*, el 80% s-PRGF induce la quimiotaxis de queratocitos de modo menos intenso que el 50% s-PRGF. Este hallazgo es consistente con las descripciones de otros autores que encuentran que el mayor efecto sobre la migración de los fibroblastos NIH3T3 fue obtenido con concentraciones moderadas de PDGF, disminuyendo el efecto con mayores concentraciones (De Donatis et al., 2008). Este punto, junto a la presencia de un exceso de moléculas inflamatorias que podrían producir efectos citotóxicos e inhibidores en preparaciones de plaquetas altamente concentradas (Weibrich et al., 2004), podría ser la razón de que la efectividad óptima *in vitro* para la quimiotaxis de queratocitos se produzca con hemoderivados con concentraciones moderadas de plaquetas. *In vivo*, consideramos que este punto no es relevante, incluso con hemoderivados no diluidos, ya que al ser utilizados como gotas, se diluyen con la película lagrimal de la superficie ocular.

En el proceso de reparación de la herida corneal, las células madre del epitelio corneal, localizadas en el limbo basal, producen células que se van diferenciando progresivamente para reconstruir el epitelio (Park et al., 2006; Kameishi et al., 2015). Utilizando el anticuerpo citoqueratina K15, el cual es un supuesto marcador del fenotipo progenitor limbar (Yoshida et al., 2006), hemos encontrado una mayor tinción positiva para K15 a medida que aumentamos la concentración del s-PRGF, observándose *clusters* más grandes de células stem/progenitoras en córneas tratadas con s-PRGF no diluido. Este resultado muestra que el efecto del s-PRGF no está restringido al área con el daño epitelial, sino que también se extiende de modo efectivo a la periferia del ojo para producir una respuesta integral para resolver el defecto epitelial. Por tanto, el s-PRGF parece que es capaz de estimular la proliferación de las células progenitoras limbares, a la vez que mantiene su estado de indiferenciación (*stemness*), acelerando el proceso de reepitelización. Se han descrito resultados similares para células satélite, las células madre específicas que mantienen el potencial regenerativo del músculo esquelético (Li et al., 2013), así como para otras células progenitoras de origen mesenquimal (Andia & Abate, 2015).

Las células del epitelio corneal que se diferencian a partir de las células progenitoras, expresan marcadores de diferenciación epitelial corneal como la citoqueratina 3 y 12 (Secker & Daniels, 2009). La citoqueratina K3/76 y la proteína de uniones intercelulares ocluyentes *zonula occludens-1* (ZO-1) se encontraron de forma más abundante en epitelios de corneas tratadas con concentraciones altas de s-PRGF. Ambas proteínas son características de células epiteliales maduras (Wu et al., 2014). La K3 está presente en todas las capas del epitelio corneal y en las capas suprabasales del epitelio

limbar de corneas normales. La proteína ZO-1 es una de las proteínas clave en la organización de las *tight junctions*. Estas uniones celulares proporcionan propiedades de adhesión intercelular y función barrera al epitelio corneal (Wu et al., 2014). Nuestros resultados sugieren que el s-PRGF favorece la diferenciación de células epiteliales corneales, creando un epitelio corneal maduro y especializado, y aceleran el establecimiento de la función barrera que se ha perdido durante la herida corneal.

Resumiendo, hemos realizado una serie de experimentos con el hemoderivado rico en factores de crecimiento, s-PRGF. Debido a su composición y a evidencias previas, el uso del s-PRGF puede ser considerado particularmente adecuado para acelerar la reepitelización corneal y la reparación estromal. Nuestros resultados evidencian que el s-PRGF acelera los mecanismos habituales implicados en la reepitelización, incluyendo proliferación celular, migración, adhesión y diferenciación a células maduras y especializadas, restaurando rápidamente la función barrera del epitelio. También promueve la migración y activación de células estromales, pero evitando la formación de cicatriz. Interesantemente, el s-PRGF mantiene las propiedades de indiferenciación (*stemness*) de las células progenitoras limbares, además de estimular a dichas células a proliferar y diferenciarse para apoyar la reepitelización (Fig. 1). Todos estos datos pueden explicar el uso beneficioso observado en las aplicaciones clínicas del s-PRGF.

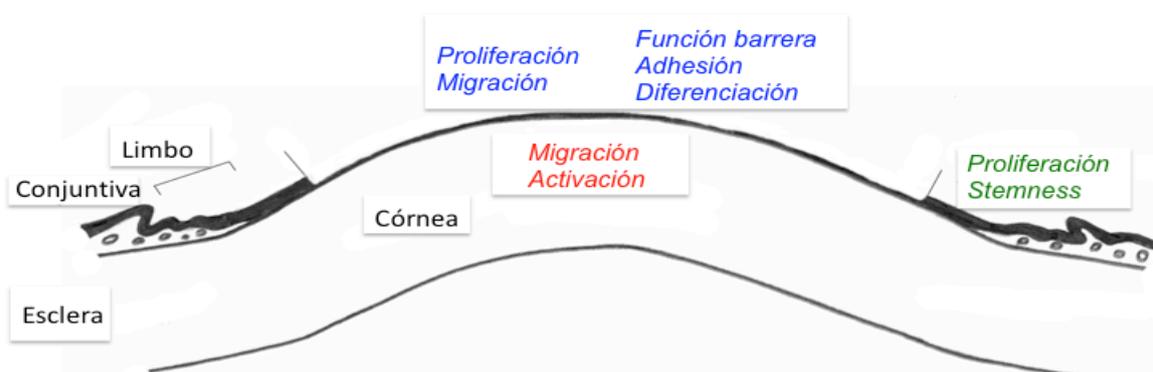


Fig. 1: Sinopsis de los diversos efectos inducidos por el s-PRGF sobre los distintos tipos celulares de la superficie ocular durante la reepitelización corneal. Azul: células epiteliales. Rojo: queratocitos estromales.

Discusión

Verde: células madre/progenitoras del limbo esclero-corneal. Las barras diagonales acotan el área del defecto epitelial corneal.

Como aproximación práctica, está claro que el 100% es la concentración óptima del s-PRGF autólogo para obtener beneficios significativos en la reparación corneal en el modelo de ojo de conejo sano. Es importante señalar que no se apreció ningún efecto tóxico en los ensayos in vivo, posiblemente debido a que el 100% s-PRGF se diluye con las lágrimas al ser aplicado sobre el ojo. Por tanto, sugerimos usar concentraciones no diluidas para el uso clínico de s-PRGF, y posiblemente de otros hemoderivados. Es más, este estudio demuestra que la dosis de 4 veces al día es suficiente para acelerar la reepitelización corneal sin aportar toxicidad. De todos modos, se necesitarían más experimentos, antes de decidir aumentar la dosis en los pacientes, para determinar si hay alguna dosis por encima de la cual este tratamiento pudiera ser tóxico para el epitelio corneal. Por otra parte, la dosis óptima de s-PRGF y la efectividad de este tratamiento para casos de neurotrofia aun están por determinar. Pensamos que, incluso en casos de neurotrofia, es muy posible que los efectos máximos de reepitelización se consigan con las concentraciones más altas del hemoderivado y mayor frecuencia de instilación. En relación a esto, el s-PRGF autólogo no diluido ha mostrado efectos positivos tanto sobre las células epiteliales como estromales, facilitando la mejoría de la reparación corneal sin toxicidad.

II. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO DEL BIOADHESIVO

Las barreras oculares y el continuo *turnover* de las lágrimas pueden alterar la absorción de los fármacos instilados en el ojo por lo que, a pesar de que las gotas oculares son un tratamiento fácil de usar, deben ser instiladas frecuentemente o a altas concentraciones para conseguir niveles terapéuticos en los tejidos.

La alta frecuencia de instilación puede ser una causa de falta de cumplimiento de tratamiento por parte de los pacientes. Por este motivo, el desarrollo de vehículos con capacidad de adherirse al tejido conjuntival y/o mucinas corneales es una alternativa interesante para la aumento en la biodisponibilidad de medicaciones oftalmológicas.

Con el objetivo de aumentar la biodisponibilidad de fármacos se han reportado, además de hidrogeles y micelas poliméricas (Bongiovi et al., 2017), nanopartículas o nanocápsulas biodegradables como agentes para la liberación de fármacos en superficie ocular (De Campos et al., 2001). En este sentido, se han usado nanoesferas rellenas de ciclosporina A y revestidas de ácido hialurónico (AH), demostrando que se consigue alcanzar, en modelo *in vivo* de conejo, mayor concentración del fármaco en córnea respecto a su utilización estándar asociado a aceite de ricino (castor oil) (Yenice et al., 2008). También se ha reportado el uso de niosomas revestidos de ácido hialurónico para liberar tacrolimus en superficie ocular, concluyendo que el ácido hialurónico mejora la adhesión a las mucinas de la superficie ocular respecto a niosomas no revestidos de ácido hialurónico (Zeng et al., 2016).

El papel de los liposomas, vesículas con una bicapa fosfolipídica, también está siendo investigado en este sentido, aunque su potencial es limitado, debido a su vida media corta en la superficie ocular y a su relativa poca estabilidad (Yenice et al., 2008). También se han usado liposomas modificados con un recubrimiento de AH para facilitar la entrada de fármacos (en concreto, doxorubicina) en las células corneales HCE (Lin et al., 2016), mostrando mayor tiempo de residencia y mayor concentración de fármaco (doxorubicina) *in vivo* que en el caso de usar liposomas sin recubrimiento de AH.

Otros autores han probado otros vehículos de propiedades mucoadhesivas bien conocidas con intención de aumentar el tiempo de contacto de diversos medicamentos en el tejido corneal, y así poder facilitar su efecto terapéutico. Así, se ha estudiado el uso concomitante de carboximetilcelulosa 0,5% o AH 0,2% o hidroxipropilcelulosa 0,3-0,5% asociado a Timolol 0,5% tópico, mostrando que la eficacia hipotensora ocular era igual o incluso, significativamente mayor al combinar Timolol con carboximetilcelulosa

respecto a los colirios comerciales de Timolol 0,5% (Andres-Guerrero et al., 2011). Además, esta combinación produjo una tolerancia *in vitro* significativamente mayor que la formulación tradicional, funcionando posiblemente como reductores de toxicidad ocular y protectores la superficie ocular en el caso de tratamientos prolongados. Estos autores también concluyeron que incrementar la viscosidad de la formulación oftálmica reduce la absorción sistémica del fármaco y, *a priori*, podría aumentar el tiempo de residencia del fármaco en superficie ocular.

También se han utilizado moléculas surfactantes tópicas (perfluorohexiloctano) con intención de evitar la evaporación lagrimal (Steven et al., 2015). Asimismo, se han desarrollado insertos oftálmicos de metilpropilcelulosa (Lacrisert[®]) con intención de aumentar el tiempo de residencia de la lágrima en superficie ocular y mejorar la calidad de la misma (Prause, 1986).

Otra estrategia para prolongar el contacto de fármacos con la superficie ocular es el uso de lentes de contacto que van liberando lentamente dicho fármaco a lo largo de 1 mes (en concreto con latanoprost), con el mismo o incluso mejor efecto hipotensor que el tratamiento estándar de 1 gota cada 24 horas. En este caso se encapsula un film de un biopolímero con el latanoprost y se coloca en una lente de contacto de hidrogel metafilon (Ciolino et al., 2016).

También se ha intentado prolongar el tiempo de contacto de los lisados de plaquetas con la superficie ocular dañada. En este contexto, Sandri y colaboradores estudiaron la combinación de sustancias con propiedades mucoadhesivas, como el ácido poliacrílico y el citosán, con los lisados plaquetarios, para poder facilitar el efecto terapéutico de los mismos (Sandri et al., 2011). Y también se ha estudiado la combinación del AH con suero autólogo (Lopez-García et al., 2014).

Una constante que se repite con objeto de aumentar el tiempo de contacto del producto terapéutico con la superficie ocular, es el uso del AH.

El AH es una molécula bioadhesiva producida por las células de la matriz corneal, siendo uno de los principales componentes de la misma. Es un glicosaminoglicano polianiónico compuesto de subunidades de disacáridos de N-acetil glucosamina y ácido D-glucurónico (Andia & Abate, 2014). En función del número de disacáridos unidos, se formarán ácidos hialurónicos de distinto peso molecular. Entre sus características, cabe destacar que es biocompatible, biodegradable y no tóxico, ni irritante (Goa & Benfield, 1994; Choi et al, 2008). Es una sustancia con gran capacidad de unión al agua, y con

un comportamiento de fluido viscoso y pseudoplástico con capacidad de actuar como un polímero mucoadhesivo, lo cual hace que pueda aumentar el tiempo de residencia en ojo, además de reducir la fricción durante el parpadeo y los movimientos extraoculares (Aragona et al., 2002). Además, se usa como un lubricante natural de la superficie ocular que reduce el daño epitelial de la misma (Aragona et al., 2002).

La proporción en masa del ácido hialurónico en la matriz extracelular no es grande, pero requiere mucho espacio. El AH es marcadamente hidrofílico y debido a sus grupos ácidos ionizados a pH fisiológico, posee una elevada carga negativa que provoca que se le unan grandes cantidades de cationes con sus voluminosos revestimientos de agua. Estas cargas negativas, en principio, facilitarían la adhesión a la superficie ocular dando más biodisponibilidad corneal a las moléculas asociadas al ácido hialurónico. (Werner Müller-Esterl, 2008).

El AH de alto peso molecular tiene propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias, por reducir la migración de células inflamatorias (Waddell, 2007) y por inhibir específicamente la degradación de la matriz extracelular al inhibir ciertas metaloproteasas (Prasadam et al., 2013). También tiene propiedades antiangiogénicas (Muto et al., 2009), y efectos analgésicos que pueden deberse a una estimulación sobre receptores opiáceos (Zavan et al., 2013). Sin embargo, fragmentos pequeños de AH pueden tener efecto proinflamatorio y proangiogénico (Scheibner et al., 2006). En nuestro trabajo hemos utilizado AH de peso molecular intermedio, amablemente cedido por la Dra. Herrero, de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

En cuanto al efecto del AH sobre las células corneales, se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* que el AH facilita la proliferación y la migración de las células epiteliales conjuntivales, además de estabilizar la barrera epitelial de la superficie ocular al unirse a su receptor corneal y conjuntival (hialadherina CD44) (Brignole et al., 2008), y de regular la señalización de factores de crecimiento (Andia & Abate, 2014). Existen trabajos que afirman que el AH favorece la proliferación de células epiteliales corneales (Inoue & Katakami, 1993; Calienno et al., 2017) y su migración y estabilización de la barrera epitelial (Calienno et al., 2017). Sin embargo, otros estudios, indican que el AH influye específicamente en la migración de células epiteliales corneales, pero no en la proliferación de las mismas, por lo que el beneficio del AH en la curación de heridas corneales estaría relacionado con la rápida migración celular, que podría verse beneficiado por la adhesión entre el CD44 de las células epiteliales y el ácido

hialurónico (Gomes et al., 2004). También, el AH facilita la migración y proliferación de fibroblastos (Voigt & Driver, 2012). Además, no tiene citotoxicidad sobre las células epiteliales de la superficie ocular, posee propiedades antioxidantes y tiende a reducir los efectos tóxicos de los conservantes (Debbasch et al., 2002). *In vivo*, se ha observado que mejora la humedad en la superficie ocular (Snibson et al., 1992).

Por tanto, es evidente el efecto beneficioso tanto *in vitro* como *in vivo* del AH, así como del PRP, por separado, tanto en el campo de la traumatología (Anitua et al., 2012) como en el defecto corneal epitelial (Calienzo et al., 2017, Etxebarria et al., 2017). En cuanto al uso concomitante de PRP y AH, los estudios publicados muestran cierta controversia en traumatología, mientras que en oftalmología estudios previos afirman que el uso concomitante del suero autólogo con AH podría ser beneficioso (López-García, et al. 2014), sugiriendo que el AH es un buen vehículo para el suero autólogo, ya que facilitaría la liberación gradual de los factores de crecimiento y aumentaría su duración y efecto en la superficie ocular, por lo que se necesitarían menor número de instilaciones. Ante este “estado del arte”, nos propusimos valorar si la combinación del hemoderivado s-PRGF con el AH puede aumentar el tiempo de exposición del hemoderivado a la córnea, de forma que pueda reducirse el número de instilaciones en el tratamiento del defecto epitelial corneal, facilitando, así, el cumplimiento terapéutico en el caso de tratamientos clínicos. Para ello, realizamos ensayos *in vitro* de proliferación y migración en estirpes celulares corneales epiteliales, en concreto, células de la línea de epitelio corneal humano HCE, y células epiteliales corneales de conejo provenientes de cultivos primarios (RPCE), así como ensayos *in vivo* en un modelo de defecto epitelial corneal inducido en conejo.

Los resultados de proliferación muestran que el HaNa en solitario favorece la proliferación de las células de epitelio corneal HCE, con mejores resultados que el s-PRGF y que la combinación de ambos. Sin embargo, el efecto del HaNa sobre la capacidad de inducción de la proliferación sobre las células primarias de conejo RPCE es similar al del resto de tratamientos, incluido el tratamiento de referencia con FBS y el control negativo (BSA). Por otra parte, el análisis del marcador de proliferación ki67, estudiado mediante técnicas de inmunofluorescencia en cortes histológicos de ojos tratados *in vivo*, confirma un mayor efecto proliferativo del HaNa sobre las células de epitelio corneal (así como sobre los queratocitos del estroma) respecto del resto de tratamientos. Esta diferencia en las tasas de proliferación según el tipo celular estudiado posiblemente se deba a que las HCE son células más diferenciadas, más dependientes del microambiente y de determinadas señales, mientras que las RPCE

son células con mayor potencia intrínseca, ya que contienen células epiteliales progenitoras. Según ciertos autores, la capacidad de estimular la proliferación sobre células epiteliales corneales depende, en gran medida, de la concentración de EGF del medio con el que se cultivan (Yamada et al., 2008). Nosotros observamos en los cultivos primarios tasas de proliferación equivalentes con medios que contienen EGF (s-PRGF combinado o sin combinar con NaHa), en el HaNa e incluso en el BSA. Por ello, proponemos que la proliferación de las células RPCE es independiente, a corto plazo, del medio al que se exponen, ya que tienen una capacidad de proliferación intrínseca.

Por otra parte, nuestros resultados sugieren que se produce una interacción negativa entre el s-PRGF y el HaNa, de forma que disminuye la capacidad proliferativa de las células HCE cuando ambos se combinan respecto a cualquiera de ellos en solitario. Este resultado se ve apoyado por estudios de otros autores que han probado otros vehículos con propiedades mucoadhesivas, como el ácido poliacrílico y el citosán, con intención de aumentar el tiempo de contacto del lisado de plaquetas con el tejido corneal dañado, para favorecer su efecto terapéutico (Sandri et al., 2011). Cuando el citosán se combina con el lisado de plaquetas en cultivos primarios de conejo, tanto de células de epitelio corneal como en queratocitos, la proliferación celular es similar con respecto al lisado de plaquetas en solitario. Sin embargo, en el caso del ácido poliacrílico la proliferación es menor, concordando sus resultados con los nuestros (Sandri et al., 2011), y sugiriendo que el resultado de la interacción está supeditado a la molécula bioadhesiva que se utilice en combinación con el hemoderivado.

En un estudio similar, pero no sobre células de origen ectodérmico (como el epitelio corneal) sino sobre condrocitos (células de estirpe mesodérmicas, como los fibroblastos corneales), Chen y cols mostraron que tanto el AH, como el PRP, como la combinación de ambos mejoraban progresivamente la proliferación de los mismos aunque no de manera estadísticamente significativa entre ellos. Según estos autores, lo que sí conseguía la combinación de AH y PRP de manera significativa respecto al AH o al PRP por separado es la mejora en la expresión de ciertos genes propios de condrocitos, y que previamente habían sido disminuidos mediante tratamiento con IL-1 β y TNF- α . Mediante este tratamiento previo, simulaban un modelo de osteoartritis al inhibir la proliferación de los condrocitos, aumentar su apoptosis, aumentar la expresión de genes inflamatorios, degenerar el fenotipo condrocítico y degradar la matriz extracelular (Chen et al., 2014). La combinación de AH y PRP también conseguía, respecto a los productos por separado, la disminución de la expresión de ciertos marcadores inflamatorios que previamente eran aumentados con dicho pretratamiento

con IL-1 β y TNF- α en los condrocitos expuestos, así como un aumento significativo en la expresión de ciertas proteínas de matriz extracelular. Finalmente, estos autores demuestran en un modelo animal *in vivo* de osteoartritis que la combinación de AH y PRP puede prevenir mejor de la degradación de matriz extracelular que cualquiera de sus componentes por separado (Chen et al., 2014). Además, existen publicaciones con estudios controlados randomizados que muestran mejoría en resultado clínico de osteoartritis de rodilla tratada con AH y PRP respecto a PRP a 3 meses, así como a AH a 1 año (Lana et al., 2016).

Después de todo, podemos concluir que la combinación de s-PRGF y HaNa no actúa sinérgicamente en la proliferación de células de origen ectodérmico del epitelio corneal, e incluso desfavorece el efecto proliferativo que tiene el AH per sé, mientras que dicha combinación sí favorece la proliferación de células de algunas estirpes mesodérmicas o bien la producción de determinadas sustancias por células de otras estirpes mesodérmicas (Anitua et al., 2012; Chen et al., 2014). Todo ello sugiere que el efecto tanto de los PRPs como del AH o de la combinación de ambos es dependiente del tipo celular, y que además puede favorecer distintas funciones biológicas según el caso. Muy posiblemente, sea crítico a la hora de valorar resultados de la combinación de AH y PRP, realizar diferentes ensayos en los que se estudien distintos pesos moleculares del AH (nuestro AH tiene 200-400 kDa, existiendo AH de incluso 2000 kDa) y distintas concentraciones y formulaciones del PRP a ser combinado (nuestro hemoderivado es un P-PRP, Pure-PRP sin leucocitos y baja densidad de fibrina). En este sentido, vuelven a encontrarse discrepancias, entre autores que sugieren que el L-PRP (leukocyte-rich PRP) tiene más efecto antiinflamatorio y anabólico (Carmona et al., 2016) y otros que afirman todo lo contrario (Assirelli et al., 2015). Algunos autores han determinado que la mayor viabilidad de los condrocitos *in vitro* se obtiene con una concentración de 250 μ g/ml de AH, y con una concentración de TGF-beta1 de 1 ng/ml en el PRP (Chen et al., 2014).

Para estudiar el efecto de la combinación del HaNa con el hemoderivado s-PRGF sobre la reepitelización corneal, realizamos un ensayo *in vitro* de cierre epitelial (wound healing assay) en la línea de células epiteliales corneales humanas HCE y en cultivos primarios de epitelio corneal de conejo RPCE, así como un ensayo *in vivo* mediante la inducción de defectos epiteliales corneales en el modelo de conejo. En todos los casos podemos observar que el HaNa en solitario no es tan buen reepitelizante como lo es el

s-PRGF en solitario, siendo éste el tratamiento que mejor estimula la reepitelización corneal. Sin embargo, el HaNa en solitario estimula la migración celular en mayor medida en los cultivos primarios que en la línea establecida. Por otro lado, la combinación de ambos no aporta beneficio en la mayoría de los ensayos, o es incluso contraproducente en el ensayo *in vitro* con RPCE, en el que la adición de HaNa al hemoderivado perjudica la capacidad reepitelizante del s-PRGF.

El hecho de que el HaNa favorezca en cierta medida el cierre epitelial de RPCE podría explicarse por el hecho de que el AH es un componente esencial de la matriz del nicho de las células progenitoras limbares (Gesteira et al., 2017), de modo que, células más indiferenciadas como las RPCE, que pueden conservar todavía los receptores del AH, solamente en contacto con el mismo, puedan migrar más activamente que unas células epiteliales corneales diferenciadas (HCE).

Otros autores han estudiado el efecto de la combinación de PRPs con AH y otras sustancias bioadhesivas sobre la capacidad de migración de células de origen mesodérmico. Los resultados son dispares, aunque, en general, sobre las células de origen mesodérmico el AH sí parece estimular la migración celular. Así, se ha visto en ensayos *in vitro* con fibroblastos sinoviales y de tendón, una mayor estimulación de la migración de los mismos cuando se tratan de forma combinada con AH y PRP que cuando lo hacen con AH o PRP por separado (Anitua et al., 2012), dándose como posible explicación que el PRP aumenta la expresión de la hialadherina o CD44, un receptor del AH. Otros trabajos también han mostrado mayor estimulación de condrogénesis (también células de estirpe mesodérmica) *in vitro* usando AH junto con PRP respecto a cada uno de los tratamientos por separado (Chen et al., 2014). Sin embargo, Sandri y colaboradores demostraron mediante ensayos de tipo wound healing sobre fibroblastos corneales, que el lisado de plaquetas sólo o combinado con el mucoadhesivo citosán favorecen la reepitelización en igual medida, culminándose el cierre epitelial en 24 horas, mientras que la combinación del lisado de plaquetas con el mucoadhesivo ácido poliacrílico no es capaz de reepitelizar los defectos epiteliales incluso pasadas 96 horas (Sandri et al., 2011).

Respecto en los ensayos de reepitelización *in vivo*, en nuestro estudio no observamos diferencias significativas en la capacidad reepitelizante entre ninguno de los tratamientos utilizados (s-PRGF, HaNa, ambos combinados o PBS como control), aunque el s-PRGF ofreció mejores resultados tanto en la evolución del área del defecto

corneal como en el número de defectos totalmente cerrados a determinados tiempos. En otros estudios *in vivo* realizados sobre tejidos mesodérmicos observamos resultados variados. Así, en el campo de la traumatología, utilizando fragmentos de cartílago junto con estructuras de AH frente a fragmentos de cartílago junto con estructuras de AH y PRP para el tratamiento de heridas cartilaginosas, se aprecia reparación tisular de mejor calidad al combinarse el PRP con el AH (Marmoni et al., 2012). Otros autores también han reportado excelentes resultados con la combinación de AH y PRP en la reparación de úlceras por presión y heridas quirúrgicas (Cervelli et al., 2011). También se ha demostrado mejor efecto en el tratamiento de osteoartritis leve/moderada de rodilla en pacientes que recibieron PRP junto con AH frente a AH solo (mejor efecto del PRP junto con AH a 1 año) y frente a PRP en solitario (mejor efecto de PRP junto con AH a 3 meses) (Lana et al., 2016). Sin embargo, por otro lado, otros autores han mostrado igual capacidad de reparación cartilaginosa a nivel histológico en un modelo *in vivo* cuando se usan PRP respecto al uso combinado de PRP y AH (Smyth et al., 2017).

El análisis histológico mediante tinciones de hematoxilina-eosina que realizamos en las córneas reepitelizadas mostró epitelios correctos en todos los casos, aunque aquellos tratados con HaNa se observaron más desorganizados que los de otros tratamientos o los de los controles sanos. Además, se observó una mayor densidad de células fibroblásticas en el estroma anterior de las córneas tratadas con HaNa, sólo o combinado con s-PRGF, a los 30 días tras la cirugía de desepitelización. Se ha descrito que las células estromales, posiblemente miofibroblastos, migran a las capas superficiales del estroma para ayudar a cerrar el área expuesta (Alcalde et al. 2015). Mediante marcaje de proliferación celular Ki67 hemos demostrado que el HaNa induce proliferación tanto en células epiteliales como del estroma, principalmente en los primeros días tras la lesión. La rápida proliferación epitelial inicial puede ser la razón que explique la desorganización de los epitelios en las córneas sometidas a este tratamiento. Sin embargo, las cifras de proliferación (células Ki67 positivas) obtenidas en el estroma anterior sugieren que el acúmulo de células en esa zona no se deba únicamente al proceso de proliferación celular, sino que también sea resultado de la migración celular, como otros autores describen. En el caso del tratamiento combinado, también el s-PRGF puede contribuir a ello, ya que las imágenes histológicas muestran la mayor densidad celular para este tratamiento. Además, en esta tesis hemos demostrado mediante experimentos de migración tipo *transwell* que el s-PRGF ejerce un efecto quimiotáctico sobre los queratocitos corneales (Etxebarria et al., 2017).

El análisis inmunohistoquímico reveló resultados similares para los marcadores de tipo citoqueratina K3 y K15, así como para la proteína ZO-1 entre los distintos tratamientos. Recordemos que la K15 es un marcador de células progenitoras del epitelio corneal (Yoshida et al., 2006), cuya positividad está restringida a las capas basales del epitelio limbar. Nuestros resultados confirman presencia de estas células en el limbo esclero-corneal de todas las corneas estudiadas. Cuando estas células se dividen y se van diferenciando hacia células epiteliales corneales, durante su desplazamiento de forma centripeta y ascendente en la córnea, van expresando progresivamente un mayor marcaje de la citoqueratina K3 (Schlötzer-Schrehardt & Kruse, 2005; Secker & Daniels, 2009). Del mismo modo, las células epiteliales localizadas en la parte más anterior del epitelio corneal expresan la proteína perteneciente a las uniones ocluyentes o *tight junctions* ZO-1 (Wu et al., 2014). En todos los tratamientos, y tanto a los 7 días como a los 30 días postcirugía, observamos un marcaje similar de ambas proteínas, demostrando que todos los tratamientos logran reepitelizar las córneas dañadas, generando un epitelio corneal maduro y funcional. Es curioso observar cómo la función de barrera del epitelio corneal (positividad para ZO-1) se establece desde el mismo inicio de la reparación de la lesión, observándose incluso en aquellos epitelios incipientes formados por una única monocapa celular. Por lo tanto, el establecimiento de la función de barrera corneal es una prioridad en la cicatrización corneal.

Por lo que respecta a la propiedad de adherencia entre el epitelio recién reparado y la matriz extracelular subyacente, nuestros resultados muestran que podría verse favorecida por el tratamiento con s-PRGF. Así, la proteína integrina $\beta 4$ es uno de los componentes que forman parte de las uniones tipo hemidesmosoma entre el epitelio y la matriz (Lauweryns et al., 1991), con objeto de conseguir un tejido compacto y estable. A tiempos cortos (7 días postcirugía) las córneas tratadas con s-PRGF, solo o combinado, son las que muestran un marcaje más intenso y continuo para la integrina $\beta 4$, sugiriendo que este hemoderivado favorece la adhesión epitelial, y que la combinación con HaNa no disminuye este efecto. Este dato es muy importante, puesto que puede explicar la eficacia del s-PRGF en el tratamiento de los defectos epiteliales corneales persistentes y recidivantes (Lopez-Plandolit et al., 2010).

Por último, estudiamos la diferenciación de los queratocitos a miofibroblastos durante la reparación de la herida mediante la detección de la proteína α -SMA. Con el procesamiento realizado en el tejido, no detectamos positividad en el citoplasma de las células estromales de los tejidos reparados en ningún caso. Sin embargo, encontramos una tinción punteada a lo largo del epitelio, específica y muy intensa a los 7 días de

Discusión

tratamiento con PBS y s-PRGF, y no con los otros tratamientos, así como en el tratamiento combinado de s-PRGF y HaNa a los 30 días. Este dato podría estar mostrando una posible transición epitelio-mesénquima en el área dañada. Otros autores han encontrado una tinción similar para α -SMA en el cristalino, que interpretan como transición epitelio-mesénquima (Saika et al., 2003). También se ha descrito como un signo precoz de transición epitelio-mesénquima en la progresión del cáncer de colorectal la positividad para α -SMA en células CK positivas (Valcz et al., 2012). Además, está descrito que el aumento de TGF- β (que es uno de los factores de crecimiento del s-PRGF) favorece la transición epitelio-mesénquima del cristalino en cristalinos dañados (Zheng et al., 2012; Guo et al., 2016). Por ello, pensamos que esta misma circunstancia podría ocurrir en córneas.

Por último, hay que tener en cuenta que el uso de los polímeros asociados a medicaciones en los ojos tiene sus limitaciones, ya que pueden producir visión borrosa más prolongada de lo habitual tras su instilación (Calonge, 2001; Johnson et al., 2008). Además, es posible que el AH cree un escudo que restrinja el contacto de los componentes del s-PRGF con sus receptores, haciendo que su uso combinado tenga peor efecto que su uso en solitario (Lin et al., 2016), circunstancia que concuerda con nuestras observaciones.

Por otro lado, el AH es un componente necesario del nicho limbar. De hecho, el daño del AH que conforma el nicho limbar se traduce en una alteración en la regeneración corneal epitelial. Es decir, el AH tiene un rol muy significativo en el mantenimiento del fenotipo de las células progenitoras limbares (Gesteira et al., 2017). El PRP también parece mantener el fenotipo indiferenciado de células madre mesenquimales (Tobita et al., 2015; Li et al., 2013)). Además, la combinación de PRP y AH parece favorecer la viabilidad y proliferación de las células madre mesenquimales (Vadala et al., 2017). Sin embargo, está por demostrar que dicha combinación sea superior al uso de cada uno de los tratamientos por independiente (PRP y AH) en el mantenimiento del fenotipo indiferenciado de las células limbares corneo esclerales.

Así pues, quedan muchas preguntas en el tintero acerca del uso del PRP, como las siguientes:

¿Cual es el método de activación más adecuado (calcio, trombina, congelación/descongelación, titanio,...)?

¿Deben ser inactivados los factores del complemento en pacientes con patología autoinmune o trasplantados de médula ósea alogénica?

¿Los hemoderivados alogénicos pueden ser igual de efectivos y seguros que los autólogos? ¿Deben ser calentados para inactivar el complemento?

¿Las muestras de sangre deben ser cribadas en busca de marcadores inflamatorios? Y en tal caso, ¿cuáles son los niveles de corte?

¿Debemos medir en las muestras que aplicamos los niveles de factores de crecimiento para valorar su eficacia en función de dichos niveles, y no en función de la concentración del hemoderivado en concreto? En tal caso, ¿cuáles son los factores de crecimiento que mejor mostrarían la previsible eficacia de ese hemoderivado en concreto y en cada patología en particular?

Y, por supuesto, un sinfín de preguntas sobre cómo combinarlos con otras sustancias que aumenten la biodisponibilidad corneal, o con dispositivos de liberación ralentizada que logren una presencia sostenida del producto terapéutico en la superficie ocular.

III. DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO DE LA ALBÚMINA

La albúmina es una proteína plasmática, producida *in vivo* por el hígado, cuya concentración normal en la sangre humana oscila entre 3,5-5,0 g/dl, siendo el 55% del total de las proteínas plasmáticas.

Su función más importante es el mantenimiento de la presión oncótica necesaria para la distribución correcta de los líquidos corporales entre el compartimento intravascular y el extravascular, localizado entre los tejidos.

Además, también está descrito el efecto inmunomodulador de los niveles fisiológicos de albúmina por su capacidad de transportar sustancias bactericidas (Ferrer et al., 2018) y por su capacidad de aumentar el crecimiento *in vitro* de linfocitos T y B (en ratón) cuanto mayor cantidad de albúmina haya en el medio (Spieker-Polet et al., 1979).

Es conocida su capacidad de transporte de hormonas, medicamentos, etc. (Ferrer et al., 2018). En concreto, la albúmina sérica humana tiene una gran capacidad de unirse a ligandos, por lo que su farmacocinética hace de ella que pueda ser usada como una alternativa terapéutica (Esmaeilzadeh et al., 2016). De hecho, recientemente se está usando como un transportador versátil de agentes contra la diabetes, el cáncer y enfermedades infecciosas (Ishima & Maruyama, 2016).

Además, es conocida la capacidad de la Albúmina al 10% de cerrar erosiones corneales epiteliales de conejo significativamente más rápido que el ácido hialurónico y de mejorar tinciones en el síndrome de ojo seco (Shimmura et al., 2003).

Por otro lado, como hemos demostrado en esta tesis y en la bibliografía comentada, los hemoderivados ricos en factores de crecimiento son buenos favorecedores del cierre de heridas corneales epiteliales.

Uno de los objetivos de esta tesis es probar *in vitro* si la capacidad de la Albúmina sérica humana como un componente sinérgico combinado con un hemoderivado rico en factores de crecimiento favorecen el ratio de cicatrización de las células epiteliales corneales, al mejorar los ratios de proliferación y migración. Hemos visto que tanto el 10% Albúmina como su combinación con 20% s-PRGF o 50% s-PRGF tienen las tasas de proliferación de células de la línea celular establecida HCE superiores al 20% o 50% s-PRGF en solitario, y solo comparables al 10% FBS.

Sin embargo, las tasas de reepitelización *in vitro* de las células HCE son inferiores en todos aquellos medios con 10% Albúmina, en solitario o combinada con s-PRGF

respecto a los medios con s-PRGF no combinado. Por tanto, parece que la Albúmina afecta a la capacidad de reepitelización del s-PRGF, ya que ralentiza la recuperación de las áreas denudadas *in vitro*, especialmente durante el primer día de tratamiento. La explicación a este fenómeno pudiera ser que la Albúmina no dejara unirse a los factores de crecimiento a sus receptores celulares correspondientes pero este extremo es una hipótesis por confirmar.

Por lo tanto, podemos afirmar que la albúmina humana por sí misma induce mayor proliferación de las células epiteliales, pero menor migración celular, comparado con el efecto que tiene el s-PRGF en solitario. Además la combinación de ambas no mejora la proliferación respecto a la albúmina en solitario y, sin embargo, afecta negativamente a la migración.

En estudios *in vivo* de reepitelización corneal se ha observado que la Albúmina no mejora la velocidad de cierre de la herida epitelial respecto a tratamientos con ácido hialurónico o incluso con suero salino (Shimmura et al., 2003). Estos resultados concuerdan con los que hemos obtenido en nuestros ensayos de tipo *wound healing*. A pesar de que la reepitelización corneal implique tanto proliferación como migración celular, esta última es fundamental, por lo que observamos que un tratamiento que no favorezca la migración, no será un buen reepitelizante *in vivo*.

Conclusiones

1. El método elegido para obtener un modelo animal de defecto epitelial corneal inducido es el raspado epitelial con etanol como coadyuvante, ya que provee un modelo de defecto epitelial puro sin daño estromal y sin signos de inflamación ocular.
2. El hemoderivado rico en factores de crecimiento s-PRGF promueve la proliferación y la reepitelización *in vitro* de células epiteliales corneales en cultivos primarios de conejo y en líneas celulares humanas. También ejerce un efecto quimiotáctico sobre los queratocitos del estroma corneal.
3. El s-PRGF no diluído y aplicado 4 veces al día no produce toxicidad celular, y es el único que acelera de forma significativa la reepitelización corneal inducida *in vivo* en el modelo animal de conejo, consiguiendo un epitelio corneal sano.
4. A nivel histológico, a medida que aumenta su concentración el s-PRGF provee epitelios más maduros y mejora las uniones intercelulares y con la matriz extracelular, así como el efecto barrera en el epitelio superficial de la córnea reepitelizada, siendo el efecto máximo con el s-PRGF no diluido. Igualmente, el s-PRGF no diluido produce una mayor estimulación de las células progenitoras del epitelio basal limbar y una mayor activación de los queratocitos del estroma, sin dejar secuelas de fibrosis.
5. El biopolímero adhesivo ácido hialurónico estimula la proliferación de células epiteliales y estromales corneales en mayor medida que el s-PRGF. Sin embargo, la combinación de ambos no mejora la tasa de proliferación celular, e incluso la perjudica en las células de epitelio corneal humano. El uso combinado tampoco favorece la reepitelización corneal *in vitro* ni *in vivo* en el modelo animal de conejo, observándose una mejor resolución del defecto epitelial con el s-PRGF en solitario.
6. La Albúmina sérica humana, tanto en solitario como combinada con el s-PRGF, favorece la proliferación de células de epitelio corneal humano, pero no la reepitelización corneal, interfiriendo, incluso con la actividad reepitelizante del s-PRGF.

Conclusiones

Las propiedades terapéuticas del s-PRGF se basan en su capacidad para estimular la reparación y regeneración de diferentes tejidos, gracias a los factores de crecimiento y proteínas bioactivas presentes en el mismo. El s-PRGF favorece la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales corneales y la migración de los queratocitos estromales. Además, promueve la activación limbar, la adhesión celular y el efecto de barrera corneal, favoreciendo con todo ello la regeneración corneal sin toxicidad ni fibrosis. La combinación del s-PRGF con sustancias con propiedades bioadhesivas, como el ácido hialurónico, o con otras moléculas como la albúmina, no mejora la capacidad reepitelizante corneal del mismo ni permite reducir la posología diaria.

Bibliografía

- Alcalde, I., Iñigo-Portugués, A., Carreño, N., Riestra, A. C. & Merayo-Llodes, J. M. Effects of new biomimetic regenerating agents on corneal wound healing in an experimental model of post-surgical corneal ulcers. *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* **90**, 467–74 (2015).
- Alio, J. L., Colecha, J. R., Pastor, S., Rodriguez, A. & Artola, A. Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich plasma. *Ophthalmic Res.* **39**, 124–9 (2007).
- Alio, J. L. *et al.* Use of Autologous Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Dormant Corneal Ulcers. *Ophthalmology* **114**, 1286–1293.e1 (2007).
- Andia, I. Platelet rich plasma therapies: a great potential to be harnessed. *Muscles. Ligaments Tendons J.* **4**, 1–2 (2014).
- Andia, I. & Abate, M. Knee osteoarthritis: hyaluronic acid, platelet-rich plasma or both in association? *Expert Opin. Biol. Ther.* **14**, 635–49 (2014).
- Andia, I. & Abate, M. Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regen. Med.* **8**, 645–658 (2013).
- Andia, I. & Abate, M. Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther* **15**, 987–99 (2015)
- Andrés-Guerrero, V. *et al.* Comparison of the In Vitro Tolerance and In Vivo Efficacy of Traditional Timolol Maleate Eye Drops versus New Formulations with Bioadhesive Polymers. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **52**, 3548 (2011).
- Anitua, E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **14**, 529–35 (1999).
- Anitua, E., Sanchez, M., De la Fuente, M., Zalduendo, M. M. & Orive, G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **20**, 1657–65 (2012).
- Anitua, E. *et al.* Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp. Eye Res.* (2015a).
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P. & Nurden, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* **91**, 4–15 (2004).
- Anitua, E. *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J. Orthop. Res.* **23**, 281–6 (2005).

Bibliografía

- Anitua, E. *et al.* New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.* **24**, 227–34 (2006).
- Anitua, E., Sánchez, M., Orive, G. & Andía, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields☆. *Biomaterials* **28**, 4551–4560 (2007).
- Anitua, E., Sánchez, M., Orive, G. & Padilla, S. A biological therapy to osteoarthritis treatment using platelet-rich plasma. *Expert Opin. Biol. Ther.* **13**, 1161–1172 (2013).
- Anitua, E., Zaldueño, M., Troya, M., Padilla, S. & Orive, G. Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One* (2015b).
- Aragona, P., Papa, V., Micali, A., Santocono, M. & Milazzo, G. Long term treatment with sodium hyaluronate-containing artificial tears reduces ocular surface damage in patients with dry eye. *Br. J. Ophthalmol.* **86**, 181–4 (2002).
- Assirelli, E. *et al.* Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **23**, 2690–703 (2015).
- Berman, M., Manseau, E., Law, M. & Aiken, D. Ulceration is correlated with degradation of fibrin and fibronectin at the corneal surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**, 1358–66 (1983).
- Bielecki, T. & Dohan Ehrenfest, D. M. Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1121–30 (2012).
- Bielecki, T., Dohan Ehrenfest, D. M., Everts, P. A. & Wiczowski, A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1153–62 (2012).
- Bisla, K. & Tanelian, D. L. Concentration-dependent effects of lidocaine on corneal epithelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 3029–33 (1992).
- Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet α -granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.* **23**, 177–189 (2009).
- Blanco-Mezquita, T. *et al.* Nerve Growth Factor Promotes Corneal Epithelial Migration by Enhancing Expression of Matrix Metalloprotease-9. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **54**, 3880 (2013).
- Bongiovi F, Di Prima G, Palumbo FS, Licciardi M, Pitarresi G, G. G. Hyaluronic Acid-Based Micelles as Ocular Platform to Modulate the Loading, Release, and Corneal Permeation of Corticosteroids. *Macromol Biosci* **17**, (2017).

- Bonini, S. *et al.* Phase 2 Randomized, Double-Masked, Vehicle-Controlled Trial of Recombinant Human Nerve Growth Factor for Neurotrophic Keratitis. *Ophthalmology* (2018).
- Brignole, F., Pisella, P. J., Dupas, B., Baeyens, V. & Baudouin, C. Efficacy and safety of 0.18% sodium hyaluronate in patients with moderate dry eye syndrome and superficial keratitis. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* (2005).
- Buck, R. C. Cell migration in repair of mouse corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **18**, 767–84 (1979).
- Calienzo R, Curcio C, Lanzini M, Nubile M, M. L. In vivo and ex vivo evaluation of cell-cell interactions, adhesion and migration in ocular surface of patients undergone excimer laser refractive surgery after topical therapy with different lubricant eyedrops. *Int Ophthalmol* **4**, (2017).
- Calonge, M. The treatment of dry eye. *Surv. Ophthalmol.* **45 Suppl 2**, S227-39 (2001).
- Carmona, J. U. *et al.* In vitro effects of platelet-rich gel supernatants on histology and chondrocyte apoptosis scores, hyaluronan release and gene expression of equine cartilage explants challenged with lipopolysaccharide. *BMC Vet. Res.* **12**, 135 (2016).
- Cervelli, V. *et al.* Use of platelet-rich plasma and hyaluronic acid in the loss of substance with bone exposure. *Adv. Skin Wound Care* **24**, 176–81 (2011).
- Chen, W.-H. *et al.* Synergistic anabolic actions of hyaluronic acid and platelet-rich plasma on cartilage regeneration in osteoarthritis therapy. *Biomaterials* **35**, 9599–607 (2014).
- Choi, K. Y. *et al.* Preparation and characterization of hyaluronic acid-based hydrogel nanoparticles. *J. Phys. Chem. Solids* **69**, 1591–1595 (2008).
- Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, B. T. Microbicidal properties of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma/Fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives. *J Biol Regul Homeost Agents.* **26**, 43S–52S (2012).
- Cintron, C., Hassinger, L. C., Kublin, C. L. & Cannon, D. J. Biochemical and ultrastructural changes in collagen during corneal wound healing. *J. Ultrastruct. Res.* **65**, 13–22 (1978).
- Ciolino, J. B. *et al.* Latanoprost-Eluting Contact Lenses in Glaucomatous Monkeys.. *Ophthalmology* **123**, 2085-92 (2016).
- Cook, G. A. *et al.* Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis *mansoni* express an authentic substance P (NK-1) receptor. *J. Immunol.* **152**, 1830–5 (1994).

Bibliografía

- Craig, J. P. *et al.* TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocular Surface* **15**, 276-283 (2017).
- De Campos, A. M., Sánchez, A. & Alonso, M. J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* **224**, 159–68 (2001).
- De Donatis, A., *et al.* Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J Biol Chem* **283**: 19948-56 (2008).
- Debbasch C, De La Salle SB, Brignole F, Rat P, Warnet JM, B. C. Cytoprotective effects of hyaluronic acid and Carbomer 934P in ocular surface epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 3409–15 (2002).
- Deng, S. X. *et al.* Characterization of limbal stem cell deficiency by in vivo laser scanning confocal microscopy: a microstructural approach. *Arch. Ophthalmol* **130**, 440–5 (2012).
- Dohan Ehrenfest, D. M. *et al.* Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles. Ligaments Tendons J.* **4**, 3–9 (2014).
- Dohan Ehrenfest, D. M. *et al.* Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1145–52 (2012).
- Dohan Ehrenfest, D. M. *et al.* In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1131–7 (2012).
- Dohan Ehrenfest, D. M., de Peppo, G. M., Doglioli, P. & Sammartino, G. Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors* **27**, 63–9 (2009).
- Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L. & Albrektsson, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* **27**, 158–67 (2009).
- Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto N.R., Pereda A., *et al.* The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* **29**, 171-184 (2018).

- Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T. & Lowe, J. Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology* **120**, 1778-85 (2013).
- Esmaeilzadeh S, Valizadeh H, Z.-M. P. The effects of pH, temperature and protein concentration on the in vitro binding of flutamide to human serum albumin. *Pharm Dev Technol.* **22**, 982–991 (2017).
- Esposito, A. *et al.* Decay accelerating factor is essential for successful corneal engraftment. *Am. J. Transplant.* **10**, 527–34 (2010).
- Etxebarria, J. *et al.* Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol.* **95**, e693–e705 (2017).
- Everts, P. A. M. *et al.* Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J. Extra. Corpor. Technol.* **38**, 174–87 (2006).
- Fernández-Delgado N, Hernández-Ramírez P, F.-B. M. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. *Espectro Func. las plaquetas la Hemost. a la Med. Regen.* **28**, 200–216 (2012).
- Ferrer, R. *et al.* Non-oncotic properties of albumin. A multidisciplinary vision about the implications for critically ill patients. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **11**, 125–137 (2018).
- Fini, M. E. & Stramer, B. M. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea* **24**, S2–S11 (2005).
- Frati, L., Daniele, S., Delogu, A. & Covelli, I. Selective binding of the epidermal growth factor and its specific effects on the epithelial cells of the cornea. *Exp. Eye Res.* **14**, 135–41 (1972).
- Freire, V., Andollo, N., Etxebarria, J., Durán, J. A. & Morales, M.-C. In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **53**, 5571 (2012).
- Freire, V., Andollo, N., Etxebarria, J., Hernáez-Moya, R., Durán, J.A. & Morales, M.C. (2014): Corneal wound healing promoted by three blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea* **33**:614-20 (2014).
- Frojmovic, M. M. & Milton, J. G. Human platelet size, shape, and related functions in health and disease. *Physiol. Rev.* **62**, 185–261 (1982).
- García, A. *et al.* Extensive analysis of the human platelet proteome by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 656–668 (2004).

Bibliografia

- George, J. N. Platelets. *Lancet* **355**, 1531–1539 (2000).
- Gesteira, T. F. *et al.* Hyaluronan Rich Microenvironment in the Limbal Stem Cell Niche Regulates Limbal Stem Cell Differentiation. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **58**, 4407–4421 (2017).
- Giusti *et al.* Leukocyte depletion does not affect the in vitro healing ability of platelet rich plasma. *Exp. Ther. Med.* **15**, 4029–4038 (2018).
- Goa, K. L. & Benfield, P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* **47**, 536–66 (1994).
- Gomes JAP, Amankwah R, Powell-Richards A, D. H. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* **88**, 821–825 (2004).
- Guo R, Meng Q, Guo H, Xiao L, Yang X, Cui Y, H. Y. TGF- β 2 induces epithelial-mesenchymal transition in cultured human lens epithelial cells through activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep.* **13**, 1105–10 (2016).
- Hirakata, A., Gupta, A. G. & Proia, A. D. Effect of protein kinase C inhibitors and activators on corneal re-epithelialization in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 216–21 (1993).
- Hirata, Y., Uchihashi, M., Nakajima, H., Fujita, T. & Matsukura, S. Presence of Human Epidermal Growth Factor in Human Cerebrospinal Fluid*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **55**, 1174–1177 (1982).
- Ho-Tin-Noé, B., Goerge, T., Cifuni, S. M., Duerschmied, D. & Wagner, D. D. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res.* **68**, 6851–8 (2008).
- Ho, P. C., Davis, W. H., Elliott, J. H. & Cohen, S. Kinetics of corneal epithelial regeneration and epidermal growth factor. *Invest. Ophthalmol.* **13**, 804–9 (1974).
- Holland, E. J. & Schwartz, G. S. The evolution of epithelial transplantation for severe ocular surface disease and a proposed classification system. *Cornea* **15**, 549–56 (1996).
- Hongo, M., Itoi, M., Yamaguchi, N. & Imanishi, J. Distribution of epidermal growth factor (EGF) receptors in rabbit corneal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the changes induced by transforming growth factor-beta 1. *Exp. Eye Res.* **54**, 9–16 (1992).
- Huang, A. J. & Tseng, S. C. Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 96–105 (1991).

- Imanishi, J. *et al.* Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**, 113–29 (2000).
- Inoue M, K. C. The effect of hyaluronic acid on corneal epithelial cell proliferation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 2313–5 (1993).
- Ishima Y, M. T. Human Serum Albumin as Carrier in Drug Delivery Systems. *Yakugaku Zasshi* **136**, 39–47 (2016).
- Ivarsen, A., Laurberg, T. & Møller-Pedersen, T. Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *Br. J. Ophthalmol.* **87**, 1272–8 (2003).
- Johnson, M. E., Murphy, P. J. & Boulton, M. Carbomer and Sodium Hyaluronate Eyedrops for Moderate Dry Eye Treatment. *Optom. Vis. Sci.* **85**, 750–757 (2008).
- Kameishi, S., *et al.* Remodeling of epithelial cells and basement membranes in a corneal deficiency model with long-term follow-up. *Lab Invest* **95**: 168-79 (2015).
- Kark, L. R., Karp, J. M. & Davies, J. E. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clin. Oral Implants Res.* **17**, 321–7 (2006).
- Kenyon, K. R. & Tseng, S. C. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders. *Ophthalmology* **96**, 709-22; discussion 722–3 (1989).
- Kisucka, J. *et al.* Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 855–60 (2006).
- Klenkler, B. & Sheardown, H. Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp. Eye Res.* **79**, 677–88 (2004).
- Klinger, M. H. F. & Jelkmann, W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* **22**, 913–22 (2002).
- Koizumi, N., Inatomi, T., Suzuki, T., Sotozono, C. & Kinoshita, S. Cultivated corneal epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders. *Ophthalmology* **108**, 1569–74 (2001).
- Kolli, S. *et al.* Successful application of ex vivo expanded human autologous oral mucosal epithelium for the treatment of total bilateral limbal stem cell deficiency. *Stem Cells* **32**, 2135–46 (2014).
- Krachmer, Jay; Mannis , Mark; Holland, E. *Cornea.* (2011). 3rd edition. Ed. Elsevier. ISBN: 9780323247429

Bibliografía

- Kruse, F. E., Rohrschneider, K. & Völcker, H. E. Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* **106**, 1504–1511 (1999).
- Lambiase, A., Rama, P., Bonini, S., Caprioglio, G. & Aloe, L. Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1174–80 (1998).
- Lana, J. F. S. D. *et al.* Randomized controlled trial comparing hyaluronic acid, platelet-rich plasma and the combination of both in the treatment of mild and moderate osteoarthritis of the knee. *J. Stem Cells Regen. Med.* **12**, 69–78 (2016).
- Lauweryns, B., van den Oord, J. J., Volpes, R., Foets, B. & Missotten, L. Distribution of very late activation integrins in the human cornea. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **32**, 2079–85 (1991).
- Le, Q., Xu, J. & Deng, S. X. The diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Ocul. Surf.* **16**, 58–69 (2018).
- Li, D.-Q. & Tseng, S. C. G. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J. Cell. Physiol.* **163**, 61–79 (1995).
- Li, H., *et al.* Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS One* **8**, e64923 (2013).
- Lin, J. *et al.* Preparation and ocular pharmacokinetics of hyaluronan acid-modified mucoadhesive liposomes. *Drug Deliv.* **23**, 1–8 (2014).
- Lind, G. J. & Cavanagh, H. D. Nuclear muscarinic acetylcholine receptors in corneal cells from rabbit. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 2943–52 (1993).
- Liu, L., *et al.* Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 2438–44 (2006).
- López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Ramírez N, Raposo R, M. M. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: clinical and experimental comparative study. *Acta Ophthalmol.* **92**, e22-9 (2014).
- López-Plandolit, S., Morales, M.-C., Freire, V., Grau, A. E. & Durán, J. A. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea* **30**, 1312–7 (2011).
- López-Plandolit, S., Morales, M.-C., Freire, V., Etxebarria, J. & Durán, J. A. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea* **29**, 843–8 (2010).

- Margolis, D. J., Kantor, J., Santanna, J., Strom, B. L. & Berlin, J. A. Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* **24**, 483–8 (2001).
- Marmotti, A. *et al.* One-step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite scaffold. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* **20**, 2590–601 (2012).
- Marx, R. E. *et al.* Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **85**, 638–46 (1998).
- Matras, H. [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterr. Z. Stomatol.* **67**, 338–59 (1970).
- Matsui, T. *et al.* Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes. *Science* **243**, 800–4 (1989).
- Matsumoto, Y. *et al.* Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* **111**, 1115–20 (2004).
- May, A. E., Seizer, P. & Gawaz, M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, s5-10 (2008).
- McMorran, B. J. *et al.* Platelets kill intraerythrocytic malarial parasites and mediate survival to infection. *Science* **323**, 797–800 (2009).
- Mishima, S., Gasset, A., Klyce, S. D. & Baum, J. L. Determination of tear volume and tear flow. *Invest. Ophthalmol.* **5**, 264–76 (1966).
- Mishra, A., Harmon, K., Woodall, J. & Vieira, A. Sports medicine applications of platelet rich plasma. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **13**, 1185–95 (2012).
- Miyagi H, Thomasy SM, Russell P, M. C. The role of hepatocyte growth factor in corneal wound healing. *Exp Eye Res.* **Jan**, 49–55 (2018).
- Molina-Miñano, F., López-Jornet, P., Camacho-Alonso, F. & Vicente-Ortega, V. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int. Wound J.* **6**, 145–8 (2009).
- Møller-Pedersen, T., Cavanagh, H. D., Petroll, W. M. & Jester, J. V. Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. *Curr. Eye Res.* **17**, 736–47 (1998).
- Moojen, D. J. F. *et al.* Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J. Orthop. Res.* **26**, 404–10 (2008).

Bibliografia

- Moulin, V., Lawny, F., Barritault, D. & Caruelle, J. P. Platelet releasate treatment improves skin healing in diabetic rats through endogenous growth factor secretion. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. **44**, 961–71 (1998).
- Müller, L. J., Vrensen, G. F., Pels, L., Cardozo, B. N. & Willekens, B. Architecture of human corneal nerves. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 985–94 (1997).
- Murali, S. *et al.* Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Curr. Eye Res.* **13**, 857–62 (1994).
- Muto, J., Yamasaki, K., Taylor, K. R. & Gallo, R. L. Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS. *Mol. Immunol.* **47**, 449–56 (2009).
- Nagai, M., Sato, S., Kamoi, H. & Kamoi, K. Effects of application of platelet releasate in periodontal regeneration therapy. *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* **25**, 571–83 (2005).
- Nakamura, K., Kurosaka, D., Bissen-Miyajima, H. & Tsubota, K. Intact corneal epithelium is essential for the prevention of stromal haze after laser assisted in situ keratomileusis. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 209–13 (2001).
- Nakamura, M., Hikida, M. & Nakano, T. Concentration and molecular weight dependency of rabbit corneal epithelial wound healing on hyaluronan. *Curr. Eye Res.* **11**, 981–6 (1992).
- Nakamura, M. *et al.* Synergistic Effect of Substance P with Epidermal Growth Factor on Epithelial Migration in Rabbit Cornea. *Exp. Eye Res.* **65**, 321–329 (1997).
- Niederhorn, J. Y. Immune mechanisms of corneal allograft rejection. *Current Eye Research* **32**, 1005-16 (2007).
- Nieto-Miguel, T. *et al.* In vitro simulation of corneal epithelium microenvironment induces a corneal epithelial-like cell phenotype from human adipose tissue mesenchymal stem cells. *Curr. Eye Res.* **38**, 933–44 (2013).
- Nishida, T., Nakamura, M., Mishima, H. & Otori, T. Differential modes of action of fibronectin and epidermal growth factor on rabbit corneal epithelial migration. *J. Cell. Physiol.* **145**, 549–54 (1990).
- Nishida, T., Nakamura, M., Murakami, J., Mishima, H. & Otori, T. Epidermal growth factor stimulates corneal epithelial cell attachment to fibronectin through a fibronectin receptor system. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 2464–9 (1992).
- Nishida, T. *et al.* Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J. Cell. Physiol.* **169**, 159–66 (1996).

- Nishida, T. *et al.* Persistent epithelial defects due to neurotrophic keratopathy treated with a substance P-derived peptide and insulin-like growth factor 1. *Jpn. J. Ophthalmol.* **51**, 442-7 (2007).
- Nurden, A. T. The biology of the platelet with special reference to inflammation, wound healing and immunity. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. **23**, 726–751 (2018).
- Nurden, A. T., Nurden, P., Sanchez, M., Andia, I. & Anitua, E. Platelets and wound healing. *Front. Biosci.* **13**, 3532–48 (2008).
- Ohashi, Y. *et al.* Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **30**, 1879–82 (1989).
- Ophthalmology, American Academy. *Fundamentos y Principios de Oftalmología. Módulo 1. Anatomía* (2018). Ed. Idemm Farma, SL España. ISBN 978-84-946274-4-6
- Pallua, N., Wolter, T. & Markowicz, M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns* **36**, 4–8 (2010).
- Panda, A., Pushker, N. & Bageshwar, L. M. Lateral tarsorrhaphy: is it preferable to patching? *Cornea* **18**, 299–301 (1999).
- Paques, M. *et al.* Effect of autologous platelet concentrate in surgery for idiopathic macular hole: results of a multicenter, double-masked, randomized trial. Platelets in Macular Hole Surgery Group. *Ophthalmology* **106**, 932–8 (1999).
- Park, K.S., *et al.* The side population cells in the rabbit limbus sensitively increased in response to the central cornea wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47(3)**:892-900 (2006).
- Pasquale, L. R., Dorman-Pease, M. E., Luty, G. A., Quigley, H. A. & Jampel, H. D. Immunolocalization of TGF-beta 1, TGF-beta 2, and TGF-beta 3 in the anterior segment of the human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 23–30 (1993).
- Pastor, J. C. & Calonge, M. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea* **11**, 311–4 (1992).
- Pellegrini, G. *et al.* Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet (London, England)* **349**, 990–3 (1997).
- Penn, J. W., Grobbelaar, A. O. & Rolfe, K. J. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int. J. Burns Trauma* **2**, 18–28 (2012).
- Pinto, N. R. *et al.* Leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) as a regenerative medicine strategy for the treatment of refractory leg ulcers: a prospective cohort study. *Platelets* **29**, 468–475 (2017)..

Bibliografia

- Poli, M. *et al.* Keratin 13 immunostaining in corneal impression cytology for the diagnosis of limbal stem cell deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 9411–5 (2011).
- Poon, A. C., Geerling, G., Dart, J. K., Fraenkel, G. E. & Daniels, J. T. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br. J. Ophthalmol.* **85**, 1188–97 (2001).
- Prasadam, I., Mao, X., Shi, W., Crawford, R. & Xiao, Y. Combination of MEK-ERK inhibitor and hyaluronic acid has a synergistic effect on anti-hypertrophic and pro-chondrogenic activities in osteoarthritis treatment. *J. Mol. Med. (Berl)*. **91**, 369–80 (2013).
- Prause, J. U. Treatment of keratoconjunctivitis sicca with Lacrisert. *Scand. J. Rheumatol. Suppl.* **61**, 261–3 (1986).
- Rieck, P. *et al.* Recombinant human basic fibroblast growth factor (Rh-bFGF) in three different wound models in rabbits: corneal wound healing effect and pharmacology. *Exp. Eye Res.* **54**, 987–98 (1992).
- Rohaina, C. M. *et al.* Reconstruction of limbal stem cell deficient corneal surface with induced human bone marrow mesenchymal stem cells on amniotic membrane. *Transl. Res.* **163**, 200–10 (2014).
- Rolando, M. & Zierhut, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Surv. Ophthalmol.* **45 Suppl 2**, S203-10 (2001).
- Rosenthal, A. R., Egbert, P. R., Harbury, C., Hopkins, J. L. & Rubenstein, E. Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **207**, 111–5 (1978).
- Rosenthal, P., Cotter, J. M. & Baum, J. Treatment of persistent corneal epithelial defect with extended wear of a fluid-ventilated gas-permeable scleral contact lens. *Am. J. Ophthalmol.* **130**, 33–41 (2000).
- Rózsa, A. J. & Beuerman, R. W. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* **14**, 105–20 (1982).
- Saghizadeh, M. *et al.* Altered Expression of Growth Factors and Cytokines in Keratoconus, Bullous Keratopathy and Diabetic Human Corneas. *Exp. Eye Res.* **73**, 179–189 (2001).
- Saika, S. TGF-beta signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea* **23**, S25-30 (2004).
- Saika, S. *et al.* Response of lens epithelial cells to injury: role of lumican in epithelial-mesenchymal transition. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 2094–102 (2003).

- Sandri, G. *et al.* Platelet lysate formulations based on mucoadhesive polymers for the treatment of corneal lesions. *J. Pharm. Pharmacol.* **63**, 189–98 (2011).
- Scheibner, K. A. *et al.* Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* **177**, 1272–81 (2006).
- Schermer, A., Galvin, S. & Sun, T. T. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* **103**, 49–62 (1986).
- Schlötzer-Schrehardt, U. *et al.* Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp. Eye Res.* **85**, 845–860 (2007).
- Schlötzer-Schrehardt, U. & Kruse, F. E. Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp. Eye Res.* **81**, 247–264 (2005).
- Schultz, G., Chegini, N., Grant, M., Khaw, P. & MacKay, S. Effects of growth factors on corneal wound healing. *Acta Ophthalmol. Suppl. (Oxf.)* **202**, 60–6 (1992).
- Schultz, G., Rotatori, D. S. & Clark, W. EGF and TGF- α in wound healing and repair. *J. Cell. Biochem.* **45**, 346–52 (1991).
- Secker, G.A. & Daniels, J.T. Limbal epithelial stem cells of the cornea. In: StemBook, Ed. The Stem Cell Research Community, p 1-18 (2009).
- Seitz, B., Gruterich, M., Cursiefen, C. & Kruse, F. E. Konservative und chirurgische Therapie der neurotrophen Keratopathie. *Der Ophthalmol.* **102**, 15–26 (2005).
- Shahriari, H.A., *et al.* Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea* **27**:1148-50 (2008).
- Shimazaki, J., Yang, H. Y. & Tsubota, K. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in patients with chemical and thermal burns. *Ophthalmology* **104**, 2068–76 (1997).
- Shimmura S, Ueno R, Matsumoto Y, Goto E, Higuchi A, Shimazaki J, T. K. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye. *Br J Ophthalmol.* **87**, 1279–83 (2003).
- Smyth, N. A. *et al.* Platelet-Rich Plasma and Hyaluronic Acid Are Not Synergistic When Used as Biological Adjuncts with Autologous Osteochondral Transplantation. *Cartilage* **1**, 1947603517690022 (2017).
- Snibson, G. R. *et al.* Ocular surface residence times of artificial tear solutions. *Cornea* **11**, 288–93 (1992).

Bibliografia

- Spieker-Polet H, Cruise SA, P. H. The effect of serum albumin and the effect of cell concentration on the in vitro growth of mouse and rat lymphocytes. *Cell Immunol.* **44**, 144–56 (1979).
- Steven, P. *et al.* Semifluorinated Alkane Eye Drops for Treatment of Dry Eye Disease—A Prospective, Multicenter Noninterventional Study. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **31**, 498-503 (2015).
- Stramer, B. M. & Fini, M. E. Uncoupling keratocyte loss of corneal crystallin from markers of fibrotic repair. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 4010–5 (2004).
- Stramer, B. M., Zieske, J. D., Jung, J.-C., Austin, J. S. & Fini, M. E. Molecular mechanisms controlling the fibrotic repair phenotype in cornea: implications for surgical outcomes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4237–46 (2003).
- Streilein, J. W., Ksander, B. R. & Taylor, A. W. Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J. Immunol.* **158**, 3557–60 (1997).
- Strissel, K. J., Rinehart, W. B. & Fini, M. E. A corneal epithelial inhibitor of stromal cell collagenase synthesis identified as TGF-beta 2. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 151–62 (1995).
- Tervo, T. *et al.* Tear Hepatocyte Growth Factor (HGF) Availability Increases Markedly after Excimer Laser Surface Ablation. *Exp. Eye Res.* **64**, 501–504 (1997).
- Tobita, M., Tajima, S., Mizuno, H. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: stem cell transplantation methods that enhance stemness. *Stem Cell Res Ther* **5**, 215 (2015).
- Tripathi, B. J., Kwait, P. S. & Tripathi, R. C. Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea* **9**, 2–9 (1990).
- Tseng, S. C. & Tsubota, K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am. J. Ophthalmol.* **124**, 825–35 (1997).
- Tsubota, K. *et al.* Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* **83**, 390–5 (1999).
- Tsubota, K., Goto, E., Shimmura, S. & Shimazaki, J. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* **106**, 1984–9 (1999).
- Turgeon, P. W., Nauheim, R. C., Roat, M. I., Stopak, S. S. & Thoft, R. A. Indications for keratoepithelioplasty. *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)* **108**, 233–6 (1990).

- Vadalà, G. *et al.* Clinically relevant hydrogel-based on hyaluronic acid and platelet rich plasma as a carrier for mesenchymal stem cells: Rheological and biological characterization. *J. Orthop. Res.* **35**, 2109–2116 (2017).
- Vajpayee, R. B. *et al.* Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br. J. Ophthalmol.* **87**, 1312–6 (2003).
- Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnár J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Wichmann B, Molnár B, T. Z. Increase of α -SMA(+) and CK (+) cells as an early sign of epithelial-mesenchymal transition during colorectal carcinogenesis. *Pathol Oncol Res.* **18**, 371–6 (2012).
- Van Setten, G. B. *et al.* Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **227**, 184–7 (1989).
- Versura, P., Profazio, V. & Campos, E. C. Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic tests for dry eye diseases. *Curr. Eye Res.* **35**, 553–64 (2010).
- Vesaluoma, M., Teppo, A.M., Grönhagen-Riska, C. & Tervo, T. Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in tear fluid: a potential modulator of corneal wound healing following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* **16**: 825-31 (1997)
- Voigt J, D. V. Hyaluronic acid derivatives and their healing effect on burns, epithelial surgical wounds, and chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Wound Repair Regen.* **20**, 317–31 (2012).
- Waddell, D. D. Viscosupplementation with hyaluronans for osteoarthritis of the knee: clinical efficacy and economic implications. *Drugs Aging* **24**, 629–42 (2007).
- Wang, X. *et al.* Effects of keratinocyte growth factor-2 on corneal epithelial wound healing in a rabbit model of carbon dioxide laser injury. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 971-6 (2010).
- Weibrich, G. *et al.* Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* **34**: 665–71. (2004).
- Weiss, L. *Cell and tissue biology.* (1988). 6th edition. Ed. Lippincot Williams and Wilkins, ISBN 978-0806721767
- Welge-Lüssen, U., May, C. A., Neubauer, A. S. & Priglinger, S. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **12**, 94–9 (2001).
- Werner Müller, W. *Bioquímica. Fundamentos para Medicina y Ciencias de la Vida.* (2008). Ed Reverté. ISBN 9788429173932
- West-Mays, J. A., Strissel, K. J., Sadow, P. M. & Fini, M. E. Competence for collagenase gene expression by tissue fibroblasts requires activation of an

Bibliografia

- interleukin 1 alpha autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6768–72 (1995).
- Wilson, S. E. & Kim, W. J. Keratocyte apoptosis: implications on corneal wound healing, tissue organization, and disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 220–6 (1998).
- Wilson, S. E., Liu, J. J. & Mohan, R. R. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* **18**, 293–309 (1999).
- Wilson, S. E. *et al.* The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 625–37 (2001).
- Wilson, S.E. Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res* **99**: 78-88. (2012)
- Wu, Z.. *et al.* Reconstruction of auto-tissue-engineered lamellar cornea by dynamic culture for transplantation: a rabbit model. *PLoS One* **9**: e93012. (2014)
- Yamada, C., King, K. E. & Ness, P. M. Autologous serum eyedrops: literature review and implications for transfusion medicine specialists. *Transfusion* **48**, 1245–1255 (2008).
- Yamada, N. *et al.* Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from substance P and insulin-like growth factor-1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br. J. Ophthalmol.* **92**, 896–900 (2008).
- Yanai, R. *et al.* Potential new modes of treatment of neurotrophic keratopathy. *Cornea* **34 Suppl 11**, S121-7 (2015).
- Yenice, İ. *et al.* Hyaluronic acid coated poly-ε-caprolactone nanospheres deliver high concentrations of cyclosporine A into the cornea. *Exp. Eye Res.* **87**, 162–167 (2008).
- Yoshida, S. *et al.* Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 4780-6 (2006).
- Zavan, B. *et al.* Hyaluronic acid induces activation of the κ-opioid receptor. *PLoS One* **8**, e55510 (2013).
- Zeng, W. *et al.* Hyaluronic acid-coated niosomes facilitate tacrolimus ocular delivery: Mucoadhesion, precorneal retention, aqueous humor pharmacokinetics, and transcorneal permeability. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **1**, 28–35 (2016).

Zhang, J., Lu, S. H., Liu, Y. J., Feng, Y. & Han, Z. C. Platelet factor 4 enhances the adhesion of normal and leukemic hematopoietic stem/progenitor cells to endothelial cells. *Leuk. Res.* **28**, 631–8 (2004).

Zheng, D. *et al.* Downregulation of transforming growth factor- β type II receptor prohibit epithelial-to-mesenchymal transition in lens epithelium. *Mol. Vis.* **18**, 1238-46 (2012).

Zieske, J. D., Guimarães, S. R. & Hutcheon, A. E. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp. Eye Res.* **72**, 33–9 (2001).

Bibliografia

Anexo

Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness

Jaime Etxebarria,^{1,2} Sara Sanz-Lázaro,¹ Raquel Hernáez-Moya,¹ Vanesa Freire,^{1,3} Juan A. Durán,^{3,4} María-Celia Morales¹ and Noelia Andollo¹

¹Department of Cell Biology and Histology, School of Medicine and Nursing, BioCruces Health Research Institute, University of the Basque Country, Begiker, Leioa, Spain

²Department of Ophthalmology, BioCruces Health Research Institute, University Hospital of Cruces, Begiker, Barakaldo, Spain

³R & D Department, Instituto Clínico-Quirúrgico de Oftalmología, Bilbao, Spain

⁴Department of Ophthalmology, School of Medicine and Nursing, BioCruces Health Research Institute, University of the Basque Country, Begiker, Leioa, Spain

ABSTRACT.

Purpose: To evaluate the regenerating potential and the mechanisms through which the autologous serum derived from plasma rich in growth factors (s-PRGF) favours corneal wound healing *in vitro* and *in vivo*.

Methods: We compared the effect of various concentrations of s-PRGF versus fetal bovine serum (FBS) and control treatment in rabbit primary corneal epithelial and stromal cells and wounded rabbit corneas. Cell proliferation was measured using an enzymatic colorimetric assay. *In vitro* and *in vivo* wound-healing progression was assessed by image-analysis software. Migration and invasion were evaluated using transfilter assays. Histological structure was analysed in stained sections. Protein expression was evaluated by immunohistochemistry.

Results: s-PRGF promoted the robust proliferation of epithelial cultures at any concentration, similar to FBS. Likewise, s-PRGF and FBS produced similar re-epithelialization rates in *in vitro* wound-healing assays. *In vivo*, s-PRGF treatment accelerated corneal wound healing in comparison with control treatment. This difference was significant only for 100% s-PRGF treatment in our healthy rabbit model. Histological analysis confirmed normal epithelialization in all cases. Immunohistochemistry showed a higher expression of cytokeratins 3/76 and 15, *zonula occludens-1* and alpha-smooth muscle actin proteins as a function of s-PRGF concentration. Notably, keratocyte density in the anterior third of the stroma increased with increase in s-PRGF concentration, suggesting an *in vivo* chemotactic effect of s-PRGF on keratocytes that was further confirmed *in vitro*.

Conclusion: s-PRGF promotes proliferation and migration and influences limbal stemness, adhesion and fibrosis during corneal healing.

Key words: cornea regeneration – serum eye drops – s-PRGF – wound healing

Acta Ophthalmol.

© 2017 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation. Published by John Wiley & Sons Ltd

doi: 10.1111/aos.13371

Introduction

The health of the ocular surface depends on the integrity of the corneal epithelium. To maintain a healthy corneal epithelium, there must be a balance among limbal stem cell function, tear quantity and quality, eyelid anatomy and function and corneal sensitivity (Tseng & Tsubota 1997). Altering any of these elements can lead to a corneal epithelial defect. In general, the wound-healing process is a complex mechanism characterized by haemostasis (not applicable in cornea), inflammation, cell proliferation, migration and differentiation. In cornea, tear film, aqueous humour and limbal vessels provide the factors needed for tissue regeneration (Klenkler et al. 2007). In addition, the corneal epithelium by itself is a rich source of cytokines with the potential to modulate wound repair (Wilson et al. 2001). In cases of persistent corneal epithelium defects that fail to respond to standard treatments such as artificial tears and antibiotic drops, various methods to improve ocular surface tropism have been described: lateral tarsorrhaphy (Panda et al. 1999), bandage contact lenses (Rosenthal et al. 2000), punctal plugs (Seitz et al. 2005) and amniotic membrane transplantation (Kruse et al. 1999). Treatments based

on the application of specific molecules have also been evaluated: nerve growth factor (NGF; Lambiase et al. 1998), epidermal growth factor (EGF; Pastor & Calonge 1992), fibroblast growth factor (FGF; Tripathi et al. 1990), platelet-derived growth factor (PDGF; Murali et al. 1994) and substance P and insulin-like growth factor (IGF-1; Yamada et al. 2008). However, the need to target various signalling pathways of wound healing demands a balanced combination of mediators. For that reason, in the treatment of injured tissue, it may be supposed that a mixture of repairing factors would be more effective than a single purified molecule (Slater et al. 1995).

Since the late 1990s, the use of platelets as vehicles for the delivery of a balanced pool of healing factors has emerged as a fashionable therapy. Platelet-concentrated derivatives are generically called platelet-rich plasmas (PRPs). They provide *supra*-physiological concentrations of signalling cytokines and growth factors at the site of injury that may improve repair by various different mechanisms including the regulation of inflammation, angiogenesis, and synthesis and remodelling of new tissue (Andia & Abate 2013). Some of these signalling molecules included in PRPs are epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), tumour necrosis factor- α (TNF- α), neural growth factor (NGF). In fact, growth factors are a small subset of the thousands of other different molecules that can be found in PRP, such as cytokines, chemokines, adhesion proteins and enzymes, being the synergetic interaction among all of them the key of its beneficial effect (Klenkler & Sheardown 2004; Andia & Abate 2013; Andia & Maffulli 2013). PRPs have already been reported to facilitate wound healing for skin defects, and burns including radio-therapy burns (Molina-Miñano et al. 2009; Pallua et al. 2010), as well as for cosmetic, plastic, dental, orthopaedic and cardiothoracic surgery (Marx et al. 1998; Everts et al. 2006). Drops of blood derivatives have also been described as a treatment in ophthalmology for

different ocular surface disorders, including persistent epithelial defects (Anitua et al. 2015a). These derivatives include various formulations, such as autologous serum (Tsubota et al. 1999a,b), serum from fetal umbilical cord (Vajpayee et al. 2003), plasma rich in platelets (Alió et al. 2007a) and serum derived from plasma rich in growth factors (s-PRGF; López-Plandolit et al. 2010). In addition, these preparations have been used as an alternative treatment for severe dry eye syndrome (Tsubota et al. 1999a,b; Alió et al. 2007b; López-Plandolit et al. 2011), the epithelialization after LASIK (Javaloy et al. 2013) and as an alternative to close corneal perforations by using it as a solid PRP (Alió et al. 2013).

One of these PRPs, PRGF, was originally developed to speed the healing of traumatic and maxillary defects (Anitua 1999). Recently, our group has introduced its use in ophthalmology for the treatment of persistent epithelial defects and dry eye syndrome (López-Plandolit et al. 2010, 2011). PRGF has a moderate platelet concentration, and this has been associated with optimal biological benefits (Anitua et al. 2015a). Additionally, its leucocyte content has been eliminated to avoid the pro-inflammatory effects of proteases and acid hydrolases contained in white blood cells (Anitua et al. 2015b). Hence, this type of PRP can be classified as pure platelet-rich plasma or P-PRP according to the classification proposed by Dohan Ehrenfest et al. (2009). In administering PRGF for the first time as eye drops in the ophthalmological context, our group slightly modified the method for manufacturing this derivative (compared to the original protocol), by using the whole volume over the buffy coat and prolonging the coagulation time until complete clot retraction was achieved. Thus, we obtained serum derived from plasma rich in growth factors (s-PRGF; López-Plandolit et al. 2010).

In this study, we explored the effect of different concentrations of s-PRGF on the *in vitro* proliferation and re-epithelialization processes in rabbit primary corneal epithelial (RPCE) cultures, as well as in the *in vivo* corneal re-epithelialization in a rabbit animal model. A novelty of this work lies in that we have analysed the effect of

s-PRGF compared to that of fetal bovine serum (FBS) on the transfilter migration and invasion ability of primary cultures of rabbit corneal stromal cells (keratocytes) and we have investigated *in vivo* the chemotactic effect of s-PRGF on keratocytes. To achieve this, we first optimized the method for obtaining s-PRGF from rabbit blood, this being different in various respects to that which we first described for human blood for use in ophthalmology (López-Plandolit et al. 2010). To our knowledge, this is the first study comparing in parallel various culture media containing different concentrations of s-PRGF, with each other and with 10% FBS, the latter being the usual supplement of culture medium for human cell culture accepted by scientific community in spite of his xenogeneic origin. The aim of this comparison was to assess the regenerative potential of s-PRGF, using the known capability of xenogeneic FBS to stimulate the growth of cells and tissues as a reference. Regarding *in vivo* studies, some authors have used human blood derivatives in animal corneal defects (Anitua et al. 2013), demonstrating their safety, but this xenogeneic use does not guarantee the effectiveness of the product. In this study, we have employed rabbit serum to assess rabbit corneal wound healing, in an autologous manner, which demonstrates the efficacy of this blood derivative in the rabbit animal model. In addition, most articles on ophthalmic clinical use of s-PRGF report descriptive non-controlled studies. This study provides data concerning the effect of autologous s-PRGF on corneal wound healing under controlled conditions in an animal model (rabbit). The findings obtained could justify the implementation of further controlled clinical trials. Finally, this work suggests a global effect of s-PRGF in corneal regeneration, because it shows that s-PRGF promotes re-epithelialization in the wounded area while influences the behaviour of stem cells in the limbal area.

Material and Methods

Ethics statement

This project was performed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and

Vision Research. The procedures and experimental designs were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of the Basque Country UPV/EHU (Permit number: CEBA/49-P03-02/2010/ANDOLLO VICTORIANO) and fulfil European and national laws.

Isolation and expansion of rabbit primary corneal epithelial cultures

To obtain RPCE cultures, the central corneal buttons were removed from eyes of three 2.0–2.5 kg female New Zealand rabbits, keeping the limbal zone intact, and processed as previously described (Freire et al. 2014). The cells obtained were cultured at 37°C under 5% CO₂ in DMEM: Ham's F12 mix with 2 mM L-glutamine (Lonza, Verviers, Belgium) and 1% penicillin–streptomycin, together with 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza). This culture medium was also supplemented with: 10 ng/ml EGF (Sigma, St. Louis, MO, USA), 5 µg/ml insulin (Sigma) and 0.1 µg/ml cholera toxin (Gentaur Molecular Products, Brussels, Belgium).

Isolation and expansion of rabbit primary keratocytes

Primary cultures of keratocytes were obtained from the stroma of the previously removed New Zealand rabbit corneas. Specifically, the corneal stroma was obtained by treatment of the whole cornea with 25 UI/ml dispase II for 16 hr at 4°C followed by smooth manual scrapping off of the epithelium. Then, the stroma was digested with 1 mg/ml type I collagenase (Sigma) for 1.5 hr at 37°C. The cells obtained were cultured at 37°C under 5% CO₂ in keratinocyte-SFM (low-calcium and serum-free) culture medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), to avoid the differentiation of cells into fibroblasts or myofibroblasts (Kawakita et al. 2006).

s-PRGF preparation

To obtain s-PRGF, 5–10 ml of blood was collected by puncture of the central artery of the rabbit ear in tubes with 3.8% sodium citrate as anticoagulant (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Blood was centrifuged for 8 min at 650 g. Following collection of the

complete supernatant fraction above the buffy coat, clot formation was induced by adding calcium chloride. After incubation of the samples for 1 hr at 36°C, the fibrin clot was retracted and removed; the remaining fraction was the rabbit s-PRGF (Freire et al. 2014).

For *in vitro* assays, the complement factors of s-PRGF were inactivated at 56°C for 30 min to avoid inflammatory reactions. Subsequently, we pooled samples from several individuals to obtain representative blood preparations that provided reproducible results and minimized interindividual variability. For *in vivo* assays, we used autologous preparations. All preparations were stored at –20°C until use.

Cell proliferation

The effect of s-PRGF on the proliferation of RPCE cultures was measured at several dilutions (10, 20 and 50%) and time-points (24, 48 and 72 hr). Proliferation was described in terms of proliferation rate ± SD of viable cells with respect to viable cells just before exposure to blood derivatives ($t = 0$ hr).

This was measured using a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide or MTT assay (Sigma-Aldrich), as previously described (Freire et al. 2012). Optical densities at 540 nm were determined using a microplate reader (ELx800 Microplate Reader, BioTek® Instruments, Winooski, VT, USA). All experiments were performed in quadruplicate and repeated in three biological replicates of RPCE cultures ($n = 12$).

In vitro wound-healing assays

These experiments were performed as previously described (Freire et al. 2014). RPCE cultures were maintained with culture medium containing supplements and 10% FBS ($n = 28$), 50% s-PRGF ($n = 28$) or 1% BSA ($n = 15$) as a control. Areas from which cells had been scraped away were photographed every 12 hr with an Eclipse TS 100 phase-contrast microscope (Nikon, Tokyo, Japan), and images were acquired with ProgRes CapturePro 2.6 software (Jenoptik, Jena, Germany). The size of the denuded areas was quantified using ImageJ

software (developed by Wayne Rasband at the Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). The closure rate was described in terms of the mean remaining denuded area ± standard deviation (SD) in mm². All experiments were performed at least in quintuplicate (five wells) and repeated in three biological replicates of RPCE cultures.

In vitro migration and invasion assays

We performed transfilter migration and Matrigel transfilter invasion assays to analyse the capability of s-PRGF to induce chemotaxis or invasion in rabbit primary stromal keratocytes.

For migration experiments, we used 24 transwell plates with 8-µm membrane pore size (BD Biosciences). We seeded 3×10^5 cells in every insert and repeated the following treatments in triplicate and repeated in three biological replicates: (i) DMEM:F12 with 1% BSA as control medium in the lower well and DMEM:F12 with 1% FBS in the upper well ($n = 9$); (ii) DMEM:F12 with 10% FBS in the lower well and DMEM:F12 with 1% FBS in the upper well ($n = 9$); (iii) DMEM:F12 with 50% s-PRGF in the lower well and DMEM:F12 with 1% s-PRGF in the upper well ($n = 9$); and (iv) DMEM:F12 with 80% s-PRGF in the lower well and DMEM:F12 with 1% s-PRGF in the upper well ($n = 9$). For invasion experiments, we reproduced the same treatments, cell number and culture conditions as used for migration assays using Matrigel-coated inserts (BD Biosciences).

After incubation for 7 hr for migration and 24 h for invasion in a 37°C with 5% CO₂ atmosphere, inserts and wells were washed three times with phosphate-buffered saline. Cotton swabs were used to carefully remove cells on the upper surface of the membrane. Both wells and membranes were fixed in methanol for 10 min. Finally, they were rinsed three times with phosphate-buffered saline, being stained with 1 µg/ml DAPI in the second rinsing. Membranes and wells were photographed with an FV500 Confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Cell nuclei stained with DAPI in membranes and wells were counted using ImageJ software.

Rabbit corneal re-epithelialization assays

Fourteen adult 2.0–2.5 kg female New Zealand white rabbits were included in the study. Since the arrival of animals to our institution's facilities until they were humanly euthanized once the experimental study was finished, rabbits were under diary observation to assess their welfare. Initially, each rabbit underwent surgery in the right eye, and the left eye was then operated on 2–3 weeks after the right eye had recovered. The surgery was performed as previously described (Freire et al. 2014). Postoperatively, until the epithelial closure was complete (up to a maximum of a week), every rabbit eye was treated with a topical dexamethasone and chloramphenicol ointment (Deicol® ophthalmic ointment, Alcon laboratories, Barcelona, Spain) for anti-inflammatory and antibiotic effects, and topical diclofenac drops (Voltaren® drops, Allergan, Inc., Irvine, CA, USA) for analgesia, twice a day. In addition, the eyes were treated topically four times a day with one of the treatments under study. For this, the rabbits were randomized for each surgical intervention into one of the following four groups: Group 1) 20% s-PRGF drops ($n = 9$); Group 2) 50% s-PRGF drops ($n = 9$); Group 3) 100% s-PRGF drops ($n = 5$) or Group 4) artificial tears containing povidone (Oculotect, Alcon) as the control group ($n = 5$). S-PRGF was diluted in balanced saline solution (BSS® Alcon, Fort Worth, TX, USA) when necessary. In addition, the order in which the animals in the different experimental groups were treated was randomized.

To assess the size of the residual epithelial defect, the eyes were photographed with and without fluorescein once a day, with a ruler placed in the same plane as the ocular surface, and always at the same time of day. Wounded areas were measured using ImageJ software, and results were expressed as mean wound area \pm SD in mm². Rabbit eyes were also examined for signs of corneal inflammation and neovascularization.

Histochemical evaluation

After both eyes of each animal had been operated on and followed up, that is, 7 days after surgery for left eyes and

30 days after surgery for right eyes (7 days of treatment and 3 weeks more without treatment for right eyes), corneas were removed, fixed in 4% paraformaldehyde, included in paraffin and cut into 4- μ m tissue sections. Some tissue sections were processed for haematoxylin–eosin staining. Stained sections were observed with a phase-contrast microscope (Nikon Eclipse TS 100), and images were acquired with the PROGRES CAPTUREPRO 2.6 software. We evaluated the structural integrity and histological characteristics of the cornea as well as the regeneration of the epithelium and cell infiltration. We also counted under the 20 \times objective lens the number of keratocytes in three random fields of the anterior third of the stroma in haematoxylin–eosin sections from three rabbits under each treatment ($n = 9$ for each treatment).

Some other corneal tissue sections were prepared for immunofluorescent staining according to conventional protocols. Briefly, sections were treated with the heat-induced antigen retrieval solution Tris:EDTA pH 9.0 for 40 min at 96°C. Then, sections were permeabilized with phosphate-buffered saline solution containing 0.5% Triton-X-100 (Sigma) for 10 min and preincubated with phosphate-buffered saline containing 5% BSA and 10% SBF for an additional hour to minimize non-specific signals. Then, sections were incubated at 4°C overnight with the following primary antibodies at the respective dilutions: mouse anti-keratin K3/K76 (1:20, Millipore, Temecula, CA, USA), mouse anti-cytokeratin K15 (1:50, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), goat anti-ZO1 tight junction protein antibody C-terminal (1:20, Abcam, Cambridge, MA, USA), mouse anti-alpha-smooth muscle actin (α -SMA; 1:20, Abcam). After the sections were washed with phosphate-buffered saline, the samples were incubated with secondary antibodies for 1 hr at room temperature and protected from light. We used the following secondary antibodies (1:1000, Invitrogen): goat anti-mouse IgG1 Alexa Fluor 568 conjugate, goat anti-mouse IgG2a Alexa Fluor 488 conjugate, donkey anti-goat IgG Alexa Fluor 568 conjugate and goat anti-mouse IgG2a AlexaFluor 488 conjugate. The DNA-specific dye DAPI (1 μ g/ml, Sigma) was used to

detect nuclei. Finally, the sections were mounted with Fluoromount-g (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and photographed with a fluorescence microscope (Zeiss, Göttingen, Germany).

Statistical analysis

SPSS Statistics version 18 (IBM, Chicago, IL, USA) was used to calculate means and standard deviations and to perform statistical tests. As the variables did not follow a Gaussian distribution, we used the nonparametric Mann–Whitney *U*-test to compare medians. The Kaplan–Meier estimator was used to study the number of days that corneal epithelial defects took to heal completely. For the statistical comparison of qualitative parameters, a chi-squared test was performed. *p*-values <0.05 were considered significant differences.

Results

In vitro proliferation and wound-healing assays in RPCE cultures

We studied cell proliferation in RPCE cultures under treatment with different concentrations (10, 20 and 50%) of s-PRGF. We found that all concentrations of s-PRGF produced a time-dependent proliferation pattern (Fig. 1A). There was not, however, a statistically significant dose-dependent association. We only observed a weak trend to a higher proliferation rate with the 50% s-PRGF treatment compared to that with concentrations of 10 or 20% (Fig. 1B). Conversely, the proliferation rate was significantly higher with all concentrations of s-PRGF than with 1% BSA at 48 and 72 hr. Notably, we found no statistically significant differences in the cell proliferation rate of cultures treated with 10% FBS compared to 10, 20 or 50% of s-PRGF at any time-points.

We performed scratch wound-healing assays on RPCE cultures to determine the ability of s-PRGF to promote *in vitro* migration and re-epithelialization. After scraping off rounded areas in cell culture monolayers, we treated them with s-PRGF, FBS and BSA as a control treatment. As a 50% dilution of s-PRGF appeared to have better results in the proliferation assay, we chose this dilution for s-PRGF for

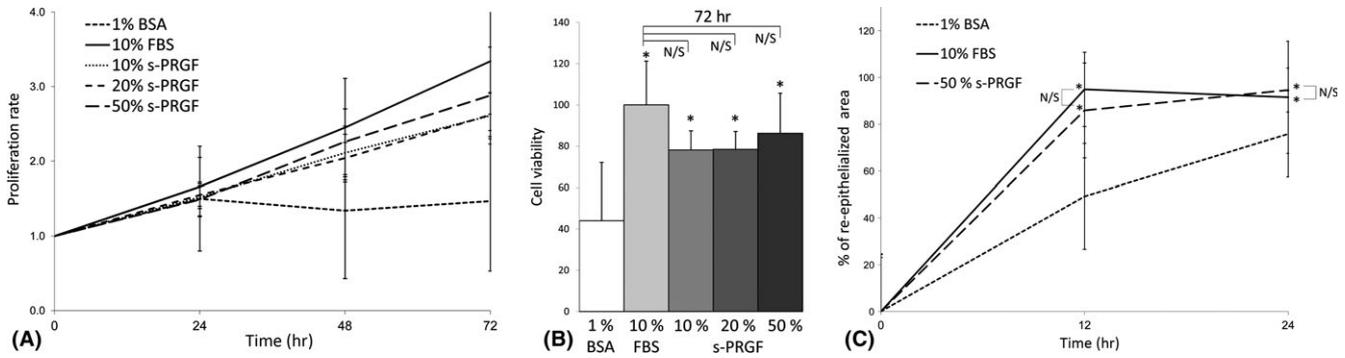


Fig. 1. Effect of s-PRGF on the proliferation and re-epithelialization of rabbit primary corneal epithelial (RPCE) cultures. (A) Proliferation pattern of cultures exposed for 24, 48 and 72 hr to various concentrations of s-PRGF, 10% FBS or 1% BSA as the control treatment. Results are expressed as proliferation rate \pm standard deviation of viable cells with respect to viable cells at $t = 0$. (B) Viability of RPCE cultures exposed to the same treatments for 72 hr. Results are expressed as percentages versus that with FBS. (A and B) There were statistically significant differences between 1% BSA and all other treatments at 48 and 72 hr. No differences were found between any % of s-PRGF and 10% FBS. (C) Percentage of re-epithelialized area of RPCE cultures after 12 hr of culture incubation with 50% s-PRGF, 10% FBS and 1% BSA as the control treatment. s-PRGF and FBS both stimulated the migration of RPCE cells compared to the control treatment, with no significant differences between them. *Statistically significant differences with respect to 1% BSA ($p \leq 0.05$, Mann–Whitney U -test). N/S: not significant.

these experiments. We found that s-PRGF accelerated the recovery of the monolayer with respect to that in controls (1% BSA; Fig. 1C), the differences being statistically significant at all time-points.

Although FBS is not usually used for healing assays, as it is the usual supplement for the maintaining and proliferation of cell cultures, we included it in the wound-healing assay. There were no significant differences between using s-PRGF and FBS in the closure rate of the denuded area.

In vivo corneal re-epithelialization assay in a rabbit animal model

We performed an *in vivo* assay to study corneal re-epithelialization in a rabbit model. To provide evidence to support its potential use for human corneal epithelial defects, we assessed both the efficacy and the safety of s-PRGF. To perform the experiment, eyes with surgically induced epithelial ulcers were treated with s-PRGF at 20, 50 or 100% or with artificial tears as a control treatment.

We did not observe any adverse events, such as corneal inflammation or neovascularization, in any eye of any study group, either during the healing process or when the complete regeneration of the wound was achieved (Fig. 2A). All animals were healthy and gained weight progressively.

The results showed that 100% s-PRGF promoted markedly faster corneal wound healing than the other

treatments (Table 1). Notably, the corneal epithelium was completely re-epithelialized in most of the eyes treated with 100% s-PRGF by Day 4, and in all eyes by Day 5 after surgery, showing a mean time to complete closure of the epithelial defect of 4.8 ± 0.45 days (Fig. 2B). Furthermore, this mean was significantly different with respect to all the other closure times, which were 5.8 ± 3.50 days for eyes treated with 20% s-PRGF, 5.8 ± 3.47 days for those treated with 50% s-PRGF and 6.2 ± 1.30 days for eyes under the control treatment.

Focusing on 5 days after surgery, all of the corneal defects under 100% s-PRGF treatment had already healed (5/5), while only 30–40% of them had re-epithelialized in the 20% s-PRGF and 50% s-PRGF groups (3–4/9) or in the control group (2/5; Fig. 2C). Finally, we did not find any significant differences when comparing control, 20% and 50% s-PRGF groups at any time during the wound-healing process.

Analysis of haematoxylin–eosin sections of the rabbit central corneas after healing showed that, by the end of the study, the corneal epithelium had successfully healed in all rabbits. Epithelial regeneration was normal showing a multistratified non-keratinized and well-organized epithelium (Fig. 3). Focal hyperplasia of one to two layers of epithelial cells was observed in all re-epithelialized corneas when compared to the histological sections of a healthy cornea (data not shown). No

alterations were observed in the endothelium. Stromal depth was maintained across the whole cornea, with healthy collagen fibres.

Effects of s-PRGF on stromal cells

We found that in rabbits which had been euthanized 7 days after surgery, keratocytes had disappeared in the anterior third of the stroma of eyes under the control treatment (Fig. 3). Interestingly, the abundance of keratocytes increased with s-PRGF concentration, becoming progressively higher in eyes treated with 20, 50 and 100% s-PRGF. Thus, the keratocyte number was 1.5 ± 1.64 for eyes under the control treatment, 2.7 ± 1.75 for eyes treated with 20% s-PRGF, 7.0 ± 4.34 for those treated with 50% s-PRGF and 34.7 ± 2.31 for eyes treated with 100% s-PRGF. What is more, only eyes treated with 100% s-PRGF had keratocytes through the full depth of the stroma. We found statistically significant differences in the number of keratocytes in eyes treated with 50% and 100% s-PRGF with respect to control eyes ($p = 0.020$ and $p = 0.019$, respectively, Mann–Whitney U -test). Only 100% s-PRGF treatment produced significant differences in the number of keratocytes compared to all other treatments, including 50% s-PRGF ($p = 0.020$). In rabbits euthanized 1 month after surgery, keratocytes were found across the entire stroma, even in eyes that had received the control treatment.

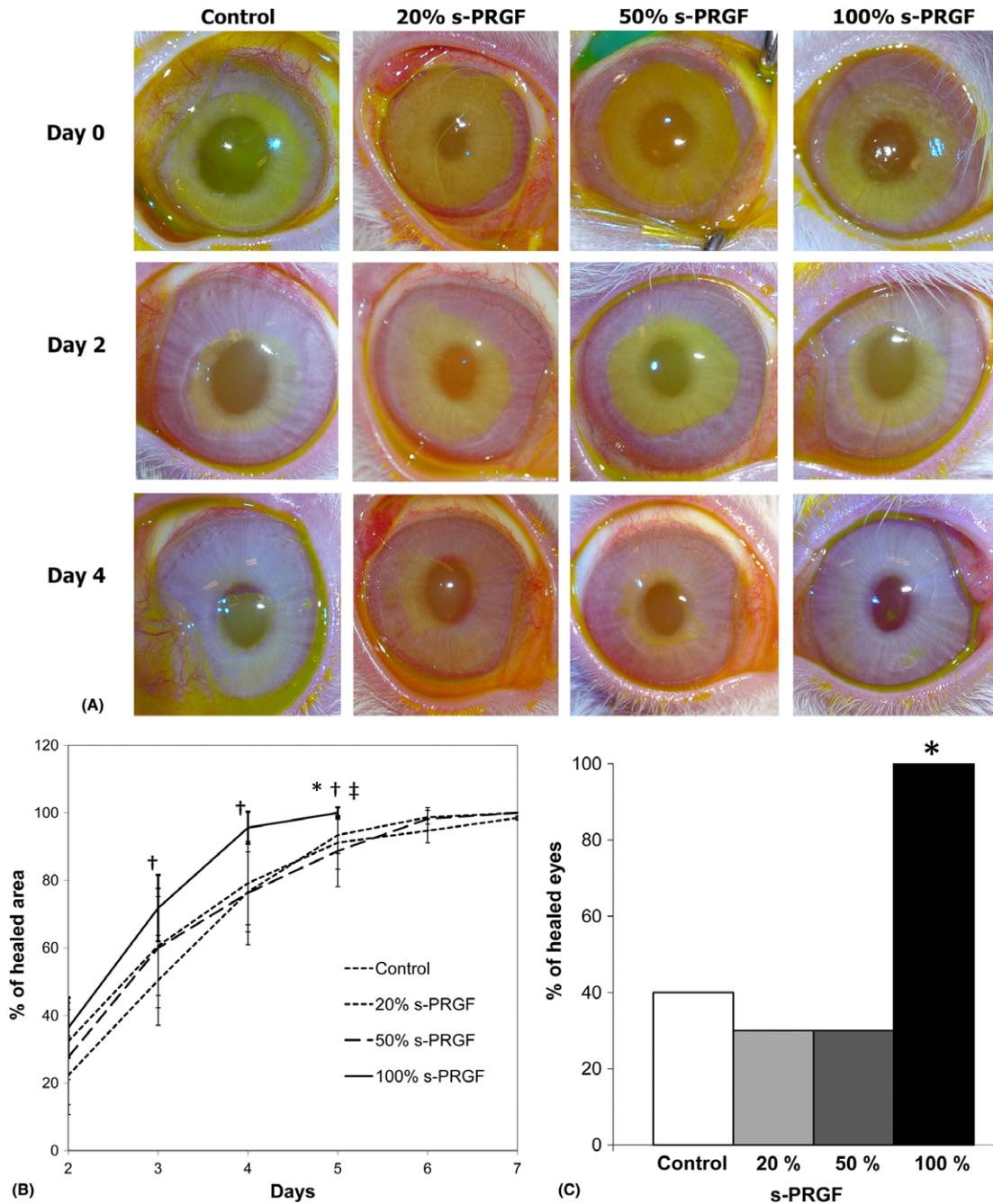


Fig. 2. Evolution of the epithelial defect in rabbit eyes. (A) Epithelial defect was monitored with fluorescein staining as a function of increasing topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears. The images show that 100% s-PRGF promotes significantly faster corneal wound healing than any of the other treatments. (B) Percentage of the initial area of induced corneal epithelial defect that had healed at different numbers of days after surgery using treatments with increasing topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears. Eyes treated with 100% s-PRGF heal much faster than those receiving any of the other treatments. Statistically significant differences ($p < 0.05$, Mann–Whitney U -test) with respect to the control treatment (*), 20% s-PRGF (†) or 50% s-PRGF (‡). (C) Percentage of resolved epithelial defects in rabbit corneas by 5 days after surgery. All eyes under 100% s-PRGF treatment had already healed, while only 30–40% had re-epithelialized in the 20% s-PRGF, 50% s-PRGF and control groups. *Statistically significant differences ($p < 0.05$, χ^2 test) with respect to all other treatments.

To further confirm a possible promotion of chemotaxis of rabbit stromal keratocytes by s-PRGF, we developed *in vitro* transwell migration and invasion assays. Considering that these assays last up to 24 hr, and with the aim of using as high a concentration of

s-PRGF as possible, we compared the chemotactic potential of 50 and 80% s-PRGF with that of 10% FBS and of 1% BSA (control treatment). Migration rates were found to be highest with the two s-PRGF concentrations (Table 2), being significantly higher than those

with FBS or BSA. Moreover, the stimulation of keratocyte migration by 50% s-PRGF was significantly stronger than that observed with 80% s-PRGF. Conversely, no matter the medium used, no differences were found in the invasion capability of keratocytes.

Table 1. *In vivo* experiment assessing the progression of wound healing in rabbit eyes treated with various concentrations of s-PRGF or artificial tears as the control. The results are expressed as mean wound area ± standard deviation in mm².

Treatment	TIME (days)					
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
Control	61.1 ± 7.6	41.3 ± 11.4	24.9 ± 14.7	13.3 ± 12.3	6.0 ± 7.8	1.8 ± 3.8
20% s-PRGF	57.2 ± 9.3	44.8 ± 11.7	29.2 ± 13.3	14.3 ± 11.8	4.2 ± 5.4	0.6 ± 2.0
50% s-PRGF	56.2 ± 8.2	41.5 ± 14.1	23.8 ± 17.7	14.5 ± 15.3	7.1 ± 10.6	0.9 ± 3.4
100% s-PRGF	55.3 ± 8.9	35.6 ± 9.8	15.6 ± 4.7 [†]	2.8 ± 1.7 [†]	0.0* ^{†‡}	

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

[†]Statistically significant differences with respect to 20% s-PRGF ($p \leq 0.05$). (Mann–Whitney *U*-test).

[‡]Statistically significant differences with respect to 50% s-PRGF ($p \leq 0.05$). (Mann–Whitney *U*-test).

s-PRGF influences the differentiation phenotype, adhesion property and fibrosis

To assess the mechanisms through which the autologous s-PRGF favours corneal wound healing, we used immunohistochemistry techniques to analyse rabbit corneas after the epithelial defect had healed. Figures 4 and 5 showed an increase in the number of cell layers of the epithelium stained for the cytokeratin K-3/76 and the tight junction protein ZO-1, respectively, as well as in the intensity of staining, as a function of s-PRGF concentration and the time passed since surgery. Staining was especially evident at 30 days after surgery in eyes that had received the 100% s-PRGF treatment. When we analysed the corneal limbus, where the epithelial stem/progenitor cells reside, by detecting the putative stem cell marker K-15 we observed increase in positive staining as the s-PRGF concentration increased. We found especially relevant the presence of prominent clusters of K-15 positive undifferentiated cells in the basal limbal epithelium of eyes under 100% s-PRGF treatment at Day 30 after surgery (Fig. 6). Finally, at Day seven after surgery, α -SMA staining of stromal cells' cytoplasm was clearly detected only in corneas that had received the 100% s-PRGF treatment. At Day 30 after surgery (3 weeks after the end of treatment of rabbit corneas), α -SMA staining of corneas treated with non-diluted s-PRGF diminished markedly, remaining only a slightly positive expression (Fig. 7).

Discussion

In recent years, PRP therapies have become widely used in ophthalmology, being considered an autologous source of growth factors and signalling

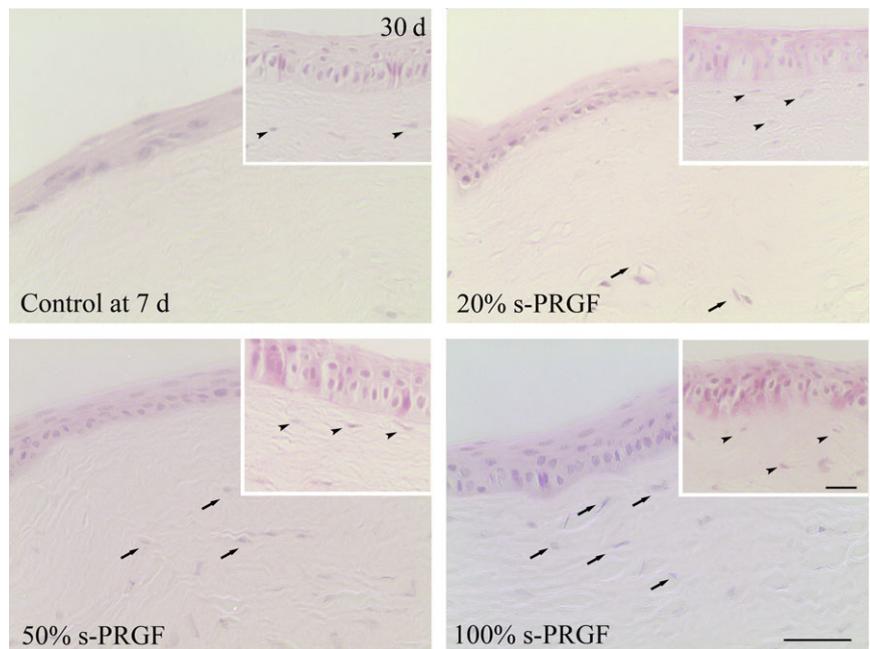


Fig. 3. Haematoxylin-and-eosin-stained histological sections of the rabbit central corneas after healing. Central corneas of rabbit eyes treated with various topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears were obtained after healing of the epithelial defect. Corneas were processed 7 days after surgery (larger micrographs, scale bar: 50 μ m), or at 30 days (upper right squares, scale bar: 25 μ m). Complete regeneration with normal histology of the epithelium is observed in all corneas. When euthanasia was performed 7 days after surgery, the number of keratocytes in the anterior third of the stroma was related to the % of s-PRGF used. At 30 days, no matter the treatment used, keratocytes occupied the whole stroma.

Table 2. *In vitro* chemotaxis experiment assessing the number of keratocytes (\pm SD) that migrated, and that invaded a Matrigel-coated filter, after 7 hr and 1 day of incubation, respectively, following treatment with 50% s-PRGF, 80% s-PRGF, 10% FBS or 1% BSA as the control treatment.

Treatment	Migration	Invasion
BSA	31.77 ± 12.91 [†]	304.66 ± 34.37
50% s-PRGF	283.00 ± 28.10*	206.22 ± 68.04
80% s-PRGF	208.56 ± 94.11* [†]	215.88 ± 65.28
FBS	162.44 ± 88.04 [†]	1102.58 ± 1125.49

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

[†]Statistically significant differences with respect to 50% s-PRGF ($p \leq 0.05$). (Mann–Whitney *U*-test).

molecules (Liu et al. 2006). Their use is based on the premise that the platelets contained in PRPs constitute a reservoir

of critical growth factors that, once released, modulate a range of biological processes including inflammation,

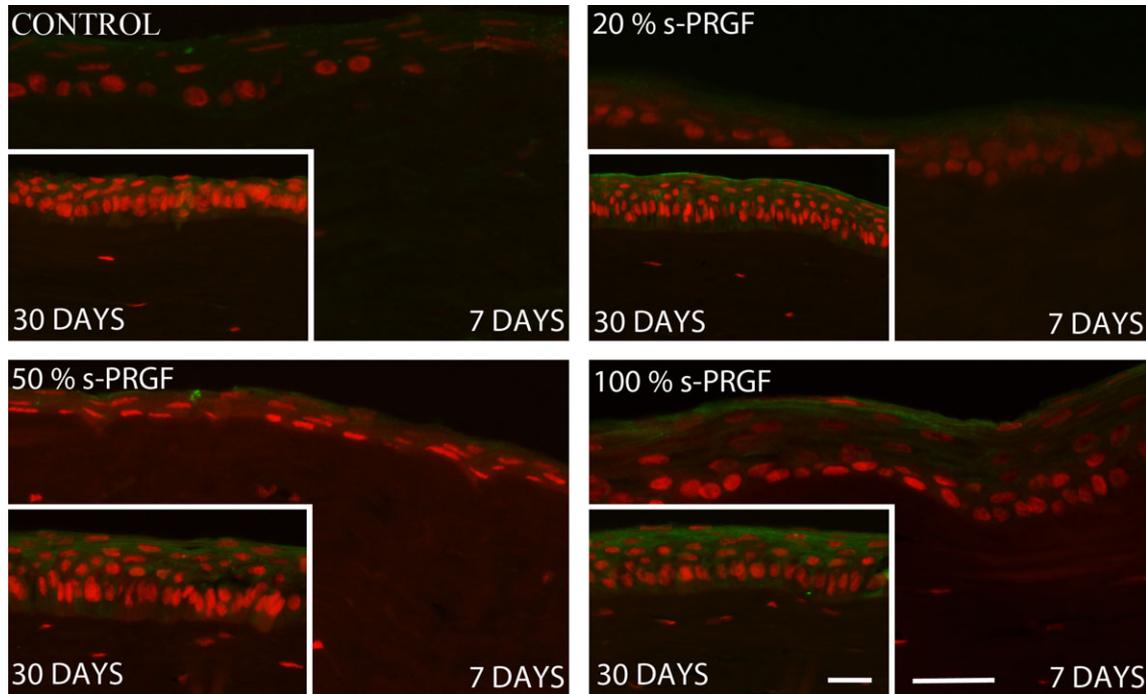


Fig. 4. Fluorescent immunostaining for cytokeratin 3 (K3; green) on rabbit central corneas after healing of the epithelial defect. Corneas of rabbit eyes were treated with various topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears as the control treatment and were collected seven or 30 days after surgery. The images show an increase in the number of cell layers of the epithelium stained for K-3, as well as in the intensity of staining, as a function of s-PRGF concentration and the time passed since surgery. Staining was especially evident at 30 days after surgery in eyes that had received the 100% s-PRGF treatment. Scale bar: 50 μ m.

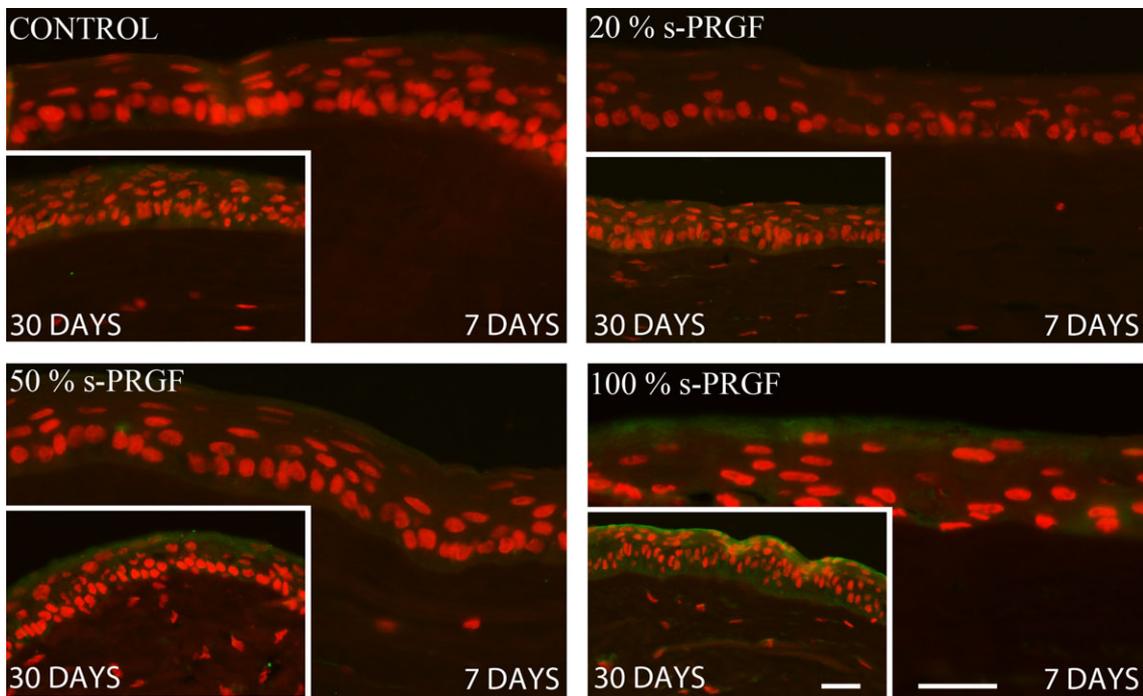


Fig. 5. Fluorescent immunostaining for *zonula occludens-1* (ZO-1; green) on rabbit central corneas after healing of the epithelial defect. Corneas of rabbit eyes were treated with various topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears as the control treatment and were collected 7 or 30 days after surgery. The images show an increase in the number of cell layers of the epithelium stained for ZO-1, as well as in the intensity of staining, as a function of s-PRGF concentration and the time passed since surgery. Scale bar: 50 μ m.

angiogenesis, cell proliferation, migration, differentiation and extracellular matrix synthesis. In addition, it has also

been described that the concentration of growth factors is higher when platelets are activated (Liu et al. 2006).

In the PRP used in this study, s-PRGF, white blood cells are excluded because they could exacerbate tissue

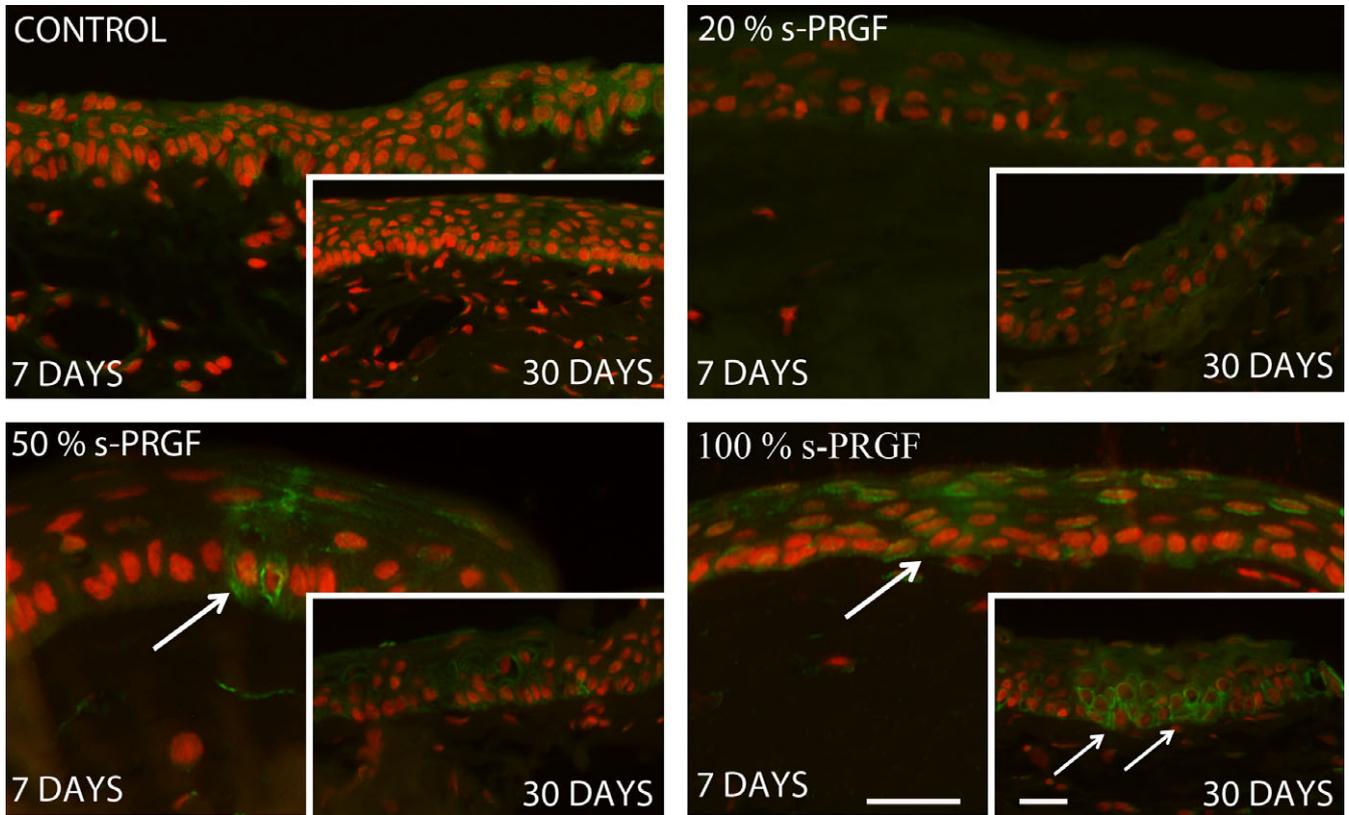


Fig. 6. Fluorescent immunostaining for cytokeratin 15 (K15; green) on rabbit corneal limbus after healing of the epithelial defect. Corneas of rabbit eyes were treated with various topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears as the control treatment and were collected 7 or 30 days after surgery. The images show increasing positive staining as the s-PRGF concentration increased. Interestingly, prominent clusters of K-15 positive undifferentiated cells can be observed in the basal limbal epithelium of eyes under 100% s-PRGF treatment at Day 30 after surgery. Scale bar: 50 μ m.

damage via several mechanisms. For instance, leucocytes secrete pro-inflammatory cytokines, such as tumour necrosis factor- α , interferon- γ , interleukin-6 and interleukin-1b, that cause matrix destruction through the production of matrix metalloproteinase-1, metalloproteinase-3 and metalloproteinase-13 (Anitua et al. 2015b). It may be for this reason that s-PRGF is very well tolerated (López-Plandolit et al. 2010, 2011).

Our group was the first to employ s-PRGF in ophthalmology (López-Plandolit et al. 2010), as well as to adapt its manufacture to the rabbit model. Although the fraction immediately above the buffy coat (fraction F3) is the one richest in platelets, our group has successfully been employing the whole fraction over the buffy coat for the treatment of some ocular surface pathologies (López-Plandolit et al. 2010, 2011). We believe that this point is really important as the fraction next to the buffy coat is quite small and it would be necessary to obtain a great deal of blood from the patient in the

case of chronic treatments. In relation to this, a comparative *in vitro* study has shown agreement with our results demonstrating the same effectiveness when F3 (663 000 platelets/ μ l) or all the supernatant (481 000 platelets/ μ l) were used to manufacture s-PRGF, in terms of proliferation, migration and inhibition of differentiation of stromal keratocytes (Anitua et al. 2011). Indeed, intermediate concentrations of platelets about 300–600% above baseline (503 000–1 729 000 platelets/ μ l PRP) are necessary to achieve bone regeneration (Marx et al. 1998; Weibrich et al. 2004). However, highly concentrated platelet preparations have an inhibitory influence on osteoblast activity, probably due to the threshold dose of some inflammatory molecules having been exceeded, which could produce inhibitory and/or cytotoxic effects (Weibrich et al. 2004).

We, as well as other authors, have found that human corneal epithelial (HCE) cells promote proliferation after treatment with s-PRGF or other blood derivatives (Liu et al. 2006; Freire et al.

2012; Anitua et al. 2013). Now, we have demonstrated the outstanding capability of s-PRGF to stimulate cell proliferation in primary epithelial cultures from rabbit cornea. Our findings indicate that cell migration under s-PRGF treatment in primary rabbit cultures was faster than that observed in HCE cells (Freire et al. 2014). In primary cultures, this effect is not dose dependent, showing no significant differences compared to any s-PRGF concentration tested or, what it is more striking, compared to 10% FBS. This finding suggests that the culture of primary epithelial cells with s-PRGF could be a valuable alternative to FBS, avoiding the use of this xenogeneic product for cell expansion in cell therapy.

Surprisingly, s-PRGF and 10% FBS are similar in their capacity to promote the re-epithelialization of RPCE cells *in vitro*. Cell-denuded areas in both groups were almost closed in the first 12 hr after cell scraping. We also found, in rabbit eyes, a trend to a faster rate of corneal epithelial wound healing with increasing concentrations

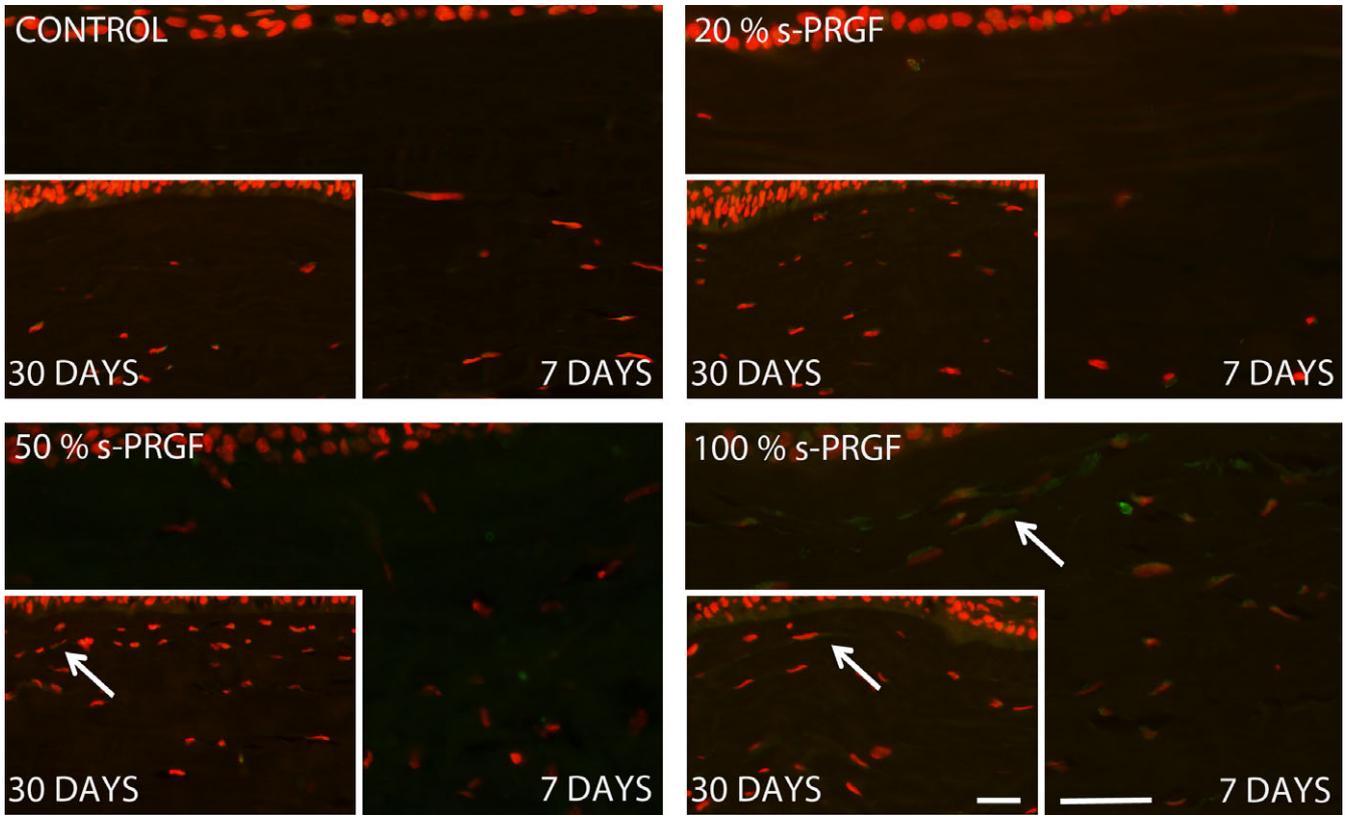


Fig. 7. Fluorescent immunostaining for alpha-smooth muscle actin (α -SMA; green) on rabbit central corneas after healing of the epithelial defect. Corneas of rabbit eyes were treated with various topical concentrations of s-PRGF drops or artificial tears as the control treatment and were collected seven or 30 days after surgery. At Day 7 after surgery, α -SMA staining of stromal cells' cytoplasm was clearly detected only in corneas that had received the 100% s-PRGF treatment. At Day 30, α -SMA staining of corneas treated with non-diluted s-PRGF diminished markedly, remaining only a slightly positive expression. Scale bar: 50 μ m.

of s-PRGF, it only being significantly faster when non-diluted s-PRGF was used. Some other results from our group, in which different blood derivatives were compared, show significantly faster re-epithelialization of rabbit corneas with s-PRGF than other treatments (including autologous serum), especially in the first few days of wound healing (Freire et al. 2014). Consistently, other studies have already demonstrated that, in the first days of treatment in healthy rabbits, skin defects heal much faster with PRGF as compared to control treatment (Molina-Miñano et al. 2009).

On the other hand, we did not find significant differences in corneal epithelialization of healthy rabbits when using artificial tears compared to 20 or 50% s-PRGF drops. Other authors have also concluded that diluted blood derivatives have no significant effects on corneal wound healing (Shahriari et al. 2008). We believe that this could well be due to an intact neural pathway in our healthy rabbits and that, hence,

despite a trend to faster re-epithelialization, 20 or 50% s-PRGF is insufficient to accelerate the closure of the ulcer in a statistically significant way with respect to controls. In pathological cases of neurotrophic ulcers, we consider that even low concentrations of s-PRGF could significantly accelerate epithelial healing compared to control treatments. In fact, we have demonstrated that the application of 50% s-PRGF drops is effective as a treatment for the re-establishment of the corneal epithelial surface in patients with persistent epithelial defects that did not respond to other treatments (López-Plandolit et al. 2010). Nevertheless, we currently believe that, even in patients with damaged neural pathways in which the use of 50% s-PRGF is effective, 100% s-PRGF would be the optimal concentration to use, as it contains higher concentration of neurotrophic and epithelium-maintaining factors for the improvement of corneal sensitivity (Matsumoto et al. 2004; López-Plandolit et al. 2010).

Our histological analysis demonstrated correct re-epithelialization in all cases 1 month after surgery. However, we did find differences in keratocyte distribution in the stromal layers as a function of s-PRGF concentration and the time passed since surgery. Specifically, when corneas were processed 7 days after surgery, the keratocyte population in superficial layers of the stroma was directly correlated with the concentration of s-PRGF used; this parameter was normal only when 100% s-PRGF was applied. When corneas were processed 1 month after surgery, regardless of the s-PRGF concentration used, the whole stroma was filled with keratocytes. Physiologically, it has been described that after debridement of corneal epithelium, keratocytes next to the wound begin to fragment and undergo cell death, creating a narrow acellular zone (Fini & Stramer 2005). The adjacent keratocytes become activated and progress to mitosis; cells begin to migrate towards the damaged area within 24 hr,

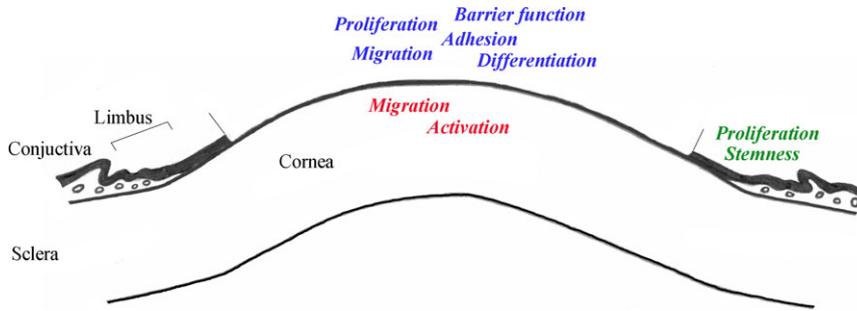


Fig. 8. Schematic illustration of the several processes induced by s-PRGF in the rabbit corneal epithelial cells (blue), stromal cells (red) and limbal epithelial progenitor/stem cells (green) during wound healing. The backslash and forward slash represent the area of the corneal epithelium that was scraped off.

arriving at the wound in 48 hr with typical fibroblast morphology (Zieske et al. 2001; Fini & Stramer 2005). There, activated fibroblasts secrete various different molecules that restructure the extracellular matrix and support the migration and adhesion of epithelial cells (Fini & Stramer 2005). We, in agreement with other authors (Anitua et al. 2015c), have demonstrated by *in vitro* chemotaxis assays that s-PRGF has a higher keratocyte chemo-attractant capability than FBS or the control treatment. It has also been described that the addition of fetal calf serum to *in vitro* cultured keratocytes initiates their activation and entry into the cell cycle, with a phenotype change very similar to that of fibroblasts. (Fini & Stramer 2005). Our immunohistochemical findings involving α -SMA, a protein associated with activated fibroblasts and myofibroblasts (Wilson 2012), showed positive cells in the anterior stroma of corneas treated with 100% s-PRGF. Moreover, the corneas under non-diluted s-PRGF treatment were the only ones that had cells through the full depth of the stroma, including its anterior third. These results are consistent with the hypothesis that epithelial–stromal interactions are important in the development of corneal myofibroblasts (Wilson 2012). In our experiments, α -SMA positive staining was very slight at Day 30 in 100% s-PRGF-treated corneas (these corneas had been treated for 7 days and then maintained with no treatment for 3 weeks more before their collection and analysis). Activation and differentiation of keratocytes into myofibroblasts are physiological events in corneal wound healing. Myofibroblasts secrete large quantities of extracellular matrix and

exert contraction properties, which may serve a tissue regenerative function that allows myofibroblasts to participate in wound matrix organization and wound contraction (Wilson 2012). However, the opaque extracellular matrix laid down by myofibroblasts often contributes to stromal opacity in the transparent cornea, and must be reabsorbed by keratocytes to restore normal transparency and avoid corneal haze. Considering that α -SMA expression decreases in a few weeks after finishing non-diluted s-PRGF treatment, this PRP seems to be a very desirable product for the treatment of corneal epithelial defects. This PRP promotes a rapid regenerative response and seems to prevent scar formation in the cornea, because no opacity in the rabbit corneas has been found when using the slit-lamp; H-E sections have shown normal and well-structured tissue and α -SMA expression decreases very rapidly after treatment is ended.

Proliferation, migration and differentiation of keratocytes are known to be mediated by several growth factors that are present in s-PRGF, including TGF, PDGF and FGF (Andresen et al. 1997). Indeed, there is a high content of PDGF in s-PRGF, the concentration being 10-fold higher than in tear film (Vesaluoma et al. 1997). *In vitro*, 80% s-PRGF induced chemotaxis less strongly than 50% s-PRGF. This is consistent with the findings of other authors that the strongest migration effect on NIH3T3 fibroblasts was obtained with a moderate concentration of PDGF, the effect decreasing with higher concentrations (De Donatis et al. 2008). This point together with the presence of an excess of inflammatory molecules that could produce inhibitory and cytotoxic

effects in highly concentrated platelet preparations (Weibrich et al. 2004) could be the reason for the optimal effectiveness of moderately concentrated blood derivatives to promote *in vitro* chemotaxis. *In vivo*, this issue is not relevant as, even if non-diluted blood derivatives were to be used as eye drops, they would become diluted with tear film on the ocular surface.

In the wound-healing process, corneal epithelial stem cells located in the basal limbus provide differentiated cells for reconstructing the epithelium (Park et al. 2006; Kameishi et al. 2015). Using the K-15 antibody, which is a marker for limbal progenitor phenotype (Yoshida et al. 2006), we have found increasing staining as the s-PRGF concentration increases and larger clusters of stem/progenitor cells in corneas treated with non-diluted s-PRGF. This result shows that the effect of s-PRGF is not restricted to the wound area, but effectively extends to cells in the eye periphery to provide an integral response and the resolution of the epithelial defect. Thus, s-PRGF seems to be able to stimulate proliferation of limbal stem/progenitor cells, at the same time that maintains their stemness, supporting the re-epithelialization process. Similar results have been described for satellite cells, the tissue-specific stem cells that maintain the regenerative potential of skeletal muscle (Li et al. 2013), as well as for some other stem/progenitor cells from mesenchymal origin (Andia & Abate 2015).

Those cells that differentiate from progenitor cells express markers of differentiated corneal epithelial cells such as cytokeratin 3 and 12 (Secker & Daniels 2009). Cytokeratin K 3/76 and the cell junction-related protein *zonula occludens-1* ZO-1 were found more abundantly in epithelia of the corneas treated with higher concentrations of s-PRGF. Both proteins are characteristic of mature epithelial cells (Wu et al. 2014). The K3 is present in all layers of the corneal epithelium and the suprabasal layers of the limbal epithelium in normal corneas. The ZO-1 protein is one of the key organizational proteins at tight junctions. These cell junctions provide intercellular adhesion properties and barrier function to the corneal epithelium (Wu et al. 2014). Our results suggest that s-PRGF promotes the differentiation of corneal epithelial cells, creating

a mature and specialized corneal epithelium and accelerating establishment of the barrier function that had been lost during corneal injury.

To sum up, we conducted a series of experiments with the blood derivative rich in growth factors s-PRGF. Because of its content and previous evidences, the use of s-PRGF could be considered particularly suitable for faster epithelial wound healing and stromal injury repair. Our results show that s-PRGF accelerates the usual mechanisms implicated in re-epithelialization, including epithelial cell proliferation, migration, adhesion and differentiation into mature and specialized epithelial cells, rapidly restoring the barrier function of the epithelium. It also promotes migration and activation of stromal cells, but avoiding scar formation. Interestingly, s-PRGF maintains the stemness properties of limbal stem/progenitor cells, while it stimulates them to proliferate and differentiate to support re-epithelialization (Fig. 8). All these data may explain the beneficial use observed for s-PRGF in clinical applications.

As a practical approach, it is clear that 100% is the optimal concentration of autologous s-PRGF to obtain significant benefits in corneal wound healing in healthy rabbit eyes. Notably, no toxic effect was observed in the *in vivo* assay, probably due to dilution of 100% s-PRGF with tears. As a consequence, we suggest using the non-diluted concentration for the clinical use of s-PRGF and maybe some other blood derivatives. Further, this study demonstrates that qid dosage is sufficient to accelerate re-epithelialization with no toxicity. However, further experiments are required to determine whether there is any dosage above which this treatment could have toxic effects on the corneal epithelium, before increasing the dosage in patients. The optimal dose of s-PRGF and the effectiveness of such treatment in neurotrophic cases remain to be determined. We believe that, even in neurotrophic cases, it is likely that stronger effects are achieved with higher concentrations and frequencies of s-PRGF application. In relation to this, non-diluted autologous s-PRGF has shown positive effects on both epithelial and stromal cells, facilitating the improvement of corneal repair without toxicity.

References

- Alió JL, Abad M, Artola A, Rodríguez-Prats JL, Pastor S & Ruiz-Colecha J (2007a): Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology* **114**: 1286–1293.
- Alió JL, Colecha JR, Pastor S, Rodríguez A & Artola A (2007b): Symptomatic dry eye treatment with autologous platelet-rich-plasma. *Ophthalmic Res* **39**: 124–129.
- Alió JL, Rodríguez AE, Martínez LM & Rio AL (2013): Autologous fibrin membrane combined with solid platelet-rich-plasma in the management of perforated corneal ulcers: a pilot study. *JAMA Ophthalmol* **131**: 745–751.
- Andia I & Abate M (2013): Platelet-rich plasma: underlying biology and clinical correlates. *Regen Med* **8**: 1–14.
- Andia I & Abate M (2015): Platelet-rich plasma in the treatment of skeletal muscle injuries. *Expert Opin Biol Ther* **15**: 987–999.
- Andia I & Maffulli N (2013): Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **9**: 721–730.
- Andresen JL, Ledet T & Ehlers N (1997): Keratocyte migration and peptide growth factors: the effect of PDGF, bFGF, EGF, IGF-I, aFGF and TGF-beta on human keratocyte migration in a collagen gel. *Curr Eye Res* **16**: 605–613.
- Anitua E (1999): Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* **14**: 529–535.
- Anitua E, Sánchez M, Merayo-Llodes J & Orive G (2011): Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta-1 induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 6066–6073.
- Anitua E, Muruzabal F, Alcalde I, Merayo-Llodes J & Orive G (2013): Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates corneal wound healing and reduces haze formation after PRK surgery. *Exp Eye Res* **115**: 153–161.
- Anitua E, Muruzabal F, Tayebba A, Riestra A, Tayebba A, Perez VL, Merayo-Llodes J & Orive G, (2015a): Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol* **93**: e605–e614.
- Anitua E, Zaldueño M, Troya M, Padilla S & Orive G (2015b): Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One* **10**: e0121713.
- Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Llodes J & Orive G (2015c): Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp Eye Res* **135**: 118–126.
- De Donatis A, Comito G, Buricchi F et al. (2008): Proliferation versus migration in platelet-derived growth factor signaling: the key role of endocytosis. *J Biol Chem* **283**: 19948–19956.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L & Albrektsson T (2009): Classification of platelet concentrates from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol* **27**: 158–167.
- Everts PA, Knape JT, Weibrich G, Schönberger JP, Hoffmann J, Overvest EP, Box HA & van Zundert A (2006): Platelet-rich plasma and platelet gel: a review. *J Extra Corpor Technol* **38**: 174–187.
- Fini ME & Stramer BM (2005): How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea* **24**: s2–s11.
- Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA & Morales MC (2012): In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 5571–5578.
- Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Hernández-Moya R, Durán JA & Morales MC (2014): Corneal wound healing promoted by three blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea* **33**: 614–620.
- Javaloy J, Alió JL, Rodríguez AE, Vega A & Muñoz G (2013): Effect of platelet-rich plasma in nerve regeneration after LASIK. *J Refract Surg* **29**: 213–219.
- Kameishi S, Yamato M, Sado Y, Namiki H, Kato T & Okano T (2015): Remodeling of epithelial cells and basement membranes in a corneal deficiency model with long-term follow-up. *Lab Invest* **95**: 168–179.
- Kawakita T, Espana EM, He H, Smiddy R, Parel JM, Liu CY & Tseng SC (2006): Preservation and expansion of the primate keratocyte phenotype by downregulating TGF-beta signaling in a low-calcium, serum free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 1918–1927. Erratum in: *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; **47**: 2279.
- Klenkler B & Sheardown H (2004): Growth factors in the anterior segment: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Exp Eye Res* **79**: 677–688.
- Klenkler B, Sheardown H & Jones L (2007): Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing and ocular pathology. *Ocul Surf* **5**: 228–239.
- Kruse FE, Rohrschneider K & Völcker HE (1999): Multilayer amniotic membrane transplantation for reconstruction of deep corneal ulcers. *Ophthalmology* **106**: 1504–1510.
- Lambiase A, Rama P, Bonini S, Caprioglio G & Aloe L (1998): Topical treatment with nerve growth factor for corneal neurotrophic ulcers. *N Engl J Med* **338**: 1174–1180.
- Li H, Usas A, Poddar M et al. (2013): Platelet-rich plasma promotes the proliferation of human muscle derived progenitor cells and maintains their stemness. *PLoS ONE* **8**: e64923.

- Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P, Wedel T, Kasper K & Geerling G (2006): Corneal epitheliotropic capacity of three different blood-derived preparations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 2438–2444.
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Grau AE & Durán JA (2010): Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea* **29**: 843–848.
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Etxebarria J & Durán JA (2011): Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea* **30**: 1312–1317.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE & Georgeff KR (1998): Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **85**: 638–646.
- Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R & Tsubota K (2004): Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* **111**: 1115–1120.
- Molina-Miñano F, Lopez-Jornet P, Camacho-Alonso F & Vicente-Ortega V (2009): The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: experimental study in rabbits. *Int Wound J* **6**: 145–148.
- Murali S, Hardten DR, DeMartelaere S et al. (1994): Effect of topically administered platelet-derived growth factor on corneal wound strength. *Curr Eye Res* **13**: 857–862.
- Pallua N, Wolter T & Markowicz M (2010): Platelet-rich plasma in burns. *Burns* **36**: 4–8.
- Panda A, Pushker N & Bageshwar LM (1999): Lateral tarsorrhaphy: is it preferable to patching? *Cornea* **18**: 299–301.
- Park KS, Lim CH, Min BM, Lee JL, Chung HY, Joo CK, Park CW & Son Y (2006): The side population cells in the rabbit limbus sensitively increased in response to the central cornea wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 892–900.
- Pastor JC & Calonge M (1992): Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea* **11**: 311–314.
- Rosenthal P, Cotter JM & Baum J (2000): Treatment of persistent epithelial defect with extended wear of fluid-ventilated gas-permeable scleral contact lens. *Am J Ophthalmol* **130**: 33–41.
- Secker GA & Daniels JT (2009): Limbal epithelial stem cells of the cornea. In: *StemBook* (ed.). The Stem Cell Research Community, StemBook. Available at: <http://www.stembook.org>. (Accessed on 28 Dec 2016).
- Seitz B, Grüterich M, Cursiefen C & Kruse FE (2005): Conservative and surgical treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmologie* **102**: 15–26.
- Shahriari HA, Tokhmehchi F, Reza M & Hashemi NF (2008): Comparison of the effect of amniotic membrane suspension and autologous serum on alkaline corneal epithelial wound healing in the rabbit model. *Cornea* **27**: 1148–1150.
- Slater M, Patava J, Kingham K & Mason RS (1995): Involvement of platelets in stimulating osteogenic activity. *J Orthop Res* **13**: 655–663.
- Tripathi BJ, Kwait PS & Tripathi RC (1990): Corneal growth factors: a new generation of ophthalmic pharmaceuticals. *Cornea* **9**: 2–9.
- Tseng SC & Tsubota K (1997): Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* **124**: 825–835.
- Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I & Shimmura S (1999a): Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* **83**: 390–395.
- Tsubota K, Goto E, Shimmura S & Shimazaki J (1999b): Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* **106**: 1984–1989.
- Vajpayee RB, Mukerji N, Tandon R, Sharma N, Pandey RM, Biswas NR, Malhotra N & Melki SA (2003): Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol* **87**: 1312–1316.
- Vesaluoma M, Teppo AM, Grönhagen-Riska C & Tervo T (1997): Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) in tear fluid: a potential modulator of corneal wound healing following photorefractive keratectomy. *Curr Eye Res* **16**: 825–831.
- Weibrich G, Hansen T, Kleis W & Buch R & W (2004): Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* **34**: 665–671.
- Wilson SE (2012): Corneal myofibroblast biology and pathobiology: generation, persistence, and transparency. *Exp Eye Res* **99**: 78–88.
- Wilson SE, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Hong J & Lee J (2001): The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* **20**: 625–637.
- Wu Z, Zhou Q, Duan H et al. (2014): Reconstruction of auto-tissue-engineered lamellar cornea by dynamic culture for transplantation: a rabbit model. *PLoS ONE* **9**: e93012.
- Yamada N, Matsuda R, Morishige N, Chikama TI, Nishida TI, Nishida T, Ishimitsu T & Kamiya A (2008): Open clinical study of eye-drops containing tetrapeptides derived from substance P and insulin-like growth factor 1 for treatment of persistent corneal epithelial defects associated with neurotrophic keratopathy. *Br J Ophthalmol* **92**: 896–900.
- Yoshida S, Shimmura S, Kawakita T, Miyashita H, Den S, Shimazaki J & Tsubota K (2006): Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 4780–4786.
- Zieske JD, Guimaraes SR & Hutcheon AE (2001): Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* **72**: 33–39.

Received on May 6th, 2016.

Accepted on November 18th, 2016.

Correspondence:

Noelia Andollo

Department of Cell Biology and Histology

School of Medicine and Nursing

University of the Basque Country

BioCruces Health Research Institute

B° Sarriena, s/n

48940 Leioa

Spain

Tel: +34 94 601 3295

Fax: +34 94 601 3266

Email: noelia.andollo@ehu.es

Research study supported by grants from the University of the Basque Country/Instituto Clínico Quirúrgico de Oftalmología US11/24, from the University of the Basque Country (UF111/44), from the Saiotek Program of the Basque Government (S-PE12UN128) and from the Mutua Madrileña Foundation (FMM11/02). No sponsor or funding organization had any role in the design or conduct of this research. We gratefully acknowledge the technical support with animal care provided by SGIker (University of the Basque Country, UPV/EHU).