



ORIGINALES

Artículo bilingüe inglés/español

Validación galénica del colirio de plasma rico en factores de crecimiento

Galenic validation of plasma rich in growth factors eye drops

Eduardo Anitua^{1,2}, Francisco Muruzábal^{1,2}, Ana Riestra³,
María de la Fuente^{1,2}, Jesús Merayo-Lloves³

¹BTI Biotechnology Institute, Vitoria, España. ²University Institute for Regenerative Medicine and Oral Implantology, UIRMI (UPV/EHU Fundación Eduardo Anitua), Vitoria, España. ³Instituto Oftalmológico Fernández-Vega. Fundación de Investigación Oftalmológica, Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

Autor para correspondencia

Eduardo Anitua
BTI Biotechnology Institute.
C/ Jacinto Quincoces, 39,
01007 Vitoria (Álava), España.

Correo electrónico:
eduardo@fundacioneduardoanitua.org

Recibido el 25 de junio de 2018;
aceptado el 19 de octubre de 2018.

DOI: 10.7399/fh.11106

Cómo citar este trabajo

Anitua E, Muruzábal F, Riestra A, de-la-Fuente M, Merayo-Lloves J. Validación galénica del colirio de plasma rico en factores de crecimiento. Farm Hosp. 2019;43(2):45-9.

Resumen

Objetivo: Evaluación galénica del proceso de obtención y almacenamiento del colirio de plasma rico en factores de crecimiento PRGF-Endoret®.

Método: Para evaluar la asepsia en la obtención del colirio de PRGF-Endoret® se realizó un ensayo de esterilidad siguiendo las normas descritas en la Farmacopea Europea y se analizó la estanqueidad de los dispensadores de colirio de PRGF-Endoret®. Asimismo, se estudiaron las propiedades químicas y biológicas del colirio tras su proceso de obtención y almacenamiento. Se incluyeron ensayos de filtración del colirio, de un ciclo de congelación a -20 °C y descongelación, así como de estabilidad durante tres y seis meses almacenados a -20 °C.

Resultados: Los ensayos de esterilidad mostraron que no hubo crecimiento microbiano en ninguno de los dispensadores analizados y se observó que el 100% de los monodosis analizados y el 98,4% de los tapones mantenían el hermetismo. Todos los factores de crecimiento analizados permanecieron constantes tras el filtrado del colirio de PRGF-Endoret®. Además, todos los estudios de estabilidad llevados a cabo con el colirio de PRGF-Endoret® en el presente estudio mostraron que no se produjeron cambios significativos en los niveles de factores de crecimiento, en la actividad proliferativa celular ni en las características químicas analizadas.

Conclusiones: El presente trabajo muestra que el proceso de elaboración del colirio de PRGF-Endoret® se lleva a cabo de forma controlada, aseptica y segura, siguiendo las normas descritas en la Farmacopea Europea. Además, el colirio de PRGF-Endoret® obtenido mantiene sus propiedades físico-químicas y biológicas tras someterlo a diferentes tiempos y temperaturas de almacenamiento.

PALABRAS CLAVE

Colirio; Córnea; Enfermedades corneales; Estandarización; Factores de crecimiento; Plasma rico en plaquetas.

KEYWORDS

Cornea; Corneal diseases; Eye drops; Growth factors; Platelet rich plasma; Standardization.

Abstract

Objective: Galenic evaluation of the process for obtaining and storing the platelet rich in growth factors PRGF-Endoret® eye drops.

Method: To assess whether the PRGF-Endoret® eye drops process is aseptically obtained, a sterility test was carried out on the eye drops; the tightness of the PRGF-Endoret® eye drops containers was also analyzed. Likewise, the chemical and biological properties of the PRGF-Endoret® eye drops were evaluated after the obtaining process and storage. Eye drop filtration tests, one cycle of freezing at -20 °C and thawing, and eye drop stability for three and six months stored at -20 °C were included.

Results: The results obtained in the sterility test showed no microbial contamination in any of the analyzed eyedropper; tightness test showed that 100% of the eyedrop containers and the 98.4% of the plugs analyzed remained hermetic. On the other hand, all the growth factors measured remained constant after filtering the PRGF-Endoret® eye drops. Furthermore, the different eye drop stability tests carried out in this study showed no significant changes in the growth factors levels, cell proliferative activity or in the chemical characteristics analyzed.

Conclusions: The PRGF-Endoret® eye drops are obtained in a safety and aseptic manner following the guidelines issued by the Spanish Agency for Drugs and Health Products and the Ministry of Health to obtain medicines for human use. The PRGF-Endoret® eye drops maintain their physical-chemical and biological properties after being subjected to different storage times and temperatures.



Los artículos publicados en esta revista se distribuyen con la licencia
Articles published in this journal are licensed with a
Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>
La revista Farmacia no cobra tasas por el envío de trabajos,
ni tampoco por la publicación de sus artículos.

Introducción

El uso de derivados hemáticos para el tratamiento de patologías de la superficie ocular se ha incrementado en el área de la oftalmología, ya que su composición es análoga a la de la lágrima natural^{1,2}. En los últimos años, debido al reciente descubrimiento del papel que desempeñan las plaquetas en la reparación y regeneración tisular, se ha vivido una evolución desde el uso del suero autólogo hasta la aplicación de los denominados plasmas ricos en plaquetas (PRP)³.

El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) pertenece a los citados PRP. A partir de la sangre del paciente, se obtiene un plasma enriquecido en plaquetas que es activado con cloruro cálcico, de forma que se produce la liberación de un amplio abanico de factores de crecimiento (FC) y proteínas que participan en la regeneración tisular⁴. De esta manera, se obtiene un colirio rico en factores de crecimiento y proteínas que ha sido utilizado con éxito en el tratamiento de diversas patologías de la superficie ocular⁵⁻¹⁰.

El 23 de mayo de 2013 se publicó la Resolución de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) por la que se establece la clasificación del uso terapéutico no sustitutivo del plasma autólogo y sus fracciones, componentes o derivados, como medicamento de uso humano para atender necesidades especiales¹¹.

La actual clasificación de los derivados del plasma como medicamentos de uso humano hace que tengan que satisfacer todos los requisitos de calidad y seguridad exigidos para los medicamentos de aplicación por vía oftálmica. Además, la *Guía de Buenas Prácticas de Preparación de Medicamentos* (GBPP) indica que se deben validar las preparaciones normalizadas, lo que conlleva la evaluación de las propiedades galénicas de la preparación en las condiciones reales definidas, desde el primer día hasta la fecha de máxima utilización establecida.

En el presente trabajo se aborda la validación de la asepsia en el proceso de obtención del colirio de PRGF-Endoret® mediante el kit de oftalmología de PRGF-Endoret® utilizando medio de cultivo. Además, se evalúa la idoneidad de los envases monodosis de acuerdo con los requisitos establecidos en la Real Farmacopea en cuanto a volumen extraíble y estanqueidad. Asimismo, se estudia cómo afecta la filtración esterilizante a la composición del colirio determinando los niveles de distintos factores de crecimiento antes y después de la filtración. Por último, se valora el efecto de la congelación/descongelación sobre el potencial biológico del colirio de PRGF-Endoret® en cultivos celulares.

Métodos

El proceso de obtención de las formulaciones de PRGF utilizadas a lo largo del estudio se realizó en un ámbito clínico privado siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki, revisada en 2008, y tras la aprobación del estudio por el correspondiente comité ético.

Estudio de esterilidad del proceso de obtención del colirio de PRGF-Endoret®

El presente ensayo se realizó siguiendo las normas descritas en la Farmacopea Europea. En resumen, se utilizaron seis kits de oftalmología de PRGF-Endoret® y se utilizó caldo tripticasa de soja (*trypticase soy broth*, TSB) como medio de cultivo, que sustituyó a la sangre del paciente a lo largo de todo el proceso de preparación del colirio de PRGF-Endoret®. Tres de los seis kits fueron manipulados dentro de la cabina de flujo laminar (1800 BBS-V, TDI, España) y los otros tres fuera de ésta. Una vez finalizado el proceso de obtención del colirio, las muestras fueron incubadas a 23 °C durante los siete primeros días, y a 33 °C durante los siete días posteriores. Finalmente, el contenido de cada monodosis fue añadido a un tubo de ensayo transparente para su correcta visualización.

Como control del crecimiento microbiológico del medio de cultivo utilizado, se inoculó un pequeño número de unidades formadoras de colonias (10-100 UFC) de los siguientes microorganismos:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027).
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).
- *Candida albicans* (ATCC 10231).
- *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

Los distintos controles fueron incubados durante tres días a 37 °C en el caso de las bacterias y durante cinco días a 23 °C en el caso de los hongos.

Ensayo del volumen de extracción

Para demostrar que se puede retirar el contenido nominal del envase monodosis se aplicó el ensayo de volumen extraíble a cinco envases del colirio de PRGF-Endoret®, utilizando una jeringa seca de 1 ml diferente para cada envase.

Ensayo de estanqueidad del monodosis

Para realizar el ensayo de estanqueidad, las monodosis de dos kits de PRGF-Endoret® fueron rellenas con agua y conservadas en el congelador durante dos días. Posteriormente se descongelaron a temperatura ambiente durante 4 horas (Figura 1A). Se colocaron las monodosis en una cámara de vacío aplicando un peso para evitar que flotarían (Figura 1B) y se sumergieron en una solución de azul de toluidina (Figura 1C). Se aplicó un vacío de 0,65 bares durante 10 minutos (Figura 1D), y posteriormente los viales fueron cuidadosamente inspeccionados. Una vez examinados, las monodosis fueron nuevamente sumergidas sin el soporte (Figura 1E) en azul de toluidina aplicando un peso (Figura 1F), y se aplicaron 0,65 bares de presión durante 10 minutos (Figura 1G). Finalmente, las monodosis fueron de nuevo analizadas individualmente.

Preparación del colirio de PRGF-Endoret®

Para la preparación del colirio de PRGF-Endoret® se extrajo sangre mediante venopunción a voluntarios sanos previa firma del consentimiento informado, tras la explicación de la naturaleza y posibles consecuencias del estudio.

Se utilizó el kit de oftalmología de PRGF-Endoret® (BTI, Vitoria, España) extrayendo la sangre en tubos de 9 ml con citrato sódico al 3,8% como anticoagulante. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 580 g durante 8 minutos, posteriormente se recogió la columna completa de plasma evitando la serie blanca (leucocitos). El plasma fue activado con cloruro cálcico al 10% y se incubó a 37 °C durante una hora. Finalmente,

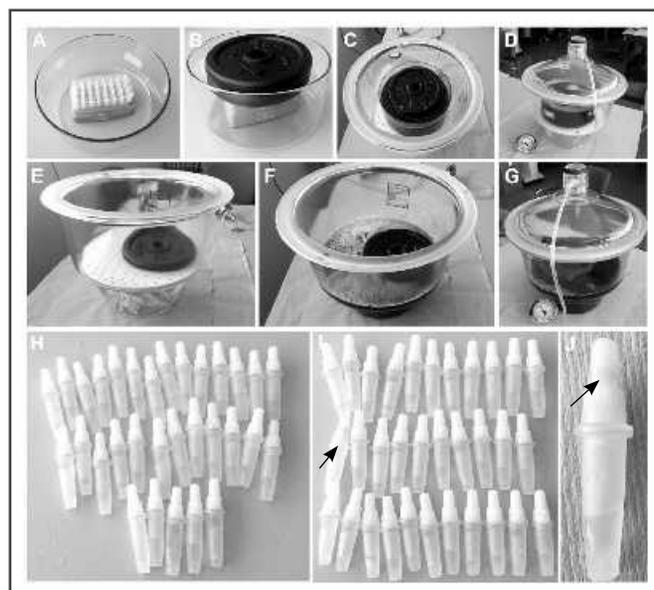


Figura 1. Imágenes que reflejan el ensayo de estanqueidad. Monodosis en el soporte en una cámara de vacío (A); peso aplicado en la parte superior para evitar que flote (B); soporte sumergido en una solución de azul de toluidina (C) y sellado de la cámara de vacío para aplicar vacío (D). Monodosis sumergidas sin el soporte (E) en azul de toluidina aplicando un peso (F); sellado y aplicación de presión (G). Detalle de las monodosis tras el ensayo de estanqueidad del primer soporte examinado (H) y del segundo soporte (I); detalle del tapón con coloración azul (J).

el sobrenadante fue filtrado y alícuotado en los dispensadores monodosis y congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Análisis de la concentración de factores de crecimiento

En los diferentes ensayos llevados a cabo para la realización del presente trabajo, se midió la concentración de diversos factores de crecimiento involucrados en la regeneración de tejidos de la superficie ocular, entre ellos, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB), el factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento similar a la insulina tipo-I (IGF-I), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), la endostatina (END), la angiopoyetina-1 (ANG-1) y la trombospondina-1 (TSP-1). Estos FC fueron analizados mediante el uso de kits comerciales de ensayos de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) de la compañía R&D Systems (Minneapolis, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Cultivos celulares

La actividad biológica de las muestras de colirio derivado de la tecnología PRGF-Endoret® obtenidas en los distintos ensayos fue estudiada en dos tipos de células primarias originarias de la superficie ocular, los queratocitos corneales (HK) y los fibroblastos conjuntivales (HCF) (ScienCell Research Laboratories, San Diego, EE. UU.). Ambos tipos celulares fueron cultivados en medio de fibroblastos suplementado con suplemento de crecimiento de fibroblastos (FGS), 2% de suero bovino fetal y antibióticos (penicilina/estreptomina) (ScienCell Research Laboratories, San Diego, EE. UU.). Tras alcanzar la confluencia, las células fueron despegadas usando una enzima comercial libre de trazas animales (TrypLE Select, Gibco-Invitrogen, Grand Island, EE. UU.). La viabilidad de las células se analizó mediante el método de tinción por exclusión con azul tripán.

Proliferación celular

Las células de la superficie ocular fueron sembradas en una placa negra de 96 pocillos con fondo claro a una densidad de 10.000 células por cm^2 , y se cultivaron durante 72 horas con medio libre de suero suplementado al 20% con las muestras de colirio de PRGF-Endoret® obtenidas en cada ensayo. La densidad de las células en cultivo se analizó mediante el uso del ensayo de proliferación celular CYQUANT (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fluorescencia de las muestras se midió utilizando un lector de fluorescencia (Twinkle LB 970, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Alemania). En todas las cuantificaciones se incluyó una curva estándar de ADN (ng/ml) para establecer la correlación entre unidades de fluorescencia y concentración de ADN.

Ensayo de filtración del colirio

Se realizó un ensayo de filtración del colirio a través de un filtro de PVDF $0,22\text{ }\mu\text{m}$ para comprobar si dicha filtración provocaba una disminución en la concentración de los distintos FC analizados. Para ello, la mitad del volumen de colirio destinado a este ensayo se alícuotó y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; mientras que la otra mitad se filtró con un filtro de PVDF de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore, Tullagreen, Irlanda), y finalmente se alícuotó y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. En dichas muestras se midió la concentración de EGF, PDGF-AB, TGF- β 1, VEGF, FGF, END y TSP-1.

Ensayo de un ciclo de congelación/descongelación

Para evaluar si un ciclo de descongelación y congelación afecta a la actividad biológica del colirio de PRGF-Endoret®, se utilizó un colirio filtrado, que se alícuotó y se almacenó durante dos semanas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, parte de las alícuotas se mantuvieron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (control a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) y otras se descongelaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (un ciclo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) o a temperatura ambiente (un ciclo a RT) durante 18 horas. Tras este tiempo, las alícuotas de colirio descongeladas se volvieron a congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvieron a esta temperatura hasta su uso. Posteriormente, se analizaron los factores de crecimiento PDGF-AB, EGF, VEGF, TGF- β 1, ANG-1, END y TSP-1, y se evaluó la actividad biológica de las mismas muestras mediante ensayos

de proliferación en HK y HCF. En el presente ensayo se optó por la determinación de la concentración de ANG-1, dada su mayor sensibilidad al proceso de congelación y descongelación¹².

Ensayo de estabilidad de la osmolaridad y pH del colirio de PRGF-Endoret®

Se determinó la osmolaridad por el método de descenso crioscópico (Osmostat® OM-6020, Kyoto, Daiichi) y se analizó el pH (pHmetro Crison Instruments S.A.) del colirio de PRGF-Endoret® inmediatamente tras su elaboración y después de tres y seis meses almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las determinaciones analíticas se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Las diferencias significativas entre las distintas muestras de colirio fueron analizadas usando el procedimiento no-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un test de Bonferroni para discriminar entre las medias. En el caso del ensayo de estabilidad, las diferencias significativas entre muestras a dos tiempos de almacenamiento se analizaron mediante un test no paramétrico de Wilcoxon.

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando los niveles de *p* fueron inferiores a 0,05. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS (versión 15.0; SPSS Inc., Chicago, EE. UU.).

Resultados

Estudio de esterilidad del proceso de obtención del colirio de PRGF-Endoret®

Tras el tiempo de incubación a 25 y $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ de los distintos dispensadores oftálmicos analizados, no se detectó turbidez, indicadora de crecimiento microbiano, en ninguna de las 192 unidades analizadas, independientemente de que su manipulación se hubiera realizado dentro de la cabina de flujo laminar ($n = 96$) o fuera ($n = 96$).

Además, en los ensayos utilizados como control de crecimiento microbiológico, bacteriostasis y fungistasis, los resultados fueron todos positivos, observándose un crecimiento de todas las cepas a partir del segundo día de incubación.

Volumen extraíble

Todos los envases monodosis satisficieron el ensayo de volumen extraíble, coincidiendo con el volumen nominal.

Ensayo de estanqueidad del envase

Tras la aplicación de vacío no se observó azul de toluidina en el interior del vial o del tapón de ninguna de las 32 monodosis del primer soporte (Figura 1H). En el segundo soporte analizado, tampoco se observó coloración azul dentro de ninguno de los viales ensayados, pero sí se detectó coloración azul en el interior del tapón de un vial (Figuras 1I y 1J).

Osmolaridad y pH

Las condiciones de almacenamiento de los colirios a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aumentaron ligeramente los valores de osmolaridad con respecto a los niveles del colirio recién obtenido, pasando de un valor de $321 \pm 7\text{ mOsm/l}$ en el momento de la elaboración a $348 \pm 3\text{ mOsm/l}$ y $360 \pm 12\text{ mOsm/l}$ tras tres y seis meses de almacenamiento, respectivamente. Del mismo modo, los niveles de pH se incrementaron de $7,8 \pm 0,1$ en el momento de la elaboración a $8,10 \pm 0,03$ y $8,2 \pm 0,4$ tras el almacenamiento durante tres y seis meses a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente.

Ensayo de filtración del colirio

Los resultados del presente ensayo mostraron que los niveles de los distintos factores de crecimiento analizados se mantuvieron constantes ($p > 0,05$) tras el proceso de filtrado del colirio con filtro de PVDF de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ con respecto al colirio control no filtrado (Tabla 1).

Tabla 1. Niveles de los distintos factores de crecimiento medidos en las muestras de colirio de PRGF-Endoret® filtrado y no filtrado*

Colirio	Niveles de factores de crecimiento						
	PDGF-AB (pg/ml)	EGF (pg/ml)	TGF-β1 (ng/ml)	VEGF (pg/ml)	END (ng/ml)	TSP-1 (µg/ml)	FGF (pg/ml)
No filtrado	8.598 ± 1.151	283 ± 80	30,3 ± 10,3	108 ± 63	81 ± 12	12,3 ± 3,6	5,5 ± 4,3
Filtrado	9.298 ± 2.034	280 ± 73	28,4 ± 10,4	106 ± 59	81 ± 7	12,2 ± 3,5	6,1 ± 5,2

*No se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los factores de crecimiento analizados.

EGF: factor de crecimiento epidérmico; END: endostatina; FGF: factor de crecimiento de fibroblastos; PDGF-AB: factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB; TGF-β1: factor de crecimiento transformante-beta 1; TSP-1: trombospondina-1; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

Tabla 2. Concentración de los distintos factores de crecimiento analizados en las muestras de colirio utilizadas en el ensayo de descongelación/congelación*

Colirio	Niveles de factores de crecimiento						
	PDGF-AB (pg/ml)	EGF (pg/ml)	TGF-β1 (ng/ml)	VEGF (pg/ml)	END (ng/ml)	TSP-1 (µg/ml)	ANG-1 (µg/ml)
Control a -20 °C	10.354 ± 3.917	351 ± 193	7,9 ± 2,1	93 ± 80	133 ± 24	26,6 ± 10,0	31,8 ± 16,1
Un ciclo a 4 °C	10.807 ± 5.191	334 ± 169	7,4 ± 1,8	92 ± 77	127 ± 15	26,6 ± 9,5	29,6 ± 13,9
Un ciclo a RT	9.931 ± 5.154	336 ± 211	8,1 ± 2,5	88 ± 75	130 ± 23	26,6 ± 10,4	28,2 ± 14,0

*No se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ninguna de las muestras de colirio evaluadas en ninguno de los factores de crecimiento ensayados. ANG-1: angiopoyetina-1; EGF: factor de crecimiento epidérmico; END: endostatina; PDGF-AB: factor de crecimiento derivado de plaquetas-AB; RT: temperatura ambiente; TGF-β1: factor de crecimiento transformante-beta 1; TSP-1: trombospondina-1; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

Ensayo de un ciclo de congelación/descongelación

Los resultados muestran que no se observaron cambios significativos ($p > 0,05$) en los niveles de concentración de los distintos factores de crecimiento analizados en el estudio tras someter al colirio a un ciclo de descongelación a 4 °C y temperatura ambiente durante 18 horas y congelación posterior (Tabla 2).

Asimismo, el índice de proliferación de las células HK y HCF no se vio modificado tras el tratamiento con el colirio de PRGF-Endoret® sometido a un ciclo de descongelación y congelación a diferentes temperaturas con respecto al grupo control (Figura 2).

Discusión

En el año 2013, la AEMPS dictó una resolución por la que estableció la clasificación del uso terapéutico no sustitutivo del plasma autólogo y sus fracciones, componentes o derivados, como medicamentos de uso humano para atender necesidades especiales (<http://www.aemps.gob.es/legislacion/espana/medicamentosUsoHumano/docs/medEspeciales/resolucion-PRP.pdf>), por la que se regula por primera vez la utilización de PRP como medicamento de uso humano. Este marco legal permite el uso de terapias PRP con todas las garantías de calidad, eficacia, trazabilidad y farmacovigilancia. Con respecto a las garantías de calidad, al igual que ocurre con cualquier otro medicamento, es necesario establecer unas garantías mínimas durante todo el proceso de fabricación. Dentro de las Normas de Correcta Fabricación de Medicamentos de Uso Humano de la Unión Europea, el capítulo 5 dicta, como norma general, que los productos y materiales deben protegerse de la contaminación microbiana¹³. A este respecto, los resultados del presente estudio muestran que el proceso de obtención del colirio de PRGF-Endoret® es aséptico, tanto si se realiza en campana de flujo laminar como si se realiza fuera de ésta. Además, de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de estanqueidad, el hermetismo de las monodosis es correcto, siendo del 100% en los viales ensayados y del 98,4% en el caso de los tapones.

Los colirios son las soluciones más empleadas en el tratamiento y diagnóstico de patologías oculares. Para evitar reacciones adversas, los colirios deben poseer características que se adapten a las condiciones fisiológicas

del ojo como son limpieza, isotonía, neutralidad y esterilidad. Para conseguir la limpieza en los colirios procedentes de derivados hemáticos, se realiza habitualmente un filtrado final del producto^{4,15}. El principal inconveniente de este filtrado es la posible pérdida de FC por su potencial adhesión al filtro. El presente estudio muestra que el colirio de PRGF-Endoret® obtenido tras su filtración con filtros de PVDF de 0,22 µm conserva los niveles de todos los FC analizados.

Otro requisito en la producción de colirios es que sean isotónicos con respecto a la lágrima natural. La osmolaridad fisiológica de la lágrima humana se sitúa entre 302-318 mOsm/l^{16,17}. El ojo sano puede tolerar soluciones con una presión osmótica de hasta 425 mOsm/l sin sensación de dolor ni lagr-

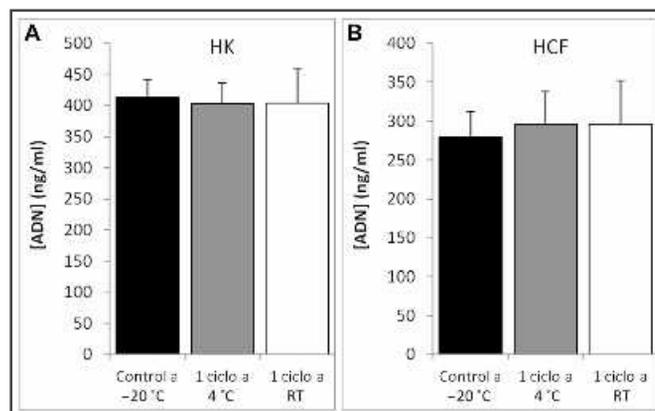


Figura 2. Ensayo de proliferación de células en la superficie ocular. Proliferación de células HK (A) y HCF (B) en respuesta a colirios de PRGF-Endoret®, mantenidos a -20 °C (control a -20 °C), descongelados a 4 °C (un ciclo a 4 °C) y descongelados a temperatura ambiente (un ciclo a RT). HCF: fibroblastos conjuntivales; HK: queratocitos corneales; RT: temperatura ambiente.

meo excesivo¹⁸. Nuestros resultados muestran que la osmolaridad obtenida del colirio de PRGF-Endoret® tras su congelación durante seis meses (321-360 mOsm/l) resulta adecuada para su administración oftálmica.

La lágrima en condiciones normales presenta un valor de pH comprendido entre 7,4 y 7,7, aunque las diferentes patologías pueden modificar el pH de la lágrima¹⁹. La capacidad tampón que poseen las lágrimas es suficiente para neutralizar con relativa rapidez soluciones en un amplio margen de pH (3,5-10,5), siempre que no se encuentren tamponadas. El pH del colirio de PRGF-Endoret® almacenado a -20 °C durante tres y seis meses se mantuvo dentro de este rango durante todo el período de estudio.

Por otro lado, tanto el informe de la AEMPS como la GBPP en servicios de farmacia hospitalaria expresan que es fundamental conocer la estabilidad de un producto con el fin de poder cumplir con las garantías de calidad de un medicamento. Estudios recientes han mostrado la estabilidad biológica del colirio de PRGF-Endoret® durante al menos seis meses congelado a -20 °C y mantenido posteriormente durante 72 horas refrigerado o a temperatura ambiente¹². Asimismo, hay que tener en cuenta la estabilidad microbiológica. Como en todos los preparados medicamentosos, se debe aplicar la GBPP. En el caso de las preparaciones de colirio derivado de sangre, implica que el medicamento debe permanecer en las instalaciones productoras entre 7-14 días, hasta disponer de los resultados microbiológicos. Este almacenamiento debe ser a -20 °C. Una vez que el análisis microbiológico haya dado un resultado negativo, se le entregarán al paciente los diferentes recipientes de colirio y se le instruirá para que conserve la cadena de frío; en este trayecto, el colirio podría llegar a descongelarse y al llegar el paciente a su casa, lo volvería a congelar. Es bien conocido que los procesos de congelación-descongelación pueden degradar diferentes proteínas y factores de crecimiento^{20,21}, pudiendo afectar este proceso a la actividad biológica del colirio derivado de sangre. El presente estudio muestra que el colirio de PRGF-Endoret® conserva intactos tanto los factores de crecimiento analizados como la actividad proliferativa tras un ciclo de descongelación y nueva congelación.

Bibliografía

- Anitua E, Muruzábal F, Tayebba A, Riestra A, Perez VL, Merayo-Lloves J, *et al.* Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmol.* 2015;93(8):e605-14. DOI: 10.1111/aos.12710
- Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2004;88(11):1467-74. DOI: 10.1136/bjo.2004.044347
- Riestra AC, Alonso-Herreros JM, Merayo-Lloves J. Plasma rico en plaquetas en superficie ocular. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 2016;91(10):475-90. DOI: 10.1016/j.oftal.2016.03.001
- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):4-15. DOI: 10.1267/THRO04010004
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Etxebarria J, Durán JA. Plasma rich in growth factors as a therapeutic agent for persistent corneal epithelial defects. *Cornea.* 2010;29(8):843-8. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181a81820
- López-Plandolit S, Morales MC, Freire V, Grau AE, Durán JA. Efficacy of plasma rich in growth factors for the treatment of dry eye. *Cornea.* 2011;30(12):1312-7. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31820d86d6
- Merayo-Lloves J, Sánchez RM, Riestra AC, Anitua E, Begoña L, Orive G, *et al.* Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eyedrops in Refractory Cases of Ocular Surface Disorders. *Ophthalmic Res.* 2015;55(2):53-61. DOI: 10.1159/000439280
- Merayo-Lloves J, Sánchez-Ávila RM, Riestra AC, Anitua E, Begoña L, Orive G, *et al.* Safety and Efficacy of Autologous Plasma Rich in Growth Factors Eye Drops for the Treatment of Evaporative Dry Eye. *Ophthalmic Res.* 2016;56(2):68-73. DOI: 10.1159/000444496
- Sánchez-Ávila RM, Merayo-Lloves J, Riestra AC, Anitua E, Muruzábal F, Orive G, *et al.* The Effect of Immunologically Safe Plasma Rich in Growth Factor Eye Drops in Patients with Sjogren Syndrome. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2017;33(5):391-9. DOI: 10.1089/jop.2016.0166
- Sánchez-Ávila RM, Merayo-Lloves J, Riestra AC, Fernández-Vega Cueto L, Anitua E, Begoña L, *et al.* Treatment of patients with neurotrophic keratitis stages 2 and 3 with plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) eye-drops. *Int Ophthalmol.* 2017;38(3):193-204. DOI: 10.1007/s10792-017-0582-7
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar social [www.aemps.gob.es]. Informe/VI/23052013. Resolución por la que se establece la clasificación del uso terapéutico no sustitutivo del plasma autólogo y sus fracciones, componentes o derivados, como medicamentos de uso humano para atender necesidades especiales. 23 de mayo de 2013 [consultado 14/11/2017]. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/legislacion/espana/medicamentosUsoHumano/docs/medEspeciales/resolucion-PRP.pdf>
- Anitua E, de la Fuente M, Riestra A, Merayo-Lloves J, Muruzábal F, Orive G. Preservation of Biological Activity of Plasma and Platelet-Derived Eye Drops After Their Different Time and Temperature Conditions of Storage. *Cornea.* 2015;34(9):1144-8. DOI: 10.1097/ico.0000000000000489
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar social [www.aemps.gob.es]. Guía de normas de correcta fabricación de la unión europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario. Capítulo 5. 25/2/2015 [consultado 14/11/2017]. Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionNCF/guiaNCF/docs/reqBasicosMed/capitulo-5.pdf>
- Fox RL, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Arthritis Rheum.* 1984;27(4):459-61.
- Anitua E, de la Fuente M, Muruzábal F, Riestra A, Merayo-Lloves J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2015;135:118-26. DOI: 10.1016/j.exer.2015.02.016
- Gilbard JP, Farris RL. Tear osmolarity and ocular surface disease in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol.* 1979;97(9):1642-6.
- Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(10):4309-15. DOI: 10.1167/iovs.05.1504
- Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, *et al.* A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(8):3671-9. DOI: 10.1167/iovs.08.2689
- Coles WH, Jaros PA. Dynamics of ocular surface pH. *Br J Ophthalmol.* 1984;68(8):549-52.
- Blumenstock FA, Valeri CR, Saba TM, Cho E, Melaragno A, Gray A, *et al.* Progressive loss of fibronectin-mediated opsonic activity in plasma cryoprecipitate with storage. Role of fibronectin fragmentation. *Vox Sang.* 1988;54(3):129-37.
- Bradley JC, Simoni J, Bradley RH, McCartney DL, Brown SM. Time- and temperature-dependent stability of growth factor peptides in human autologous serum eye drops. *Cornea.* 2009;28(2):200-5. DOI: 10.1097/ICO.0b013e318186321e

En resumen, el proceso de obtención del colirio de PRGF-Endoret® se lleva a cabo de forma segura siguiendo las directrices dictadas por la AEMPS y el Ministerio de Sanidad para la obtención de medicamentos de uso humano. Además, las características químicas y biológicas del colirio de PRGF-Endoret® se mantienen estables y en niveles adecuados para su uso en la oftalmología clínica.

Financiación

Este estudio fue totalmente financiado por BTI Biotechnology Institute, una empresa de implantes dentales que investiga en los campos de la implantología oral y la tecnología PRGF-Endoret.

Conflicto de intereses

Los autores declaran el siguiente conflicto de interés: Eduardo Anitua es el director científico y Francisco Muruzábal y María de la Fuente son científicos en BTI Biotechnology Institute, una compañía de implantes dentales que investiga en el área de la implantología oral y la tecnología de PRGF-Endoret®. Ana Riestra y Jesús Merayo-Lloves declaran que no poseen ningún conflicto de interés.

Aportación a la literatura científica

En la actualidad, se está produciendo un aumento en la incidencia de patologías de la superficie ocular que requieren un tratamiento que mantenga y regenere dicha superficie. En este sentido, el colirio autólogo de PRGF-Endoret® se presenta como una excelente alternativa a las lágrimas artificiales empleadas frecuentemente. Dicho colirio debe cumplir una serie de directrices dictadas por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios y el Ministerio de Sanidad, que garanticen su asepsia y seguridad, así como sus propiedades químicas y biológicas a lo largo del tiempo y tras someterlo a ciclos de congelación y descongelación.