

# Nuevos enfoques hacia el desarrollo de estrategias más seguras en medicina regenerativa

Mohammad H. Alkhraisat<sup>a,b</sup>, María Troya<sup>a,b</sup>, Mar Zaldueño<sup>a,b</sup>, Eduardo Anitua<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>BTI-Biotechnology Institute ImasD, Vitoria, España.

<sup>b</sup>University Institute for Regenerative Medicine & Oral Implantology UIRMI (UPV/EHU-Fundación Eduardo Anitua), Vitoria, España.

## 1. INTRODUCCIÓN

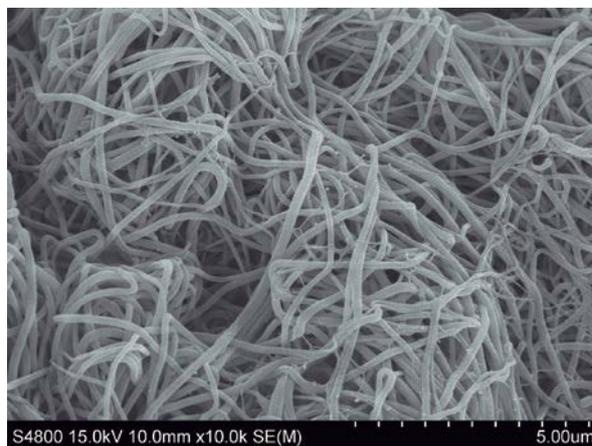
La medicina regenerativa es un área multidisciplinar con un objetivo translacional desde la investigación básica a las aplicaciones clínicas, integrando avances en campos como la biología molecular y celular, la química, la ingeniería tisular y los biomateriales, así como la medicina clínica. El enorme desarrollo conceptual y tecnológico que se ha concentrado en la biología molecular y celular ha permitido esclarecer varios mecanismos y vías de señalización que median en la reparación y la regeneración tisular. Estamos asistiendo a un profundo cambio de paradigma: en vez de eliminar y reemplazar los tejidos dañados con materiales artificiales, se están aplicando numerosas técnicas de reparación asistidas por materiales biológicos, algunos de ellos incluso autólogos, entre los que se encuentra el plasma rico en factores de crecimiento (PRGF-ENDORET) con el fin de mimetizar la reparación-regeneración.

En el contexto de la ingeniería de tejidos, las terapias biológicas brindan nuevas oportunidades para el desarrollo de una medicina vectorizada, localizada y personalizada. Partiendo de materias primas biológicas como la sangre, el plasma o las plaquetas se ha logrado dimensionar una tecnología capaz de desarrollar y aplicar eficazmente formulaciones terapéuticas. El potencial terapéutico de las plaquetas ha dado lugar al desarrollo de productos basados en estos componentes sanguíneos y en su capacidad para promover la regeneración tisular. En los últimos años, los geles de plaquetas, el plasma rico en plaquetas (PRP), los factores de crecimiento derivados de plaquetas y otros derivados, han sido diseñados para poder beneficiarnos de sus propiedades regeneradoras en la medicina clínica.

## 2. EL PRGF-ENDORET COMO MATRIZ TRIDIMENSIONAL EN LA INGENIERÍA TISULAR

Las matrices tridimensionales, empleadas desde hace años en la investigación biomédica, no solamente proveen de una estructura física al proceso de regeneración, sino que, solas o en combinación con determinados morfógenos, proporcionan un entorno bioactivo y dinámico que puede regular las funciones celulares para conseguir la replicación de la matriz extracelular nativa. El PRGF-

Endoret es un sistema versátil que ofrece un biomaterial autólogo, poroso, degradable y enriquecido con proteínas y factores de crecimiento con una capacidad inigualable de traslación a la clínica (*Figura 1*).



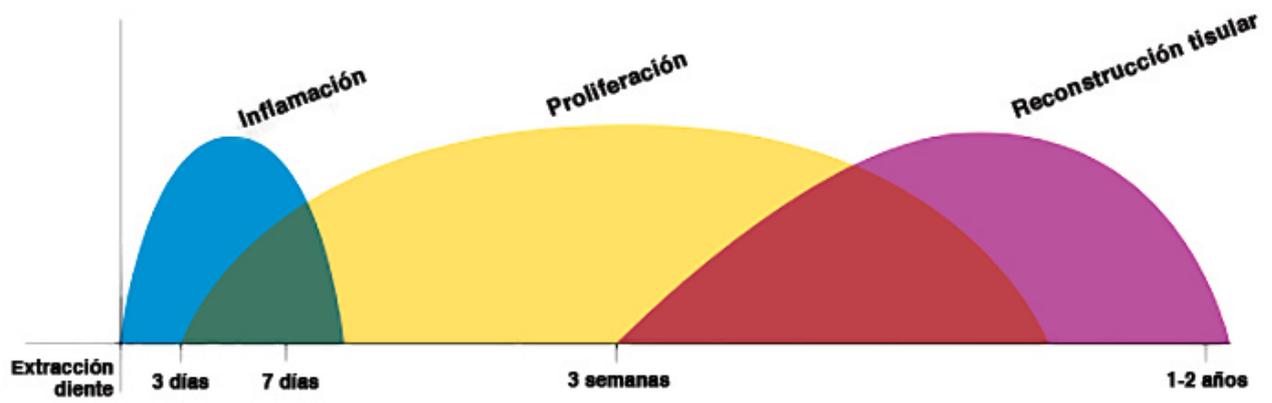
**Figura 1.** Imagen de microscopía electrónica de la fibrina obtenida del PRGF-Endoret.

De hecho, las primeras evidencias de su eficacia y seguridad vinieron del ensayo clínico controlado donde se estudiaba la regeneración del alveolo posextracción. El uso de esta matriz bioactiva y su capacidad de liberación progresiva de los factores de crecimiento hace posible la estimulación y la mejora de la regeneración tisular.

Sabemos que la regeneración transcurre en cuatro fases bien controladas y orquestadas: la hemostasia, la inflamación, la proliferación y la remodelación tisular (*Figura 2*).

Evidencias clínicas muestran que el PRGF-Endoret influye en estas cuatro fases de la regeneración.

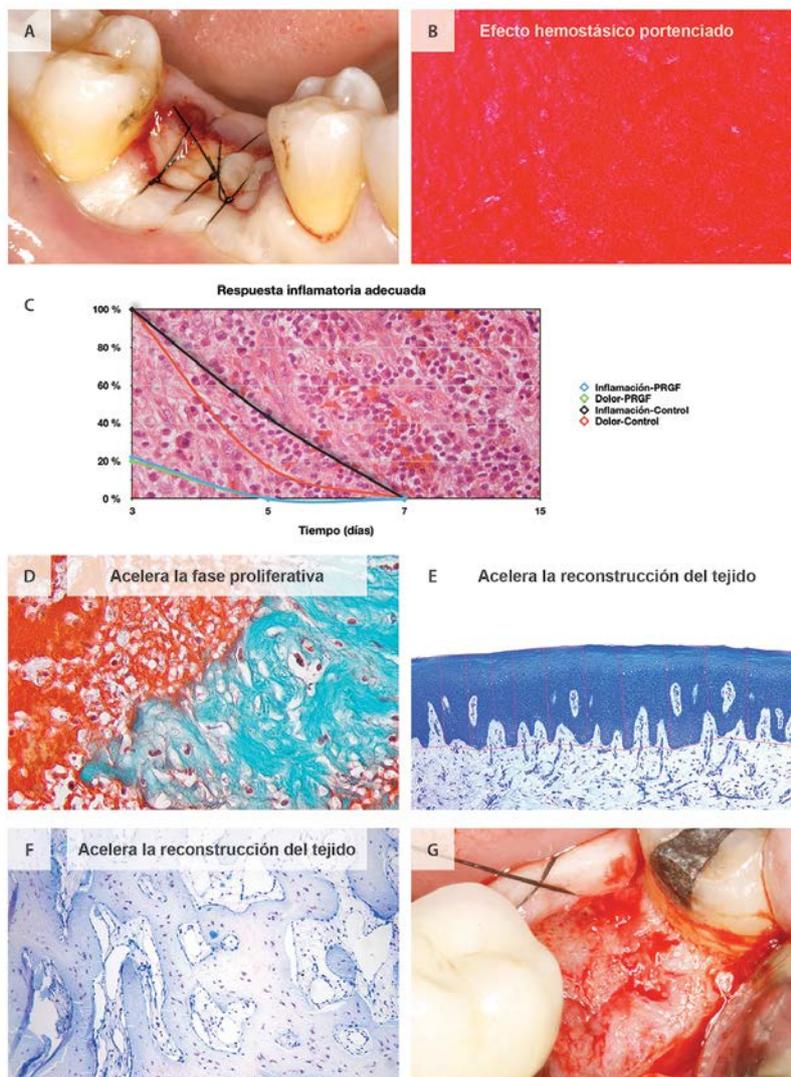
**La hemostasia:** El PRGF-Endoret tiene una eficacia que ha sido contrastada para controlar el sangrado en pacientes con tendencia al sangrado. En un estudio clínico controlado a boca partida participaron 66 pacientes afectados por una trombocitopenia severa ( $29000/\mu\text{L} < \text{número de plaquetas} < 46000/\mu\text{L}$ ) y que necesitaban la



**Figura 2.** La secuencia temporal de los procesos involucrados en la regeneración/reparación tisular.

extracción de una pieza dental. Los dos protocolos de tratamiento que han sido contrastados fueron la transfusión plaquetaria 30 minutos antes de la extracción de la pieza dental y la aplicación del PRGF-Endoret. Los

resultados indicaron la presencia de sangrado en el 26%, 36%, 39% y 12% de los pacientes cuando recibieron el tratamiento control a los 0,4-1-3-y 7 días después de la extracción, respectivamente. En el grupo PRGF-Endoret estos valores fueron de 5%, 9%, 9% y 6%, respectivamente. Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas en todos los casos excepto a los siete días tras la extracción. La hematoma estuvo presente en un 44% de los pacientes en el grupo control, frente a un 14% en el grupo PRGF-Endoret ( $p=0,0003$ ). En otro estudio clínico controlado y randomizado con 120 pacientes, se ha comparado la eficacia del PRGF-Endoret frente a un adhesivo de fibrina (Tisseel®). Los resultados indicaron que el PRGF-Endoret fue tan eficaz como la aplicación del adhesivo de fibrina (un producto heterólogo basado en fibrinógeno concentrado y trombina) como medida local de hemostasia.



**Figura 3.** El efecto del PRGF-Endoret en los procesos biológicos responsables de la regeneración tisular

**La inflamación:** El PRGF-Endoret tiene una eficacia mostrada para controlar la intensidad de la respuesta inflamatoria y también el dolor posoperatorio. La evidencia clínica indica que el PRGF-Endoret no solo acelera la resolución de la inflamación y el dolor, sino que también reduce su intensidad.

**La proliferación y la remodelación (Figura 3):** El uso del PRGF-Endoret para la regeneración tisular en clínica indica su eficacia para acelerar la reepitelización del defecto y también en mejorar la regeneración ósea. >>>

Estos resultados clínicos hacen que el PRGF-Endoret ofrezca un biomaterial con eficacia clínica mostrada para ser un candidato a validar para las nuevas tecnologías, como es la impresión 3D con el objetivo de generar matrices tridimensionales. La bioimpresión 3D consistiría en la utilización de material biológico como puede ser el PRGF-Endoret (solo o combinado con otros materiales) para la generación de la red, además de la adición de los componentes celular y molecular, constituido éste último por factores de crecimiento o

**LA MAYORÍA DE LOS PROTOCOLOS de ingeniería tisular basados en terapia celular requieren un elevado número de células, por lo que la población celular aislada debe ser expandida *ex vivo* bajo condiciones controladas, asegurando el mantenimiento de sus capacidades de autorrenovación y diferenciación.**

citoquinas, entre otros. El PRGF-Endoret ofrece dos de estos elementos: la matriz 3D y los factores de crecimiento. La bioimpresión 3D ideal sería la que reproduciría fielmente la compleja estructura de la MEC junto con las células presentes en el tejido a regenerar, siendo capaz de favorecer la presencia de los sistemas vascular y nervioso. El PRGF-Endoret es un potente estimulador de la neoangiogénesis y la regeneración de nervios periféricos. Estos hechos potencian todavía más la consideración del PRGF-Endoret en las nuevas tecnologías de la ingeniería tisular.

### 3. EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA TECNOLOGÍA PRGF-ENDORET EN LA EXPANSIÓN EX VIVO DE CÉLULAS MADRE: EVIDENCIAS EXPERIMENTALES

Las características biológicas de las células madre (SC) las erigen como las candidatas ideales para ser utilizadas en medicina regenerativa. Son células indiferenciadas que presentan capacidad de auto-renovación además de potencial para diferenciarse en células especializadas maduras. En una gran cantidad de tejidos se encuentran células madre adultas multipotentes o células madre mesenquimales (MSC), también denominadas células madre somáticas, en estado inactivo e indiferenciado. Tras un daño tisular o bien como parte del mantenimiento de la homeostasis, estas MSC podrían iniciar un proceso de autorrenovación, así como su diferenciación en células especializadas de varios linajes de células mesodérmicas. Además de evitar conflictos éticos, el empleo de estas células en técnicas de ingeniería de tejidos evitaría los problemas de rechazo una vez trasplantadas debido a su origen autólogo.

El ejemplo más conocido de MSC multipotente es la célula madre hematopoyética, que puede obtenerse fácilmente de la médula ósea y del cordón umbilical. Asimismo, las MSC pueden aislarse de una gran variedad de tejidos fetales y extraembrionarios, y de una gran cantidad de tejidos de niños y adultos. Sin embargo, la principal desventaja para la utilización de MSC deriva del proceso de su obtención. Un origen utilizado ampliamente en estudios experimentales ha sido la médula ósea (BMMSC), donde dolor y morbilidad acompañan a las invasivas técnicas que se emplean para su obtención. Otras fuentes alternativas encontradas incluyen la placenta, el cordón umbilical humano y el líquido amniótico. En este contexto, las células madre de pulpa dental se están convirtiendo en una fuente muy prometedora de células madre para terapias de ingeniería de tejidos debido a su bajo coste y gran accesibilidad, ya que pueden obtenerse del tejido pulpar de dientes permanentes, habitualmente de los terceros molares, dientes supernumerarios o dientes que, por otros motivos, deban ser extraídos, todo ello sin provocar efectos adversos para la salud.

La mayoría de los protocolos de ingeniería tisular basados en terapia celular requieren un elevado número de células, por lo que la población celular aislada debe ser expandida *ex vivo* bajo condiciones controladas, asegurando el mantenimiento de sus capacidades de autorrenovación y diferenciación, así como evitando cualquier alteración genética. En este contexto, el suero bovino fetal (SBF) ha sido utilizado ampliamente como suplemento del medio de cultivo tanto en investigación como en la práctica clínica.

El SBF es un suplemento poco definido y con alta inconsistencia en cuanto a la calidad y cantidad de compuestos bioactivos, existiendo una gran variabilidad entre lotes de fabricación. Su origen xenogénico y la posible presencia de contaminantes microbiológicos como virus, priones, bacterias, hongos o endotoxinas, genera una gran preocupación. Por otra parte, también existen problemas éticos ya que el SBF se obtiene a partir de fetos de vacas preñadas sin la utilización de anestésicos y generándose durante el proceso sufrimiento fetal. Finalmente, el uso de SBF en cultivos celulares plantea además aspectos logísticos y económicos. En este sentido, para la obtención de un litro de suero se necesitan entre 1 y 3 fetos, lo que implica elevados costes relacionados con el mantenimiento de los animales. Todos estos inconvenientes han llevado a explorar el PRGF-Endoret como una alternativa humana al SBF. En la actualidad, se están llevando a cabo diferentes trabajos de investigación para evaluar el uso del PRGF-Endoret como sustituto del suero bovino fetal en el cultivo de células madre.

En 2017, Riestra *et al.* desarrollaron un método de cultivo para la expansión *ex vivo* de células progenitoras epiteliales del limbo humano (LEPC) utilizando PRGF-Endoret tanto como suplemento de cultivo como matriz para el cultivo celular. En este trabajo, el área de crecimiento de los explantes de LEPC y la eficiencia de formación de colonias fue significativamente superior en el grupo del PRGF-Endoret. Por otro lado, la expresión de p63- $\alpha$ , marcador de células progenitoras limbares, también se vio incrementado en el caso de las células cultivadas con PRGF-Endoret, mientras que el marcador CK3-CK12 (marcador de células epiteliales corneales diferenciadas) solo se expresó de manera clara en las células cultivadas con FBS como suplemento de cultivo. La compleja estructura tridimensional de la membrana de fibrina de PRGF-Endoret fue capaz de permitir la adhesión y proliferación de las células LEPC, manteniendo su morfología poligonal típica y su estado indiferenciado. Estos resultados confirmaron que la tecnología autóloga PRGF-Endoret es capaz de proporcionar un método de cultivo completamente autólogo para la ingeniería de tejidos corneales facilitando, como suplemento de cultivo, la expansión *ex vivo* de células madre epiteliales de limbo y proporcionando a su vez una matriz para el cultivo celular que mejore el pronóstico del trasplante de limbo.

Ese mismo año, otros dos trabajos de investigación demostraron el potencial del PRGF-Endoret para el cultivo de células madre de diferentes orígenes. El primero, llevado a cabo por Mellado-López *et al.*, evaluó el uso de PRGF-Endoret para el cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC). En este trabajo la tecnología PRGF-Endoret estimuló la supervivencia y proliferación a la vez que retrasó la senescencia celular. Por otro lado, el plasma PRGF-Endoret estimuló eficazmente la diferenciación multilinaje hacia osteocitos, adipocitos y condrocitos e inhibió la muerte celular oxidativa, inducida por concentraciones letales de peróxido de hidrógeno, mediante la activación de la proteína Akt. El segundo estudio evaluó los efectos de la tecnología PRGF-Endoret en la diferenciación osteogénica de células madre mesenquimales de médula ósea. Este estudio demostró que las moléculas biológicamente activas presentes en el PRGF-Endoret estimularon de manera significativa la proliferación y mineralización asociada con la inducción osteogénica de los cultivos de dichas células madre. Estos resultados sugieren que la combinación de PRGF-Endoret y células madre es capaz de promover la regeneración ósea.

Una investigación más reciente de nuestro grupo de trabajo evaluó la sustitución de FBS por PRGF-Endoret como suplemento de medio de cultivo para la expansión *ex vivo* de células madre de pulpa dental. Esta comparativa se realizó en todas las etapas implicadas en el proceso de expansión *ex vivo*, desde la primera fase de

aislamiento hasta la fase final de criopreservación. Los resultados obtenidos en este trabajo estuvieron en consonancia con los descritos anteriormente. En este estudio, la tecnología PRGF-Endoret demostró ser capaz de igualar e incluso superar en algunos procesos los resultados obtenidos por el suero bovino fetal. De hecho, las células cultivadas con PRGF-Endoret se expandieron de manera más rápida que cuando se cultivaron con FBS, reduciendo por tanto los tiempos de manipulación *ex vivo*. Así mismo, la capacidad de las células madre de pulpa dental para migrar y diferenciarse hacia el linaje osteogénico y adipogénico también se incrementó de manera significativa tras el cultivo con PRGF-Endoret.

Los resultados de todas estas investigaciones demuestran la capacidad del PRGF-Endoret como alternativa para el aislamiento, cultivo y conservación *ex vivo* de células madre de diferentes orígenes.

#### 4. CONCLUSIONES

El uso de factores de crecimiento y fibrina derivados del PRGF-Endoret está abriendo nuevas e interesantes vías en la terapia con células madre. Esta tecnología representa una excelente alternativa ya que proporciona señales moleculares y matrices tridimensionales para la expansión y trasplante *ex vivo* de células madre de manera autóloga, y sin riesgo de transmisión de patógenos o de rechazo inmunológico, manteniendo su fenotipo y potencial de diferenciación multilinaje. ■

#### PARA LEER MÁS

Dzobo K, Thomford NE, Senthebane DA, Shipanga H, Rowe A, Dandara C, et al. Advances in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: Innovation and Transformation of Medicine. *Stem Cells Int.* 2018;2018:2495848.

Cimino M, Goncalves RM, Barrias CC, Martins MCL. Xen-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem Cells Int.* 2017;2017:6597815.

Riestra AC, Vazquez N, Chacon M, Berisa S, Sanchez-Avila RM, Orive G, et al. Autologous method for ex vivo expansion of human limbal epithelial progenitor cells based on plasma rich in growth factors technology. *Ocul Surf.* 2017;15(2):248-56.

Mellado-Lopez M, Griffeth RJ, Meseguer-Ripolles J, Cugat R, Garcia M, Moreno-Manzano V. Plasma Rich in Growth Factors Induces Cell Proliferation, Migration, Differentiation, and Cell Survival of Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:5946527.

Takahashi K, Okada H, Eda T, Kanao S, Yoshimoto H, Ogura N, et al. Plasma Rich in Growth Factors Stimulates Proliferation and Mineralization in Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow. *International Journal of Oral-Medical Sciences.* 2017;16(1):1-7.

Anitua E, Zaldueño M, Troya M. Autologous plasma rich in growth factors technology for isolation and ex vivo expansion of human dental pulp stem cells for clinical translation. *Regenerative medicine.* 2019;14(2):97-111.