

CARACTERIZACIÓN DE PRODUCTOS EMPLEADOS EN LA FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANZADAS



TESIS DOCTORAL

Doctoranda:

María Bermejo González

Directores:

Dra. Mónica Santos González

Dr. Salvador Oyonarte Gómez

Tutora:

Dra. Encarnación Mellado Durán

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas de mi grupo de trabajo, las que están y las que han pasado, por su colaboración para que el trabajo de esta tesis haya podido llegar a su fin.

Y por otro lado el apoyo de mi familia y amigos por su ánimo constante.

Gracias.

ÍNDICE

1) INTRODUCCIÓN	3
1.1) La sangre y sus derivados.....	3
1.1.1) El plasma: composición y función.....	3
1.1.2) Productos plasmáticos	3
1.1.3) Plasma Rico en Plaquetas y sus derivados:.....	4
1.2) La plaqueta: composición y función.....	5
1.2.1) Productos plaquetarios y sus métodos de obtención.....	7
1.2.2) Lisado plaquetario humano	7
1.3) Seguridad en los hemoderivados sanguíneos.....	9
1.4) Métodos de reducción de patógenos empleados en hemoderivados	10
1.5) Normativa que aplica al lisado plaquetario como medicamento biológico.	12
1.5.1) Normas de Correcta Fabricación (NCF).....	13
1.6) Lisado plaquetario empleado como materia prima de origen biológico para la producción de medicamentos de terapias avanzadas (MTA).	14
1.7) Aplicaciones clínicas del lisado plaquetario humano como medicamento biológico.	16
1.8) Aplicaciones clínicas del lisado plaquetario humano como materia prima en la fabricación de medicamentos de terapias avanzadas.	17
1.9) Ventajas de emplear lisado plaquetario humano frente a FBS	18
2) OBJETIVOS	20
2.1) Objetivo principal.....	20
2.2) Objetivos específicos.....	20
3) MATERIAL Y MÉTODOS	21
3.1) Materiales	21
3.1.1) Plasma transfusional grupo AB y concentrados de plaquetas leucodeplecionadas grupo 0.	21
3.1.2) Criterios de calidad establecidos durante la obtención de los hemoderivados.	21
3.1.3) Fibroblastos dérmicos humanos (hFB).....	22
3.1.4) Células Madre Mesenquimales humanas procedentes de cordón umbilical (hUC-MSCs).....	23
3.2) Métodos.....	24
3.2.1) Fabricación del lisado plaquetario humano (hPL).....	24
3.2.1) Métodos de reducción de patógenos en plasmas y plaquetas.....	25
3.2.2) Ensayo de esterilidad	26
3.2.3) Determinación de endotoxinas.....	27
3.2.4) Ensayo de micoplasma.....	28
3.2.5) Determinación de virus adventicios.....	29

3.2.6) Niveles de pH	30
3.2.7) Cuantificación de plaquetas y leucocitos.....	30
3.2.8) Determinación de los niveles de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas AB (PDGF-AB).....	31
3.2.9) Cuantificación de Proteínas Totales, Albúmina e Inmunoglobulinas	31
3.2.1) Test de potencia: ensayo de actividad celular	32
3.2.2) Estudio de estabilidad a dos años.....	33
3.2.3) Análisis estadístico	33
4) RESULTADOS	34
4.1) BLOQUE I: Análisis de diferentes puntos críticos durante la fabricación de un lisado plaquetario humano con calidad GMP.	34
4.1.1) Impacto de aplicar un paso de concentración de plaquetas al inicio del proceso. ..	34
4.1.1) Efecto de aplicar un paso de filtración en los productos obtenidos.....	35
4.1.1) Importancia de la presencia de plasma durante la fabricación del lisado plaquetario.	37
4.1.1) Impacto de aplicar dos o tres ciclos de congelación-descongelación durante la etapa de lisis plaquetaria.	40
4.1.1) Aplicación de un método de reducción de patógenos sobre plasma y plaquetas empleadas en el proceso de fabricación.....	42
4.2) BLOQUE II: Caracterización de las diferentes soluciones de lisado plaquetario obtenidas: LP1, LP2 y LP2i.	43
4.2.1) Medida de los niveles de pH, concentración de plaquetas y leucocitos	43
4.2.2) Concentración de proteínas y niveles de PDGF-AB.....	44
4.2.1) Test de actividad de las soluciones sobre fibroblastos dérmicos (FBs)	47
4.2.1) Controles microbiológicos.....	50
4.3) Bloque III: Estudios de estabilidad de los lisados plaquetarios almacenados a diferentes temperaturas.....	50
4.3.1) Estabilidad de los concentrados de plaquetas congelados	50
4.3.2) Estabilidad del plasma inactivado congelado	52
4.3.3) Estabilidad del lisado plaquetario 1 (LP1)	53
4.3.4) Estabilidad del lisado plaquetario 2 (LP2)	54
4.3.1) Estabilidad del lisado plaquetario inactivado (LP2i)	57
5) DISCUSIÓN.....	61
5.1.1) Uso de concentrados de plaquetas frescas vs caducadas.	61
5.1.1) Uso de plasma grupo AB y plaquetas grupo 0	63
5.1.2) Importancia del plasma y sus componentes en el producto.	64
5.1.3) Filtración, depleción y uso de heparina	65
5.1.4) Ciclos de congelación y temperaturas aplicadas.	66

5.1.5) El % de lisado como suplemento de los cultivos.....	68
5.1.6) Aumentar el número de donaciones con la inactivación	68
5.1.7) pH, plaquetas, leucocitos y otras determinaciones bioquímicas en las soluciones. 69	
5.1.8) Proteínas y factores de crecimiento.	70
5.1.9) Análisis funcionales del lisado: test de potencia.	72
5.1.10) Morfología celular, capacidad inmunomoduladora y capacidad de diferenciación en las MSCs.....	73
5.1.11) Ensayos de seguridad: fenotipo y cariotipo celular.	75
5.1.12) Estabilidad de los materiales de partida y los hPLs.	76
6) CONCLUSIONES	78
7) BIBLIOGRAFÍA.....	79
8) ANEXOS	88
8.1) Anexo 1. Grupo sanguíneo para plasma y plaquetas en la fabricación del hPL	88
8.2) Anexo 2. Métodos utilizados para producir la liberación de los factores en centros fabricantes de hPL.....	89
8.3) Anexo 3. Valores de los parámetros bioquímicos del lisado plaquetario en distintos centros fabricantes.....	90
8.4) Anexo 4. Concentraciones de proteínas y factores plaquetarios en diferentes centros fabricantes de hPL.....	91
8.5) Anexo 5. Análisis funcionales realizados por diversos centros fabricantes de lisado.	92
8.6) Anexo 6. Efecto de aplicar un método de reducción de patógenos en la proliferación celular.....	93
8.7) Anexo 7. Efecto de emplear hPL inactivado sobre la capacidad inmunosupresora de MSC.	94
8.8) Anexo 8. Efecto del uso de hPL inactivados sobre la capacidad de diferenciación en MSC.	95
8.9) Anexo 9. Efecto del uso de hPL inactivados sobre el inmunofenotipo.....	96
8.10) Anexo 10. Ejemplos de estudios de estabilidad sobre lisados plaquetarios.	97
8.11) Anexo XI: Artículos relacionados con la tesis.....	98

Abreviaturas y acrónimos

ADP: adenosín difosfato

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Producto Sanitario

Alb: Albúmina

BC: buffy - coat

BSE: Encefalopatía espongiforme bovina

CAT: Comité de Terapias Avanzadas

CP: concentrados de plaquetas

CTGF: Factor Crecimiento Tejido Conectivo

D: duplicaciones

DMEM: "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"

DT: "Doubling Time" o tiempo de duplicación

EBMT: European Society for Blood and Marrow Transplantation

EC: "European Commission" o Comisión Europea.

EICH: enfermedad injerto contra huésped

EMA o EMEA: Agencia Europea del Medicamento

EGF: Factor Crecimiento Epidérmico

EU: unidades de endotoxina

EudraCT: European Union Drug Regulating Authorities Clinical Trials Database

FBS: Fetal Bovine Serum o Suero Fetal Bovino.

FC: Factor de crecimiento

FGFb: "Basic fibroblast growth factor" o Factor Crecimiento Fibroblástico básico

hFB: Fibroblastos dérmicos humanos

hPL: "Human Platelet Lysate" o Lisado plaquetario humano

hUC-MSCs: "Human umbilical cord Mesenchymal Stem Cells" o Células madre mesenquimales humanas procedentes de cordón umbilical

h: hora

IgG: inmunoglobulina G

ISBT: "International Society of Blood Transfusion" o Sociedad Internacional de Transfusión Sanguínea.

ISCT: "International Society for Cell and Gene Therapy" o Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica.

LAL: Solución de lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*

min: minutos

MSCs: "Mesenchymal Stem Cells" o células mesenquimales

hAT-MSCs: "human adipose-derived mesenchymal stem cells" o células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.

hBM-MSCs: "human bone marrow-derived mesenchymal stem cells" o células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.

MTAs: Medicamentos de Terapias Avanzadas

NCF: Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea

NEAA: aminoácidos no esenciales

P0: pase 0

PAS: solución aditiva de plaquetas

pb: pares de bases

PBS: "phosphate buffered saline" o tampón fosfato salino

PDGF: "Platelet derived growth factor" o Factor Crecimiento Derivado de Plaquetas

Ph. Eur.: European Pharmacopoeia, Farmacopea Europea.

Plt: plaqueta

Pt: proteína total.

PRP: plasma rico en plaquetas

PRT: "Pathogen Reduction Treatment" o tratamiento de reducción de patógenos

RT: "room temperature" o temperatura ambiente

SEM: error estándar de la media

TCID50: dosis infectiva del 50% de un virus en cultivo celular

TA: tejido adiposo

TGFb: Factor Crecimiento Transformativo b

TSE: "tissue spongiform encephalopathies" o Enfermedad de la encefalopatía espongiforme

UE/mL: unidades de endotoxinas por mililitro.

UPRC: Unidad de Producción y Reprogramación Celular.

UV: ultravioleta

vCJD: "variant Creutzfeldt-Jakob disease" o Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

VEGF: "vascular endothelial growth factor" o Factor Crecimiento Endotelial Vascular

1) INTRODUCCIÓN

1.1) La sangre y sus derivados

1.1.1) El plasma: composición y función.

El plasma es la solución acuosa de la sangre que ocupa alrededor del 54% del volumen. Está constituido por electrolitos (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Cl^- , etc.), y solutos orgánicos (glucosa, aminoácidos, vitaminas, urea, creatinina, proteínas plasmáticas, etc.) que le dan una osmolaridad de 280-300 miliOsmoles/litro. Los valores de proteínas están entre 6 y 8,0 g/dL¹.

Entre las funciones de las proteínas plasmáticas están la hemostasia, el mantenimiento de la presión coloidosmótica del plasma, el equilibrio ácido-base, el transporte o la función de defensa. Existen diferentes métodos para caracterizar las proteínas. Uno de los más empleados es mediante electroforesis del suero dónde se elimina el fibrinógeno por coagulación, obteniendo 5 grupos: Albúminas (50-60%), α_1 globulinas (4-8%), α_2 globulinas (8-10%), β globulinas (10-15%) y γ globulinas (15-20%)² (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación electroforética de las proteínas plasmáticas

α_1 globulinas	α_2 globulinas	β globulinas	γ globulinas
α_1 antitripsina α_1 lipoproteína α_1 glicoproteína proteína fijadora de hormonas tiroideas	α_2 macroglobulina haptoglobina ceruloplasmina α_2 lipoproteína eritropoyetina protrombina	B lipoproteínas C3 y C4 inactivadores de la esterasa C1 hemopexina transferrina	inmunoglobulinas IgA, IgM, IgG, IgD e IgE proteína C reactiva

1.1.2) Productos plasmáticos

Los derivados plasmáticos se utilizan cuando es necesario reponer alguno de los componentes plasmáticos. La forma más habitual de obtener el plasma es a partir de sangre total, en el proceso de fabricación de otros componentes como son los concentrados de hematíes o las plaquetas³.

El plasma fresco congelado es el más producido en los centros transfusionales de sangre y que está destinado a la transfusión en pacientes. Este se obtiene de donante único a partir de una unidad de sangre total o por aféresis, tras la separación de los hematíes. Después de la donación de las muestras, estas deben mantenerse un máximo de 24 horas refrigeradas a 2-4°C antes de ser congeladas. La congelación debe realizarse en un periodo de tiempo (< 1 hora) y a una temperatura ($\leq -30^\circ\text{C}$) que aseguren un correcto mantenimiento de los factores lábiles de la coagulación⁴.

Acorde a lo establecido en el Real Decreto 1088/2005, tras la extracción del plasma, se realizan las pruebas serológicas en las muestras. Tras ello, el plasma fresco se congela y se mantiene en

cuarentena durante 4 meses. Transcurrido este período se repite de nuevo un test serológico a cada una de las unidades para descartar posibles virus presentes en el momento de la donación y que no pudieron ser detectados tras el primer test serológico. El periodo de cuarentena está establecido en 4 meses gracias a las técnicas NAT (técnica de amplificación nucleica) para detectar el VHC⁴.

Existen varios productos de plasma dependiendo del método de obtención y del uso para el cual está destinados⁴:

- Plasma fresco descongelado: procede de un plasma fresco congelado sometido a una descongelación a 37°C y es estable hasta 5 días a una temperatura entre 2-6°C, excepto para los factores termolábiles (FV y FVIII).
- Plasma fresco congelado: destinado al fraccionamiento industrial y debe cumplir los requisitos establecidos entre el centro de transfusión y la empresa. Los componentes plasmáticos congelados se deben almacenar a $\leq -25^{\circ}\text{C}$ hasta 36 meses y entre -18 y -25°C hasta 3 meses.
- Crioprecipitado de plasma: es el componente plasmático obtenido de la precipitación de las proteínas después de la descongelación del plasma fresco congelado. Se concentran y se suspenden en un pequeño volumen de plasma.
- Plasma sobrenadante de crioprecipitados: es el obtenido tras la separación del crioprecipitado. Tiene reducidos los factores V, VIII y fibrinógeno.

1.1.3) Plasma Rico en Plaquetas y sus derivados:

Los concentrados de plaquetas utilizados con fines terapéuticos empezaron a denominarse plasma rico en plaquetas (PRP) y se definía como un volumen de plasma autólogo que contenía una concentración de plaquetas superior al nivel basal (150.000-350.000/ μL)⁵.

Los métodos de obtención del PRP son muy variados, desde procesos manuales o automáticos, sistemas abiertos o cerrados, mediante centrifugación simple, doble o por filtración selectiva de los componentes sanguíneos. Se puede activar sometiéndolo a ciclos de congelación descongelación, mediante trombina o compuestos de calcio o aplicarlo sin activar⁶. Esto implica que la composición sea muy dispar. Normalmente no contienen eritrocitos, los leucocitos pueden estar ausentes, tener la concentración fisiológica o superior. El contenido en plaquetas puede variar desde por encima de 8 veces el de sangre periférica a ausencia de plaquetas intactas. Los factores de crecimiento plasmáticos y plaquetarios se encontrarán en concentraciones muy diferentes, no existiendo consenso muchas veces en la eficacia del PRP en determinadas patologías⁶.

Otra clasificación del PRP es la propuesta por Dohan Ehrenfest⁷ en cuatro grupos como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2: Clasificación del Plasma Rico en Plaquetas

P-PRP <i>Pure Platelet-Rich Plasma o Plasma rico en plaquetas puro</i>	L-PRP <i>Leucocyte and Platelet-Rich Plasma o Plasma rico en plaquetas y leucocitos.</i>	P-PRF <i>Pure Platelet-Rich Fibrin o Fibrina rica en plaquetas pura.</i>	L-PRF <i>Leucocyte and Platelet-Rich Fibrin o Fibrina rica en plaquetas y leucocitos.</i>
Ausencia leucocitos. Red fibrina baja densidad. Centrifugación sangre venosa. Se desecha parte superior plasma. Con pipeteado manual se recoge el plasma rico en factores por encima de la capa leucocitaria. La polimerización de la fibrina con cloruro cálcico al 10%. Métodos de menor coste y menor precisión.	Red fibrina baja densidad. Primera centrifugación separación sangre en tres componentes. El PPP y <i>buffy coat</i> a una segunda centrifugación a alta velocidad. Sistemas automáticos.	Ausencia leucocitos. Red de fibrina alta densidad. Primera centrifugación a alta velocidad con gel separador (disminuye los leucocitos). El PPP y <i>buffy coat</i> a una segunda centrifugación con cloruro de calcio, obteniéndose un coágulo. Método costoso.	Red de fibrina alta densidad. Centrifugación a baja velocidad de la sangre que provoca la activación plaquetaria y la formación del coágulo de fibrina.

PPP: plasma pobre en plaquetas

1.2) La plaqueta: composición y función.

Las plaquetas son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo derivados de sus precursores los megacariocitos⁸. Las plaquetas son células metabólicamente activas, ya que poseen retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias. Las plaquetas pueden sintetizar proteínas a partir del ARN de su interior y este proceso está regulado por micro-ARNs silenciadores a través de la activación plaquetaria⁶.

En la composición total de la plaqueta se haya más de 800 proteínas y moléculas diferentes (citoquinas, quimioquinas, proteínas de membrana, metabolitos, moléculas mensajeras, factores de crecimiento o proteínas solubles). En el citoplasma encontramos cuatro tipos de gránulos: gránulos α , gránulos densos, lisosomas y gránulos T. En ellos se encuentran factores hemostáticos como el fibrinógeno, factores angiogénicos como la angiogenina, factores antiangiogénicos como la angiostatina, proteínas inmunitarias como el inhibidor de C1, quimioquinas proinflamatorias como la IL-8 o proteínas con actividad bactericida como las hidrolasas⁶. La desgranulación por la activación plaquetaria se produce *in vivo* tras la adhesión de la plaqueta a las proteínas del vaso dañado y el aumento de la concentración de calcio intracelular⁶. Entre sus principales funciones están participar en la hemostasia, la inflamación, la inmunidad, la regeneración tisular y en la angiogénesis⁹. La tabla 3 resume los factores de crecimiento (FC) procedentes de las plaquetas y sus funciones¹⁰:

Tabla 3: Principales factores de crecimiento contenidos en las plaquetas

Factor de crecimiento (FC)	Origen	Función
FC Transformativo b (TGF b)	Plaquetas, matriz ósea y cartilaginosa, macrófagos, monocitos, neutrófilos, "natural killers" y células TH1 activadas.	Proliferación de células mesenquimales indiferenciadas; inhibición de la proliferación linfocitaria y macrofágica; interviene regulando: - Mitogénesis endotelial, fibroblástica y osteoblástica. - Síntesis de colágeno y secreción de colagenasas. - Efecto mitogénico de otros FC. - Quimiotaxis endotelial y angiogénesis.
FC fibroblástico básico (FGFb)	Plaquetas, macrófagos, células mesenquimales, condrocitos y osteoblastos.	Estimula mitogénesis, crecimiento y diferenciación de condrocitos y osteoblastos y la mitogénesis de células mesenquimales.
FC derivado de plaquetas (PDGF)	Plaquetas, osteoblastos, células endoteliales, macrófagos, monocitos, células musculares lisas.	Estimula mitogénesis de células mesenquimales y osteoblastos; mitogénesis y quimiotaxis de células estirpe fibroblástica, glial y muscular lisa; regula secreción colagenasas; estimula mitogénesis mesenquimal y epitelial.
FC del endotelio vascular (VEGF)	Plaquetas, células endoteliales.	Incrementa angiogénesis, permeabilidad vascular y mitogénesis de células endoteliales.
FC tejido conectivo (CTGF)	Plaquetas.	Promueve angiogénesis, regeneración condral, fibrosis y adhesión plaquetaria.
FC epidérmico (EGF)	Plaquetas, macrófagos y monocitos.	Estimula quimiotaxis endotelial y angiogénesis; regula secreción de colagenasas; estimula mitogénesis de células mesenquimales y epiteliales.
FC insulínico típico I (IGF)	Células Madres Mesenquimales.	Acción estimuladora de la síntesis de matriz ósea y actúa como agente quimiotáctico que favorece la neovascularización. De forma general, estimula el crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular

1.2.1) Productos plaquetarios y sus métodos de obtención.

Las plaquetas disponibles para transfusión se obtienen por dos métodos diferentes¹¹:

1. Concentrados de plaquetas recuperadas obtenidos a partir de donaciones de sangre total. Dependiendo del tipo de fraccionamiento realizado pueden encontrarse en forma:

a) Individual: obtenidas a partir del plasma rico en plaquetas o de la capa leucoplaquetar de una única donación de sangre total. Contienen entre $0,45-0,80 \times 10^{11}$ plaquetas suspendidas en un volumen de plasma que varía entre 50 y 70 mL.

b) Mezcla: la mayoría de los centros de transfusiones de nuestro país utilizan este método. Tras la centrifugación de la unidad de sangre total, se obtiene la capa leucoplaquetaria que contiene la mayoría de las plaquetas y leucocitos, ésta se resuspende, o bien sólo en plasma o en plasma y una solución aditiva para plaquetas (aproximadamente en una proporción plasma/solución aditiva: 35%/65%), y se vuelve a centrifugar para eliminar restos de hematíes y leucocitos. Mezclando de 4 a 6 de estos componentes, mediante dispositivos estériles, se consigue una unidad terapéutica de plaquetas, con un contenido mínimo de $2,5 \times 10^{11}$ plaquetas por concentrado.

2. Plaquetas obtenidas por aféresis: son suspensiones de plaquetas obtenidas de un donante único mediante procedimientos de aféresis. Deben contener más de $2,5 \times 10^{11}$ plaquetas por concentrado. Las plaquetas se almacenan entre 20-24°C en agitación suave hasta un máximo de 5 días, ampliable a 7 si se realiza reducción de patógenos⁴.

1.2.2) Lisado plaquetario humano

El lisado plaquetario humano (hPL) es un complejo proteico líquido, rico en nutrientes y factores de crecimiento que se obtiene por la lisis o activación (desgranulación) de los concentrados plaquetarios¹².

Los **métodos de lisis** podrán ser a través de ciclos de congelación-descongelación¹³, por sonicación¹⁴ (por ejemplo 30min 20kHz), o tratamiento con disolventes/detergentes¹⁵. Por otro lado está la activación plaquetaria con cloruro de calcio o con trombina humana o recombinante, aunque la efectividad es menor que con la lisis y para una fabricación que cumpla los estándares GMP puede ser más complicada¹⁶. El cloruro de calcio activa la vía endógena de la trombina (también se puede utilizar trombina para activar); el calcio provoca la activación de la cascada de coagulación y la desgranulación de las plaquetas, formándose un coágulo de fibrina que se elimina por centrifugación obteniéndose un re-lisado rico en factores plaquetarios, siendo el contenido en proteínas distinto al lisado obtenido por otros métodos¹⁷.

Además el número de ciclos de congelación/descongelación, las temperaturas de los ciclos podrán modificar también los factores plaquetarios liberados¹⁸.

Otros factores a definir en la producción del lisado son el porcentaje de plasma, el uso de plaquetas caducadas o frescas, los grupos sanguíneos utilizados o el tipo de disolvente del lisado que pueden influir en la proliferación celular¹⁹.

El interés por la **estandarización** en la producción del lisado y su calidad ha llevado a la *American Association of Blood Banks* (AABB) y la ISCT a crear un grupo de trabajo²⁰. Los pasos para la estandarización⁹ del lisado podrían ser identificar los elementos claves del proceso de producción, definir las especificaciones con valores objetivos, validar el proceso propuesto estandarizado entre distintos fabricantes y ver si es compatible con los requerimientos del mercado. Debe existir una flexibilidad en la definición de la consistencia, pues la variabilidad entre lotes, puede que no sea significativa en la eficacia del lisado.

El grupo de trabajo de Terapia Celular de la ISBT¹² propone asegurar la calidad de la fabricación del lisado por un sistema de calidad según las Normas de Correcta Fabricación (NCF) de los medicamentos de terapia celular y los biológicos, y que son tan estrictas como las que regulan la producción de los hemoderivados para donación. Esto aseguraría la consistencia del producto, al estar bien definido en todas sus etapas su proceso de fabricación. Cualquier cambio en este proceso, puede provocar sea distinto en su mecanismo de acción o en el contenido de factores esenciales.

Schallmoser⁹ afirma que los requisitos de trazabilidad, origen biológico, seguridad vírica, están contemplados en la normativa que cumple un Banco de Sangre.

En la tabla 4 se muestran ejemplos de fabricantes de lisados. La diferencia entre grado de investigación o uso clínico, aunque los dos se hayan producido de la misma forma, radica en los controles de liberación, que son más robustos para uso clínico.

Tabla 4: Ejemplos de centros fabricantes de lisado plaquetario

Centro	Tipo de autorización	Observaciones
Centro de Terapia Celular G. Lanzani. Bergamo, Italia.	AIFA Agencia italiana del medicamento GMP	Expansión de células mesenquimales de distintas fuentes http://www.siesonline.it/
Hospital San Camillo Forlanini, Roma, Italia	investigación	http://www.scamilloforlanini.rm.it/
Hematología del Hospital Universitario de Salamanca	AEMPS GMP	La producción del lisado está incluida dentro del IMPD/PEI https://hematosalamanca.es
Instituto de Ingeniería Tisular de Taipei Taiwan.	investigación	http://gibmt.tmu.edu.tw/
Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah, EEUU	FDA GMP	https://medicine.utah.edu/
Centro de donaciones de la Cruz Roja en Sidney, Australia	En proceso de obtener uno GMP para uso clínico	www.lifeblood.com.au
Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria	investigación	https://i-med.ac.at/patienten/index.html.en
Unidad GMP del departamento de Medicina Transfusional en la Universidad	BASG/AGES Agencia austríaca para la Salud y la Nutrición Certificado GMP	https://www.pmu.ac.at/en/home.html

Parcelso de Salzburgo, Austria		
Laboratorio de Terapia Celular en el Centro de Transfusiones de Helsinki, Finlandia	Dentro de la licencia de fabricación de un MTA aprobado como Exención Hospitalaria GMP	https://eatris.eu/institutes/finnish-red-cross-blood-service/
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunogenética de Ulm, Alemania	GMP para uso clínico Está cuarentenado	https://www.blutspende.de/en/institutes-affiliates/ulm/ulm.php
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunología de Mannheim, Alemania	Investigación	https://www.blutspende.de/en/institutes-affiliates/mannheim/mannheim.php
Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga, Alemania	Licencia por PEI (Paul-Ehrlich-Institute) GMP	https://www.blutspende.de/en/institutes-affiliates/tuebingen/tuebingen.php
Unidad del Banco de sangre del hospital Landspítali en Reikiavik, Islandia	No licencia	https://www.landspitali.is/um-landspitala/languages/landspitali-the-national-university-hospital-of-iceland/

1.3) Seguridad en los hemoderivados sanguíneos.

La seguridad de una hemodonación viene regulada en España a través del **Real Decreto 1088/2005**, de 16 de septiembre, dónde se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. La mejor garantía para la calidad y seguridad para el donante y el receptor son el altruismo y la voluntariedad. Este real decreto incorpora al ordenamiento jurídico español, la Directiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establecen normas de calidad y de seguridad para la extracción, verificación, tratamiento, almacenamiento y distribución de sangre humana y sus componentes, así como la Directiva 2004/33/CE, de la Comisión, por la que se aplica la Directiva 2002/98/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a determinados requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneos.

En el **Anexo I** del Real Decreto 1088/2005, se detallan los criterios por los que se excluye un donante según las **enfermedades** que haya padecido o situaciones vitales que supongan un riesgo de contraer una infección. En cada donación de sangre y componentes sanguíneos se realizarán las pruebas analíticas recogidas en el **Anexo III** del Real Decreto 1088/2005, entre las **pruebas de detección** de agentes infecciosos están las pruebas serológicas de la sífilis, el antígeno AgHBs de la hepatitis B, para la hepatitis C, los anticuerpos anti-VHC y para el VIH I/II, pruebas de amplificación genómica del ácido nucleico (NAT) junto con los anticuerpos anti-VIH I/II, además de la pruebas necesarias para detectar portadores de otros agentes infecciosos en determinados donantes por sus circunstancias epidemiológicas concretas. Las técnicas utilizadas en estas pruebas deberán tener, en cada momento, un nivel óptimo de sensibilidad y especificidad, y los reactivos empleados en ellas cumplirán la normativa sanitaria nacional.

En la **Orden SCO/322/2007**, de 9 de febrero, se establecen los requisitos de **trazabilidad** y de notificación de **reacciones y efectos adversos** graves de la sangre y de los componentes sanguíneos. Mediante esta disposición se incorpora al ordenamiento jurídico interno la Directiva 2005/61/CE de la Comisión, de 30 de septiembre.

Los principales **patógenos que encontramos** en los hemoderivados según Schlenke²¹ son los arbovirus y la contaminación por bacterias de las plaquetas. Según Schallmoser¹², las principales causantes de las enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión son las bacterias como las espiroquetas de la sífilis, los parásitos como *Babesia microti*, *Plasmodium*, *Leishmania*, o *Trypanosoma cruzi* y los virus.

Entre las medidas para prevenir la contaminación microbiológica en los derivados sanguíneos están la selección de los donantes, los análisis específicos de determinación de virus, la descontaminación en la obtención de los concentrados, los análisis de esterilidad y la reducción de patógenos¹².

Una de las ventajas que presenta el uso de lisado plaquetario frente al uso de concentrados de plaquetas, es que, en su fabricación mediante ciclos de congelación y descongelación, los parásitos se destruyen. Sin embargo, el principal problema en la seguridad de estos productos son los virus. Entre las infecciones víricas más frecuentes transmitidas por los hemoderivados están los provocados por Virus con envuelta lipídica (VIH, VHB, VHC, etc.) y virus sin envuelta (VHA, VHE o el parvovirus B19). Por lo tanto, se hace necesario aplicar métodos de reducción de patógenos²².

1.4) Métodos de reducción de patógenos empleados en hemoderivados

Existen diferentes métodos de reducción de patógenos en hemoderivados. A continuación, se detallan las más relevantes:

Adición de azul de metileno: técnica tradicional empleada para la reducción de patógenos en plasma fresco, entre las ventajas están su alta eficacia contra los virus encapsulados y que es un procedimiento económico y sencillo. Y entre los inconvenientes la hipotética toxicidad del colorante y la pérdida de proteínas coagulantes FII y FVIII²³.

Adición de disolventes y detergentes (S/D): técnica tradicional empleada para la reducción de patógenos en plasma fresco. Un ejemplo del uso de (S/D) durante la obtención de lisado plaquetario es el utilizado por la patente de Burnouf²⁴. Se produce la inactivación de virus con envoltura lipídica además de liberación masiva de los factores de crecimiento de los gránulos α plaquetarios por la acción conjunta del disolvente/detergente. El procedimiento conserva la actividad funcional de las proteínas y no modifica el contenido en las proteínas principales, tales como Albúmina e inmunoglobulinas. El inconveniente de este método es que, concentraciones elevadas en el disolvente (tri-n-butilfosfato) y/o detergentes (Tritón X-45, Tritón X-100, Tween 80 y Tween 20) empleados están directamente relacionadas con una toxicidad prolongada y más particularmente con la aparición de afecciones neurológicas. En este caso, la eliminación de los virus sin envuelta lipídica se realiza por nanofiltración usando una membrana de filtro de tamaño de poro de 75nm, 35nm, 20nm, 15nm o 10nm.

Métodos patentados que utilizan radiación ultravioleta (UV): INTERCEPT (Cerus Corporation, Concord, CA, USA), MIRASOL® (Terumo BCT, Lakewood, CO, USA), y THERAFLEX® UV (Macopharma, Mouvoux, France).

- La tecnología de **Intercept** consiste en un psoraleno sintético, amotosalen S-59 que atraviesa las membranas celulares, las paredes bacterianas y las envueltas lipídicas. Se une al ADN de doble hélice y al ARN y después de exponerse a una luz UV-A (320-400nm, 3 J/cm²) produce uniones covalentes en los ácidos nucleicos que impiden su replicación o transcripción sin producir especies oxidantes. El psoraleno se encuentra en las limas y en el apio. El S-59 no unido y los fotoproductos son absorbidos por el equipo. En general produce una buena inactivación excepto para los virus sin envuelta de la hepatitis A y E que tienen resistencias²⁵.
- La técnica de **Mirasol** utiliza la vitamina B2 o riboflavina a una concentración final de 50 µmol/L y la posterior aplicación de luz UV- A y B (280 -400nm, 6,2 J/mL que equivale a 5 J/cm²) en muestras de plasma fresco y concentrados de plaquetas. Ventajas: la riboflavina es una sustancia no tóxica e inocua para el organismo ya que se encuentra en los alimentos y en la sangre. Desventajas: La riboflavina puede provocar la oxidación de los ácidos nucleicos sin unirse a ellos por transferencia de electrones, produciendo daños irreversibles y generando fotoproductos. En el tratamiento del plasma puede producir reactantes oxidativos que afecten a los factores de coagulación (VIII y fibrinógeno) y enzimas como ADAMTS13. A pesar de ello, diversos estudios garantizan la seguridad de la riboflavina²⁶. Por otro lado, la formación de especies reactivas oxidantes se puede minimizar evitando las burbujas de la bolsa tratada y por la selección de la longitud de onda.
- La técnica de **Theraflex** utiliza sólo un rango estrecho de luz UV –C (254nm, 0,2 J/cm² con un tiempo de irradiación < 1min). Esto provoca la formación de dímeros de pirimidina. Ventajas: Al no añadir ningún compuesto no presenta problemas de toxicidad. Desventajas: En el tratamiento del plasma se necesita aplicar mayor intensidad de luz UV por el efecto quenching (atenuación de la fluorescencia) de algunas proteínas plasmáticas.

Los tres han conseguido estar aprobados para su uso como **productos sanitarios** (certificado de conformidad con la directiva de la Comunidad Económica Europea 93/42/CEE, **marcado CE**), por ejemplo, Intercept tiene un marcado CE clase III (productos sanitarios de alto riesgo) para plaquetas y plasma, Mirasol marcado CE clase IIb (productos sanitarios de riesgo severo) para plaquetas y plasma y Theraflex marcado CE clase IIb sólo para plaquetas.

Aplicación de radiación gamma²⁷: La energía absorbida durante la irradiación se mide en kilograys (kGy), y depende del tiempo de exposición, de la dosificación de la radiación, de la densidad y el tamaño del producto. Desventajas: el proceso genera radicales libres que rompen el ADN de los microorganismos presentes impidiendo su multiplicación. Ventajas: Se ha mostrado efectiva frente al VIH, VHA, el virus de la diarrea viral bovina y el parvovirus porcino. Y no es necesario añadir ningún aditivo.

Acorde a lo indicado en la guía de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) sobre medicamentos derivados de plasma²⁸(CHMP/BWP/706271/2010), lo más efectivo es combinar dos tipos de inactivación vírica, una contra los virus con envuelta y otro sin envuelta. Esto dependerá del nº de donantes y del rango de eficacia de inactivación del método entre otros.

Entre ellos están los métodos que emplean la radiación UV y la combinación con una sustancia fotoactiva que produce un daño irreversible en el ácido nucleico, impidiendo con ello la multiplicación de los patógenos. Los métodos de inactivación sobre todo reducen las bacterias, los virus con envuelta y los protozoos, siendo menos eficaces para las esporas, virus desnudos y priones¹⁶. Los factores determinantes a la hora de elegir un método de reducción de patógenos son que sea fácil de usar, mantener la calidad celular, niveles de reducción de patógenos, y toxicidad²².

En la tabla 5 se muestran algunos de los métodos de reducción de patógenos más empleados por centros fabricantes de lisado plaquetario.

Tabla 5: Ejemplos de métodos de inactivación de patógenos empleados en centros fabricantes de lisado plaquetario.

Centro	Método
Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria	Amotosalen/ UV
Unidad GMP del departamento de Medicina Transfusional en la Universidad Paracelso de Salzburgo, Austria	Radiación gamma 30Gy
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunogenética de Ulm, Alemania	Radiación gamma 30 Gy
Unidad del Banco de sangre del hospital Landspítali en Reikiavik ,Islandia	Intercept
Hospital San Camillo Forlanini, Roma, Italia	Intercept

1.5) Normativa que aplica al lisado plaquetario como medicamento biológico.

La **Directiva 2001/83/CE**, de 6 de noviembre, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano y la **ley 29/2006**, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios, definen medicamento de uso humano, como “toda sustancia o combinación de sustancias que se presente poseedora de propiedades para el tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos o que pueda usarse en, o administrarse a, seres humanos con el fin de restaurar, corregir o modificar las funciones fisiológicas ejerciendo un acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico”.

La clasificación del lisado plaquetario como medicamento de uso humano tiene que ver con el mecanismo de acción postulado, así como a sus fines o indicaciones. Por lo tanto, el hecho de obtenerlo mediante una u otra técnica no cambia su consideración como medicamento de uso humano. Este producto tampoco puede considerarse como medicamento de terapia avanzada de acuerdo con la definición dada por el **Reglamento (CE) nº 1394/2007** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de noviembre de 2007, sobre medicamentos de terapias avanzadas, ya que las plaquetas, desde el punto de vista regulatorio, no se consideran células. Es cierto que algunos preparados, pueden contener leucocitos. Sin embargo, en el mecanismo de acción propuesto para estos productos, estos leucocitos no suelen tener ningún papel o juegan, como mucho, un papel secundario.

Por otro lado, el lisado plaquetario fabricado a partir de diversas donaciones, tampoco entraría en el marco del artículo 5 de la Directiva 2001/83/CE y las disposiciones legales que trasponen dicha Directiva en nuestro país, en el que la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios ha clasificado el “plasma autólogo y sus fracciones, componentes o derivados” como medicamento de uso humano pero no medicamento de producción industrial⁸.

La Resolución de 23 de mayo de 2013 de la Directora de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), solamente afecta al plasma autólogo. El uso terapéutico no sustitutivo de cualquier otro producto basado en plasma no autólogo recibiría el tratamiento de medicamento biológico susceptible de ser producido industrialmente y su autorización estaría regulada por el **Real Decreto 1345/2007, de 11 de octubre**, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y condiciones de dispensación de los medicamentos de uso humano fabricados industrialmente.

1.5.1) Normas de Correcta Fabricación (NCF)

El principio básico que guía la autorización de cualquier medicamento es que cumpla con las debidas garantías de calidad, seguridad y eficacia⁸.

El método empleado para la obtención del medicamento deberá ser evaluado desde el punto de vista de calidad; se deberá solicitar una inspección a la autoridad competente, la cual deberá verificar la adecuación de las instalaciones y de las actividades de preparación efectuadas, tomando como referencia lo establecido en las **Normas de Correcta Fabricación** de la Unión Europea (NCF o GMP)²⁹.

Las instalaciones de fabricación y control de dichos medicamentos deberán obtener un certificado de cumplimiento de dichas normas emitido por la AEMPS. Acorde a lo establecido por las NCF, estas normas se recogen en diferentes anexos que hacen referencia a aspectos tales como:

- **Personal:** debe estar formado en las NCF, en la fabricación aséptica, en la vestimenta e higiene en las distintas zonas según el grado A/B/C/D.
- **Locales y equipos** deben estar diseñados para minimizar tanto la contaminación interna como la cruzada. Las áreas limpias se cualifican según la ISO 14644-1. Se debe verificar en los procesos críticos la calidad del aire, monitorizando las partículas viables y no viables. También se debe monitorizar la temperatura, las diferencias de presiones entre salas y verificar la integridad de los filtros HEPA.
- **Documentación:** se establecen, se controlan o se registran todas las actividades que afecten directa o indirectamente a la calidad del medicamento y con ella se asegura la trazabilidad.
- **Registros:** proporcionan evidencia de que se ha realizado lo que está definido en la documentación.
- **Materias primas** utilizadas deben cumplir los requisitos establecidos y aprobadas por el departamento de calidad.
- **Validación del proceso productivo y del proceso aséptico:** ambos deben estar controlados y documentados minuciosamente. Se realiza un **proceso de validación** del proceso aséptico con pruebas de simulación. Y una validación de la reproducibilidad del proceso, realizando la producción de 3 lotes consecutivos.

- **Liberación** de los lotes deben evaluarse las etapas de fabricación, las materias primas utilizadas, la monitorización ambiental y del personal de producción, los controles de calidad realizados, las desviaciones que se hayan producido, para poder emitir la certificación de lote del producto terminado.

1.6) Lisado plaquetario empleado como materia prima de origen biológico para la producción de medicamentos de terapias avanzadas (MTA).

Los requisitos mínimos que deben contemplarse en la caracterización de un producto de lisado plaquetario empleado como materia prima se indican en el **Capítulo General 5.2.12 de la Farmacopea Europea Ph. Eur. Materias primas de origen biológico para la producción de medicamentos de base celular y de terapia génica**³⁰. Este capítulo establece una estrategia en la cualificación del material sabiendo que puede influir en la eficacia y seguridad del medicamento y la necesidad de definir sus especificaciones, para asegurar la reproducibilidad y consistencia en su proceso de producción.

La responsabilidad de evaluar la calidad del material de partida es tanto del fabricante del material como del que lo vaya a usar para la producción del MTA³⁰. Mediante un análisis de riesgo del uso del material en la producción del medicamento, se evalúa la seguridad, calidad y eficacia, ya que ningún grupo de ensayos puede asegurarlo. Por ejemplo, el riesgo que puede causar en el paciente trazas de este material, como reacciones inmunes adversas.

El conocimiento científico sobre el material es la base para elegir los parámetros que informan sobre la calidad. Los límites definidos se establecen a través de los resultados de los ensayos de caracterización y de lo publicado sobre la funcionalidad del material. Siendo preferible los valores numéricos por las agencias reguladoras. Caracterizar bien el material de partida también es útil para cuando sea necesario cambiar de proveedor.

Los aspectos a tener en cuenta según el capítulo 5.2.12 Ph. Eur. son:

- a) **La identidad**: la naturaleza físico-química, biológica o inmunoquímica del material. Para la caracterización del lisado debido a la imposibilidad de conocer su composición exacta, se sugiere determinar la concentración de **proteínas** y determinar su patrón característico electroforético o un **marcador específico de las plaquetas**. Otros aspectos de la identidad son: la **apariencia**, grado de opalescencia (capítulo 2.2.1 Ph. Eur.) o color (capítulo 2.2.2 Ph. Eur.), la **osmolalidad** (capítulo 2.2.35 Ph. Eur.) o el **pH** (capítulo 2.2.3 Ph. Eur.). Tanto las proteínas, como el pH o la osmolalidad son críticos para el crecimiento celular. Además, se puede completar con los parámetros bioquímicos que también reflejan consistencia del lisado, como son las concentraciones de **lípidos**, **glucosa** o **electrolitos**. Estos valores van a afectar el medio de cultivo de las células.
- b) **La determinación de impurezas**: sustancias relacionadas con el proceso de producción, por ejemplo, la obtención del re-lisado por la adición de una sustancia que favorezca la liberación de los factores plaquetarios como puede ser el ADP, la trombina o el calcio. Otro tipo de impurezas son las relacionadas con el producto como la hemoglobina, que se puede determinar cuando sea relevante (aunque no se conocen los efectos de la hemoglobina o el hierro en los cultivos). O el contenido de leucocitos o de eritrocitos, los lisados de *buffy coat* contienen mayor cantidad de leucocitos y eritrocitos que los de aféresis¹⁹. El capítulo 5.2.12 Ph. Eur. hace hincapié en los **aditivos de origen biológico**

como la heparina, se debe conocer bien su calidad, concentración y el impacto en el material de partida. La heparina evita la formación de coágulos en el lisado. Estos se producen por el fibrinógeno y los factores de coagulación presentes en el lisado y la liberación del calcio intracelular o el que contiene el medio de cultivo.

- c) **La actividad biológica:** debido a que son medios de una compleja composición, no se pueden dar datos de todos sus componentes, por lo que es necesario garantizar su consistencia y funcionalidad en cada lote. Se debe llevar a cabo comparando con un material de referencia o un lote representativo del material de partida. Los protocolos de actividad pueden variar dependiendo de la fuente celular utilizada, el nº de pases, la duración del cultivo o la concentración del lisado. Se debe demostrar el crecimiento celular que esté dentro de los límites para ese material. Puede ser necesario verificarlo con más de un tipo de ensayo, para considerar no sólo la proliferación, también la funcionalidad y potencia celular, por ejemplo, con ensayos de diferenciación celular o el análisis de la capacidad inmunosupresora de las células.
- d) **El control microbiológico:** se pueden seguir los capítulos 2.6.1 o 2.6.12 Ph. Eur. dónde se analiza la presencia de bacterias aerobias, anaerobias, levaduras y hongos. El control de las **endotoxinas** bacterianas se desarrolla en el capítulo 2.6.14 Ph. Eur., siendo el resultado satisfactorio un contenido menor a un límite definido por el fabricante. Por ejemplo, en el Instituto de Terapia Celular de la Universidad de Salzburgo¹⁶, han definido un umbral de 0,5 EU/mL. Para el grupo de Fekete³¹ el límite de endotoxinas para sus lisados fue de < 1 EU/mL. Para el control de **micoplasma** se debe consultar el capítulo 2.6.7 Ph. Eur. Y en este caso la especificación sería ausencia de micoplasma. Otro factor de riesgo a analizar son los **priones**. Como explica Schallmoser¹², son proteínas muy resistentes que producen infecciones en el sistema nervioso central, la enfermedad de la encefalopatía espongiforme (TSE). TSE incluye la encefalopatía espongiforme bovina BSE (en especial en las vacas) y su variante humana, la enfermedad de Creutzfeldt – Jakob (vCJD). Que fue consecuencia de comidas expuestas a BSE y por transmisión de la proteína infectiva llamada PrPT^{SE}. Hay documentados 4 casos de transmisión de vCJD entre humanos por transfusión asociados a concentrados que no fueron leucorreducidos^{32, 33}. También se conoce el caso de transmisión de la enfermedad a un paciente con hemofilia A, a través del tratamiento con factor VIII de baja pureza³⁴. Los riesgos en los lisados son mayores al no estar sometido a un proceso de fraccionamiento o nanofiltración como ocurre en la producción industrial de los factores de coagulación. Las medidas que propone el grupo de trabajo de la ISBT¹² son: evitar donantes que procedan de países de riesgo o susceptibles de haber comido alimentos contaminados, utilizar siempre leucorreducción para eliminar los linfocitos B que vehiculan los priones. Y una vigilancia epidemiológica activa, sería suficiente hasta el momento para el control de los lisados.
- e) **La seguridad vírica:** los ensayos a realizar en el lisado plaquetario están contemplados en la monografía 0853 Ph. Eur. *Plasma humano para fraccionamiento*. Estos son la determinación de los anticuerpos para el VIH-1, VIH-2, y VHC, la determinación del antígeno de superficie del VHB, y cuando se realice una mezcla de plasmas es necesaria además una determinación del ARN del VHC. A mayor número de donaciones aumenta el riesgo vírico, el capítulo 5.2.12 Ph. Eur. limita el número de donaciones que pueden ser mezcladas para evitar el riesgo de transmisión de agentes infecciosos, si no se inactiva el material final. Según el grupo de trabajo de la ISBT¹² los lisados deben someterse a nuevos test como son el VHA, VHE y VB19, según un análisis de riesgo, teniendo en cuenta el nº de donaciones y el tratamiento de reducción de patógenos.

- f) **El estudio de estabilidad:** necesario para asegurar que el material es seguro y funcional hasta la fecha de caducidad establecida. Se tienen que definir la caducidad y las condiciones de almacenamiento del material. El estudio de la estabilidad para un determinado uso es responsabilidad tanto del fabricante como del usuario³⁵. Por otro lado, en el etiquetado debe aparecer la fecha de caducidad, las condiciones de almacenamiento, el uso y un código que asegure la trazabilidad hasta su origen.

1.7) Aplicaciones clínicas del lisado plaquetario humano como medicamento biológico.

El interés terapéutico de los factores de crecimiento presentes en las plaquetas, se sitúa en los siguientes campos: odontología, cirugía maxilofacial^{36,37}, traumatología^{38,39}, medicina deportiva⁴⁰ y reumatología^{41,42}, cirugía plástica, medicina estética, oftalmología, cirugía vascular, neurocirugía, otorrinolaringología, urología, quemados, dermatología o cirugía torácica^{43,44,45}. La aplicación clínica se basa en los mismos mecanismos fisiológicos (de regeneración y reparación), que se producen de forma natural en los tejidos tras una lesión, favoreciéndose a una mayor velocidad. Los factores plaquetarios actúan en el sitio de la lesión reclutando células progenitoras e interactuando con ellas, favoreciendo su diferenciación y la angiogénesis¹⁹.

Actualmente, la mayoría de estas aplicaciones terapéuticas se realizan con plasma autólogo enriquecido en factores de crecimiento. Sin embargo, el lisado clínico alogénico también está siendo empleado en diferentes ensayos clínicos, como aparecen en la base de datos de ensayos clínicos *ClinicalTrials.gov* (tabla 6).

Tabla 6: Ensayos clínicos en los que se emplea lisado plaquetario humano alogénico como medicamento en investigación

Promotor	Título ensayo clínico	Identificador
Universidad Estatal de San Petersburgo	Colirio de lisado plaquetario alogénico en la afectación ocular crónica severa de la enfermedad injerto contra huésped	NCT05311514
Cambium Medical Technologies LLC Atlanta	Uso tópico de lisado plaquetario deplecionado de fibrinógeno en pacientes con ojo seco secundario a enfermedad de injerto contra huésped	NCT03414645
Hospital Nacional Universitario de Taiwán	Efecto del lisado plaquetario en la regeneración del epitelio corneal	NCT02720146
Instituto Ortopédico Galeazzi. Milán	Evaluación de la mejoría terapéutica en el tratamiento de la osteoartritis con MSC de tejido adiposo y lisado plaquetario	NCT04225481
Universidad de Jordania	Seguridad y eficacia del lisado plaquetario en la angiogénesis terapéutica para pacientes con enfermedad arterial periférica	NCT02941419
Universidad de Jordania	Lisado plaquetario alogénico desfibrinado inyectado en pacientes con úlcera de pie diabético	NCT02972528

Otro ejemplo de uso clínico, es el estudio realizado por el grupo de Beitia⁴⁶, que ha evaluado el uso del lisado para el tratamiento del síndrome de distrés respiratorio agudo producido por la enfermedad del coronavirus (COVID-19), teniendo en cuenta sus propiedades antiinflamatoria, inmunomodulatoria, antifibrótica y de reparación. Su trabajo demuestra que los niveles moleculares y actividad biológica del lisado se mantienen en la nebulización.

Adicionalmente, se ha confirmado mejoría con la aplicación del lisado plaquetario para lesión cerebral traumática. El ensayo preclínico realizado en ratas por el grupo de Nebie⁴⁷, observaron estimularon de la neurogénesis y la angiogénesis y se mejoró la función motora.

1.8) Aplicaciones clínicas del lisado plaquetario humano como materia prima en la fabricación de medicamentos de terapias avanzadas.

Las terapias celulares están en una continua expansión como se puede ver consultando los ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov). Entre las enfermedades tratadas se encuentran enfermedades hematológicas y neurológicas, autoinmunes, del hígado, riñón, pulmón, cardiovasculares, infecciosas, de reparación de cartílago y hueso¹⁶.

El grupo de López-Villar⁴⁸ de la unidad de Hematología en el hospital de Salamanca, utilizaron suero autólogo en su primer ensayo clínico para la expansión de células mesenquimales ,pero observaron un bajo crecimiento. En los siguientes ensayos clínicos que realizaron sólo utilizaron lisado como suplemento en los cultivos.

Un estudio comparativo de la producción de mesenquimales ha sido realizado por Trento⁴⁹ en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped. En el estudio participaron 17 centros pertenecientes a la Sociedad Europea para el Trasplante de Médula Ósea (EBMT). Este estudio puso de manifiesto que, un cambio significativo en la producción de MSCs para uso clínico, es la sustitución del FBS por el LP como complemento al medio de cultivo.

En la tabla 7 se muestran algunos ensayos clínicos de MTA que utilizan el lisado plaquetario como materia prima en su fabricación, extraídos de la base de datos europea *EudraCT* y de la estadounidense *ClinicalTrials.gov*.

Tabla 7: Ensayos clínicos con MTA que utilizan lisado plaquetario como materia prima

Promotor	Título ensayo clínico	Identificador
Servicio de cirugía plástica y quemados del Hospital Universitario de Copenhague	Proliferación de MSC de tejido adiposo con lisado plaquetario para la reconstrucción mamaria	EudraCT: 2014-000510-59
Instituto Nacional de Investigación en Salud y Medicina de Francia ⁵⁰	Evaluación de la eficacia y seguridad del injerto de un biomaterial combinado con MSC autólogas para mejorar la cicatrización ósea en pacientes con retraso en la consolidación de fractura de huesos largos, que requieren injerto de aposición o una alternativa ortobiológica	EudraCT: 2011-005441-13 NCT01842477

Universidad Autónoma de Madrid ⁵⁰	Evaluación de la seguridad del uso de células mesenquimales autólogas en la curación de la necrosis avascular de cadera	EudraCT: 2012-002010-39 NCT02065167
Universidad de Bergen (Holanda) ⁵⁰	Ensayo clínico en fase II, multicéntrico, internacional, aleatorizado, prospectivo: reconstrucción mandibular usando una combinación de biomaterial y MSC antes de la implantación dental	EudraCT: 2012-003139-50 NCT02751125
Centro Hospitalario Universitario de Montpellier ⁵⁰	Ensayo clínico en fase II, multicéntrico, doble ciego, aleatorizado, prospectivo para probar la eficacia de MSC de tejido adiposo (de 2 a 10 millones) en la osteoartritis de rodilla	EudraCT: 2015-002125-19 NCT02838069
Fundación Castellano Leonesa de Hematología y Hemoterapia	Tratamiento de citopenias postrasplante alogénico con infusión de células mesenquimales alogénicas expandidas in vitro	EudraCT: 2013-000534-35 NCT02104440
Centro Médico Universitario de Utrecht	Tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped resistente a los esteroides (grado II-IV) por infusión de MSC expandidas con lisado plaquetario	EudraCT: 2007-003341-32
Fundación Pública Andaluza Progreso y Salud. Red Andaluza de Diseño y Traslación de Terapias Avanzadas	Ensayo clínico con MSC para el tratamiento de EICH	EudraCT: 2014-005533-32 NCT02687646
M^a Consuelo del Cañizo Fernández-Roldán ⁵¹	Ensayo clínico en fase I/II de tratamiento de EICH refractaria mediante infusión de MSC alogénicas	EudraCT: 2005-003674-14 NCT00447460
Grupo Español de trasplantes hematopoyéticos y terapia celular ⁵²	Tratamiento de EICH refractaria por infusión secuencial de MSC expandidas in vitro	EudraCT:2010-020947-11 NCT01956903
Banco de Sangre de la Cruz Roja Finlandesa ⁵⁰	Exención hospitalaria con MSC para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped	N/A
Universidad Médica de Carolina del Sur	Co-trasplante de MSC e islotes pancreáticos en pacientes con pancreatitis crónica	NCT02384018

EICH: enfermedad injerto contra huésped

1.9) Ventajas de emplear lisado plaquetario humano frente a FBS

En estas terapias se necesita la expansión celular ex vivo de células progenitoras procedentes de diferentes tejidos. El objetivo de un medio de cultivo celular es obtener un alto nº de células en pases tempranos y que se pueda utilizar como uso clínico. Para ello se ha utilizado tradicionalmente medios de cultivo celular complementados con Suero Fetal Bovino (FBS). La principal función del suero en el cultivo celular es proporcionar hormonas que favorezcan la proliferación y/o la diferenciación celular y proporcionar proteínas transportadoras, minerales, elementos trazas, lípidos, factores estabilizadores y destoxicantes necesarios para mantener el pH o inhibir las proteasas. El FBS es preferido al suero de animales adultos por contener menor cantidad de inmunoglobulina G (IgG), que pueden inhibir la proliferación y la diferenciación⁵³. Además, la recomendación de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) es evitar el uso de materias primas de origen animal en las Terapias Celulares, como se refleja en la “**Guía de**

medicamentos humanos basados en células” (EMA/CHMP/410869/2006). Por ello, se hace necesaria la sustitución de estos suplementos por otras alternativas más seguras

El FBS tiene los inconvenientes de poder transmitir los patógenos bovinos y la presencia de xeno anticuerpos¹⁶. Se ha visto que en cultivo de células mesenquimales con lisado plaquetario, las células internalizan componentes plaquetarios, por lo que el uso del FBS podría producir problemas inmunitarios por las proteínas bovinas⁹. Otro inconveniente es no tener una composición bien definida que lleva a una gran variabilidad entre lotes y su elevado coste⁵⁴. Por otro lado están los problemas éticos en la forma de obtener el FBS¹⁶.

Otra ventaja del uso del LP como sustituto del FBS, es que se aprovechan los concentrados de plaquetas que han llegado a su caducidad. Esta es muy corta (5 a 7 días), debido a problemas de contaminación o disminución en la actividad hemostática.

Según la revisión de Burnouf⁵⁵ y colaboradores, entre un 5% y un 20% de todos los concentrados de plaquetas que se producen al año, se tienen que desechar por caducidad.

Como apunta Oeller¹⁶, utilizar concentrados de plaquetas que no se van a utilizar en la transfusión, tiene las ventajas del menor coste y mayor caracterización (han pasado todos los requisitos para la donación).

El hPL es el sustituto al FBS más empleado ya que se ha demostrado efectivo en la expansión de células estromales así como de otras líneas¹⁶. Es tan eficaz sino más que el FBS en la expansión de células mesenquimales de varios orígenes como grasa, cordón umbilical, gelatina de Wharton, pulpa dental⁵⁶, células endoteliales de córnea⁵⁷, condrocitos⁵⁸, osteocitos y miocitos⁵⁹.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo principal

Desarrollar un método de fabricación, controlar y caracterizar una solución de lisado plaquetario humano que cumpla con los estándares de calidad establecidos por las Agencias Reguladoras como materia prima de medicamentos de terapias avanzadas.

2.2) Objetivos específicos

- Analizar cómo afectan los diferentes métodos de producción del lisado plaquetario en la calidad del producto final obtenido y establecer sus especificaciones.
- Establecer y realizar los controles para la caracterización de las soluciones de lisado plaquetario fabricadas: test de identidad, test de potencia (actividad funcional) y pureza.
- Establecer y realizar los controles microbiológicos que garanticen la seguridad durante la producción de lisado plaquetario humano bajo Normas de Correcta Fabricación (NCF).
- Estudiar la estabilidad a largo plazo y a distintas temperaturas de almacenamiento, con el fin de establecer caducidades a los materiales de partida (plasma y concentrado de plaquetas) y el producto terminado (hPL).

3) MATERIAL Y MÉTODOS

3.1) Materiales

3.1.1) Plasma transfusional grupo AB y concentrados de plaquetas leucodeplecionadas grupo O.

El plasma y los concentrados de plaquetas fueron producidos en el Centro de Transfusión, Tejidos y Células de Sevilla (CTTC) de Sevilla acorde al Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión.

Para el caso del plasma, este se obtuvo tras centrifugar muestras de sangre total. Tras su extracción, las muestras son conservadas a -30°C hasta su uso. Para nuestro estudio se utilizó exclusivamente plasma del grupo AB para evitar la presencia de anticuerpos anti-A y anti-B.

Los concentrados de plaquetas leucodeplecionadas se obtuvieron a partir de sangre total. Para ello, se eligen las donaciones que están dentro de un peso determinado. Las muestras se centrifugan a 3700rpm, 18 min y 22°C para separar los concentrados de hematíes, la capa leucoplaquetaria (buffy-coat) y el plasma. Posteriormente, entre 4 a 5 *buffy coats* son mezclados mediante conexiones estériles y diluidas en la solución aditiva Composol (Fresenius kabi). Los concentrados se obtienen en el sistema TACSI (TERUMO) dónde se realiza una centrifugación con leucorreducción durante 20 min. y se mantienen en agitación hasta su uso o fecha de caducidad (5 días después de la extracción). Para nuestro estudio se utilizaron exclusivamente concentrados de plaquetas leucodeplecionadas del grupo O, para evitar la presencia de los antígenos A y B en los restos celulares.

3.1.2) Criterios de calidad establecidos durante la obtención de los hemoderivados.

Los controles de calidad establecidos en el CTTC, siguen los **“Estándares en transfusión sanguínea”**⁴ de la Fundación para la Acreditación en Transfusión Sanguínea y Terapia Celular (Fundación CAT). La certificación CAT supone, actualmente, que se certifica la práctica transfusional bajo los más estrictos criterios de calidad, desde que ha conseguido el reconocimiento, en 2010 por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), como organismo de certificación para centros y servicios de transfusión. La acreditación CAT es reconocida y aceptada internacionalmente por las administraciones públicas o privadas.

Estos estándares recogen de forma exhaustiva las modificaciones más importantes que se han producido en el campo de la medicina transfusional, teniendo en cuenta las Directrices de buenas prácticas contempladas en la **“Guía para la preparación, uso y control calidad de los componentes sanguíneos”** que han sido elaboradas en colaboración entre el Departamento de Calidad del Medicamento y Asistencia Sanitaria (EDQM y Health Care) del Consejo de Europa y la Comisión de la Unión Europea⁶⁰.

A continuación, se recogen los criterios de calidad para los concentrados de plaquetas (tabla 8) y para el plasma fresco congelado (tabla 9).

Tabla 8: Criterios de calidad para los concentrados de plaquetas

Parámetro	Frecuencia	Especificación
Volumen/plaquetas	Todas las unidades	> 40mL/0,6x10 ¹¹ plaquetas
Plaquetas (*)	1%. Mínimo 10U/mes	> 3 x 10 ¹¹ (75% de las U)
Leucocitos con leucodepleción	1%. Mínimo 10U/mes	< 1 x 10 ⁶ /U (90% de las U)
pH (a 22°C) al caducar	1%. Mínimo 4U/mes	≥6,4 (**)
Inspección visual	Todas las unidades	Presencia de remolinos

(*) En el caso de leucodepleción se admite una pérdida de plaquetas en torno al 10-15%.

(**) El valor del pH debe estar por encima de 6,4 para evitar un cambio en la funcionalidad de las plaquetas.

El control de esterilidad se les realiza a las plaquetas que vayan a caducar, no existiendo un mínimo definido, estando en función de las necesidades de donación. La conservación de los concentrados de plaquetas se realiza a 22°C, ya que por debajo de 20°C pueden activarse liberando factores de crecimiento¹⁹.

Tabla 9: Criterios de calidad para el plasma fresco congelado

Parámetro	Frecuencia	Especificación
Volumen	Todas las unidades	El indicado ± 10%
Factor VIII (media tras congelación / descongelación)	Cada 3 meses a 10 unidades	≥ 70% de la unidad de plasma antes de congelar
Células residuales (*)	Al 1% de la producción	Leucocitos (plasma no leucorreducido) <0,1 x 10 ⁹ / L Plaquetas < 50 x 10 ⁹ / L Glóbulos rojos < 6 x 10 ⁹ / L
Proteínas totales	Al 1% de la producción	> 50 g / L
Inspección visual	Todas las unidades	Coloración normal. Ausencia de coágulos.

(*) Todos los productos plasmáticos destinados a la transfusión deben carecer de anticuerpos irregulares antieritrocitarios.

Todas las donaciones de concentrados de plaquetas y plasmas, utilizadas en la fabricación de los lisados plaquetarios fueron aprobadas por el Comité de Ética de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena y Virgen del Rocío dentro del estudio “Caracterización funcional de un lisado plaquetario para su uso clínico”, Proyecto Tecnológico en Salud del Instituto Carlos III (DTS17/00137), Código Interno 0480-N-18.

3.1.3) Fibroblastos dérmicos humanos (hFB)

Las líneas celulares de fibroblastos dérmicos humanos empleados para este estudio se obtuvieron a través del Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz previa aprobación del

comité de ética y como necesidad asociada a un proyecto financiado por el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) con código DTS17/00137.

Los fibroblastos se aislaron en nuestra unidad a partir de biopsias de piel de 2x2cm² aproximadamente. Para ello, previamente se eliminó de la biopsia todo resto de sangre o grasa con la ayuda de bisturís y tijeras estériles. Tras varios lavados con un tampón fosfato salino (PBS) (Sigma-Aldrich) suplementado con penicilina-estreptomicina 1% (Sigma-Aldrich), gentamicina 20 µg/mL (Normon Laboratories) y vancomicina 50 µL/mL (Normon Laboratories), tamaños de piel de 1 x 1 mm se sometieron a un proceso de digestión enzimática. Para ello se utilizó una solución de colagenasa 0,5U/mL (SERVA Electrophoresis GmbH), en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich), durante 16h a 37°C, en agitación.

Finalizada la digestión, la suspensión celular fue neutralizada con medio de cultivo DMEM suplementado con gentamicina 20µg/mL, lisado plaquetario al 5%, glutamax 2mM (Gibco), aminoácidos no esenciales (NEAA) 0,1mM (Sigma-Aldrich) y heparina sódica 2U/mL (Rovi). La suspensión celular obtenida fue sembrada en flasks de 25cm² (Nalgene Nunc International) y mantenida en incubadores humidificados al 5% de CO₂ a 37°C, aplicando cambios de medio cada 2-5 días de cultivo. Alcanzada una confluencia entre el 90-100 % del cultivo, se aplicó el pase celular. El levantamiento celular se realizó con Tryple Select (Gibco) y el conteo mediante el método del Azul Tripán acorde al capítulo 2.7.29 de la Farmacopea Europea (Ph.Eur). Tras ello las células fueron sembradas entre 3000- 6000 células/cm² y expandidas durante varios pases hasta conseguir un número de células suficientes para el estudio. Para tener células disponibles para los diferentes estudios las células se criopreservaron tras la expansión. La criopreservación de células se realizó a una concentración de 5 millones células/mL, empleando Cryostor CS10 (StemCell Technologies) como solución de criopreservación. Para ello se emplearon contenedores rellenos de poliespan e isopropanol (Mr Frosty), que permite una congelación gradual de 1°C por minuto, en un ultracongelador a -80°C. Transcurridos al menos 24h y máximo 4 días las células se almacenaron en un contenedor de nitrógeno líquido.

3.1.4) Células Madre Mesenquimales humanas procedentes de cordón umbilical (hUC-MSCs)

Las líneas celulares de mesenquimales humanas procedentes de cordón umbilical empleadas para este estudio se obtuvieron del Biobanco del Sistema Sanitario Público Andaluz previa aprobación del Comité de Ética y como necesidad asociada a un proyecto financiado por el ISCIII con código DTS17/00137.

De forma resumida, las células mesenquimales se aislaron a partir del cordón umbilical. Para ello, los restos hemáticos se eliminan tras varios lavados empleando un tampón fosfato salino (PBS). Posteriormente se trocea en fragmentos de 0.5cm aproximadamente y se eliminan posibles coágulos de sangre. Tras la completa eliminación de los restos hemáticos, se aplica un proceso de digestión enzimática con 3 mg/ml colagenasa NB6 (Nordmark) y 1 mg/ml hialuronidasa (SERVA electroforesis) en agitación 750 rpm a 37°C durante 3 ±1 horas. La suspensión celular obtenida es neutralizada con medio de cultivo DMEM high glucose (Lonza) suplementado con gentamicina 20µg/mL, lisado plaquetario al 5%, ultraglutamina (Lonza) al 1%, anfotericina B (Sigma) 1% y heparina sódica 2U/mL (Rovi). La suspensión celular obtenida fue sembrada en flasks de 25cm² (Nalgene Nunc International) y mantenida en incubadores

humidificados al 5% de CO₂ a 37°C, aplicando cambios de medio cada 2-5 días de cultivo. Alcanzada una confluencia entre el 90-100 % del cultivo, se aplicó el pase celular. El levantamiento celular se realizó con Tryple Select (Gibco) y el contaje mediante el método del Azul Tripán acorde al capítulo 2.7.29 de la Farmacopea Europea (Ph.Eur). Tras ello las células fueron sembradas entre 3000-6000 células/cm² y expandidas durante varios pases hasta conseguir un número de células suficientes para el estudio. Para tener células disponibles para los diferentes estudios las células se criopreservaron tras la expansión.

3.2) Métodos

3.2.1) Fabricación del lisado plaquetario humano (hPL)

La producción de los lisados plaquetarios se realizó en la sala blanca de la Unidad de Producción y Reprogramación Celular (UPRC) del CTTC de Sevilla, acorde a lo indicado en la patente con código P201730713.

De forma resumida y tras la optimización de los métodos (consultar sección de resultados), se diseñaron diferentes protocolos para la obtención de lisado plaquetario humano (LP1, LP2 y LP2 inactivado), los cuales se detallan a continuación (ver figura 1):

- **Lisado plaquetario 1 (LP1):** en este caso se partió de concentrados de plaquetas frescas grupo 0 justo antes de su caducidad (5º día tras extracción). Tras mezclar las unidades de plaquetas, se realizó un contaje de la mezcla para conocer la concentración. Para ello, la mezcla se centrifugó a 2500g, 10 minutos a temperatura ambiente (RT), y se retiró el sobrenadante. Las plaquetas fueron diluidas en un 40% de plasma AB y 60% de solución aditiva (CompoSol® Fresenius-kabi AG) a razón de 10⁶ plaquetas/μl, concentración final. Para la obtención del lisado plaquetario, la mezcla se sometió a dos ciclos de congelación/descongelación (-80°C/36°C) y posteriormente a dos ciclos de centrifugación (4000g/30min y 4000g/15min) a RT para eliminar el debris. El sobrenadante contenía el lisado plaquetario que fue alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso.
- **Lisado plaquetario 2 (LP2):** para su obtención se partió de concentrados de plaquetas congelados a -80°C grupo 0 justo antes de su caducidad (5º día tras extracción). Dos ciclos de congelación/descongelación (-80°C/36°C) y un tercer ciclo (-80°C/4°C en 24h) fueron aplicados antes de realizar la mezcla. Tras ello, se adicionó un 20% de plasma AB, lo cual suponía una concentración final entre el 48% al 52%, ya que la concentración de plasma en las mezclas de plaquetas está entre el 35% y 40%. Al final la mezcla se sometió a dos ciclos de centrifugación (4000g/30min y 4000g/15min) para eliminar el debris. El sobrenadante que contenía el lisado plaquetario fue alicuotado y almacenado a -20°C y a -80°C.
- **Lisado plaquetario 2 inactivado (LP2i):** se obtuvo igual que el LP2 pero partiendo de mezclas de plaquetas y plasmas que fueron previamente sometidas a un método de reducción de patógenos mediante el sistema Mirasol de TERUMO. Los concentrados de plaquetas se inactivaron en fresco en el 5º día de extracción antes de congelarse. Los plasmas se descongelaron para inactivarse y posteriormente volvieron a ser congelados,

por lo que experimentaron una descongelación más que en el caso de lisado inactivado (LP2i).

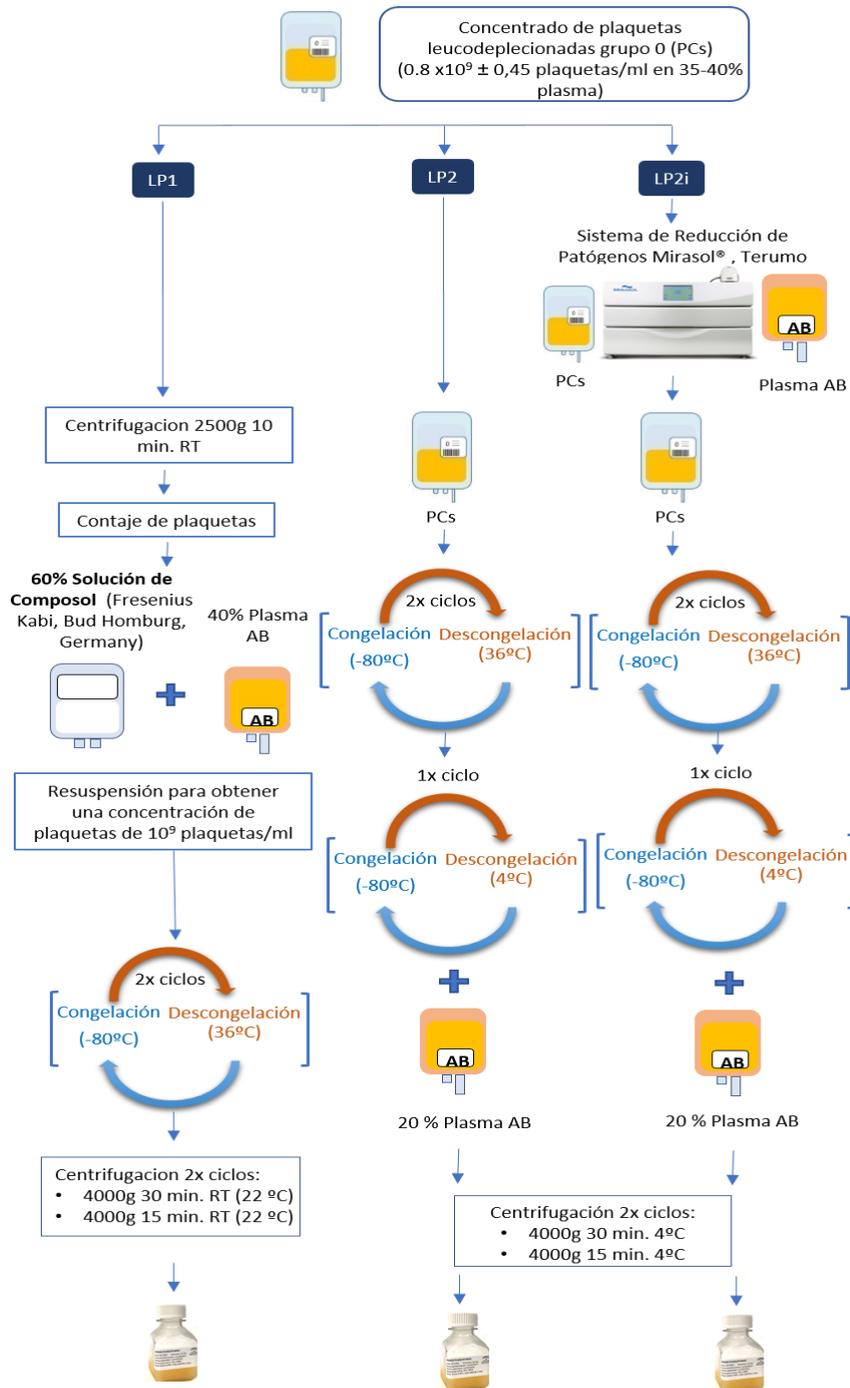


Figura 1. Diferentes métodos de obtención del lisado plaquetario

3.2.1) Métodos de reducción de patógenos en plasmas y plaquetas

La inactivación de los concentrados de plaquetas y el plasma se realizó con el sistema **Mirasol PRT** (Tecnología de Reducción de Patógenos, versión 6.2/6.3, TERUMOBCT). Este sistema es un método validado y patentado por TERUMO que combina la adición de riboflavina (vitamina B2)

a las muestras y la posterior irradiación con luz ultravioleta (UV) para la inactivación de patógenos. Los concentrados de plaquetas empleadas para la fabricación de la solución LP2i fueron previamente sometidas a este sistema de reducción de patógenos en el 5º día tras su extracción. En el caso del plasma, este fue previamente descongelado para someterse al proceso de inactivación y posteriormente congelado hasta su uso.

El método de inactivación se aplica acorde a lo establecido por el fabricante. De forma resumida, la riboflavina expuesta a la luz UV produce la oxidación de los residuos de guanina provocando la ruptura irreversible de los ácidos nucleicos. Para evitar la degradación de las proteínas por procesos oxidativos de la actuación de la riboflavina con la luz UV y el oxígeno disuelto, se utiliza un rango de longitud de onda de 265 a 370nm. En este rango se favorece la fotosensibilización de la riboflavina cuando está próxima a los ácidos nucleicos frente a la forma libre. Además, se debe remover el aire de las bolsas antes de irradiar.

Después de mezclar el hemoderivado con la solución de riboflavina, esta se coloca en el iluminador y se aplica una dosis de energía lumínica calculada (6,2 J/ml). La bolsa es iluminada entre 6- 10 minutos mientras se mantiene en continua agitación.

Para poder suministrar al producto la luz adecuada es necesario conocer el peso del producto y el **índice de iluminación**. Para las plaquetas el índice de iluminación se debe ajustar al porcentaje de solución aditiva de plaquetas (PAS) que contengan.

El sistema Mirasol ha demostrado su eficacia contra virus con y sin envuelta, bacterias Gram negativas y positivas y parásitos. Varios estudios han sido realizados para analizar el método de reducción. Entre ellos, el estudio hecho por Ruane²² y colaboradores, sobre el **parvovirus**, el **VIH** y **virus del Nilo Occidental** demostraron la reducción de los virus testados. Para ello emplearon como método para conocer la infectividad vírica, el efecto citopático durante 7 días de cultivo celular comparando muestras víricas antes y después de la inactivación.

Para el parvovirus (virus desnudo pequeño con ADN monocatenario), se partió de una concentración en los concentrados de plaquetas de $6,68 \pm 0,20$ log TCID₅₀/mL (**dosis infectiva del 50% de un virus en cultivo celular**). Para el VIH-1 (envoltura y ARN monocatenario) libre o asociado a células, de una concentración de $7,93 \pm 0,27$ log TCID₅₀/ml, para el VIH-1 intracelular, de una concentración de $6,64 \pm 0,27$ log TCID₅₀/ml. Para el caso del virus del Nilo Occidental WNV (envoltura y ARN monocatenario), una concentración de $7,06 \pm 0,26$ log TCID₅₀/ml fue utilizada. El método de control de citotoxicidad empleado consistió en sembrar las células utilizando un concentrado de plaquetas antes y después de irradiar al que no se le añadió virus. Se evaluaron 6 concentrados de plaquetas para cada tipo de virus. En todos los virus testados, el factor de reducción fue mayor de 4 logaritmos. Para bacterias, tanto para *Staphylococcus epidermidis* como *Escherichia coli* obtuvieron un factor logarítmico de reducción de 4 o mayor.

Existen limitaciones en los métodos de reducción ya que en un pico de viremia no serían efectivos por la alta carga viral, y por otro lado ningún método puede asegurar la reducción de todos los tipos de virus y patógenos.

3.2.2) Ensayo de esterilidad

Se llevó a cabo un test de esterilidad en todos los lotes de lisado plaquetario obtenidos (LP1, LP2 y LP2i) para comprobar la ausencia de contaminación.

Este se realizó según el ensayo descrito en el capítulo 2.6.27 “**Control microbiológico de productos celulares**” de la Farmacopea Europea. Para el análisis se utilizó el sistema automatizado **BACT/ALERT** de BioMérieux, inoculando 1 ml de muestra en cada una de las botellas de medio de cultivo (BioMérieux) para medios aerobios y anaerobios, las cuáles fueron incubadas durante 7 días a 35°C hasta la toma de resultados.

El ensayo se debe llevar a cabo en condiciones asépticas para evitar falsos positivos y por otro lado el ensayo no debe enmascarar la presencia de determinados microorganismos. Para ello hay que verificar la promoción de crecimiento de los medios de cultivo utilizados y la idoneidad, es decir que cuando se añade la muestra, hay que demostrar que ésta no inhiba el crecimiento de los microorganismos.

Para la promoción de crecimiento se deben sembrar no más de 100UFC de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida Albicans*, *Aspergillus brasiliensis* (en medios aerobios) y *Clostridium sporogenes* y *Bacteroides fragilis* (en medios anaerobios). Estos deben ser detectados en un máximo de 7 días.

Para conocer si la muestra no inhibe la detección de los posibles microorganismos, se debe llevar a cabo un test de idoneidad: Para ello, se inoculan junto a la muestra los siguientes microorganismos (no más de 100UFC): *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Candida Albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus spp.* (en medios aerobios) y *Clostridium sporogenes* y *Propionibacterium acnes* (en medios anaerobios). El test se realizó por triplicado. El criterio de aceptación establecido en el ensayo es la ausencia de contaminación (cultivos negativos).

3.2.3) Determinación de endotoxinas

Se llevó a cabo un ensayo para la detección de endotoxinas en todos los lotes de lisado plaquetario obtenidos (LP1, LP2 y LP2i) para comprobar la ausencia de la misma.

Las endotoxinas son lipopolisacáridos y se encuentran en las paredes celulares de las bacterias Gram negativas y pueden provocar toxicidad y pirogenia cuando se administran por vía parenteral.

Su determinación se realizó por el método D: **Test cinético – cromogénico**, descrito en el capítulo 2.6.14 “**Endotoxinas bacterianas**” de la Farmacopea Europea. Este método se basa en medir el tiempo que tarda la mezcla de reacción en alcanzar una predeterminada absorbancia. El reactivo empleado en el test es la solución de lisado de amebocitos del cangrejo de herradura *Limulus polyphemus* (LAL) que está compuesto por enzimas serino proteasas tipo tripsina. Las endotoxinas activan la cascada enzimática del reactivo LAL, hasta activarse la enzima pre-coagulación. El sustrato cromogénico es hidrolizado dando una sustancia de color amarillo (p-nitroanilina). Cuanta mayor concentración de endotoxina hay, más rápido se hidroliza el sustrato cromogénico. En función de este tiempo de hidrólisis se determina la concentración de endotoxinas.

Para llevar a cabo el test se empleó el espectrofotómetro portátil **Endosafe** de Charles River. De forma resumida, se emplea un cartucho de detección que contiene 4 pocillos con liofilizado, dos de ellos con el reactivo y sustrato cromogénico y los otros dos con el reactivo, sustrato cromogénico y una concentración conocida de endotoxinas. Tras reconstituir los pocillos con 25

µl de muestra a analizar y, después de la incubación a 37°C, se mide la densidad óptica en los pocillos y se compara con la curva de calibración que viene almacenada con cada lote de cartucho. Al cabo de unos 15 minutos el equipo muestra los resultados. Se analiza la concentración de endotoxinas de la muestra expresados en UE/ml, el coeficiente de variación entre pocillos duplicados y, el % de recuperación del valor de endotoxinas añadido.

Para que el **ensayo sea válido**, la Farmacopea indica que hay verificar los criterios de validez de la curva de calibración y chequear las posibles interferencias que produce la muestra durante la determinación.

- La curva de calibración debe contener como mínimo 3 concentraciones y el coeficiente de correlación ser $\geq 0,980$. El tanto por ciento de **recuperabilidad** debe estar entre el **50 – 200%** para asegurar que la muestra no inhibe ni aumenta la concentración real de endotoxinas. La concentración de endotoxinas añadida como control tiene que estar en torno a la mitad de la curva de calibración. Y el blanco utilizado en la calibración debe tener un valor menor al límite de detección del reactivo.
- Si la muestra presentase interferencias, habría que diluirla con una dilución menor o igual a la dilución máxima válida de la muestra (DMV), en la que se puede determinar el límite de endotoxinas establecido. Esta se calcula a través de la fórmula,

$$DMV = (\text{límite de endotoxinas} \times \text{concentración muestra}) / \lambda$$

El **límite de endotoxinas** para medicamentos de administración parenteral viene establecido por la fórmula, K/M, siendo K la dosis umbral de endotoxinas por kg peso y M la dosis máxima de medicamento por kg peso.

λ es la sensibilidad del reactivo utilizado, en nuestro caso la más baja concentración de la curva estándar de calibración (0,005UE/ml).

Cada fabricante debe establecer su propio umbral de concentración de endotoxinas como criterio de liberación del producto. Para nuestro caso, en el lisado plaquetario se estableció el límite de 10UE/mL.

3.2.4) Ensayo de micoplasma

Se llevó a cabo un ensayo para la detección de micoplasma en todos los lotes de lisado plaquetario obtenidos (LP1, LP2 y LP2i) para comprobar la ausencia del mismo.

Los micoplasmas pertenecen a la clase de los *Mollicutes* que significan “cáscara blanda” por carecer de pared bacteriana. Su pequeño tamaño de 0.3 a 0.8 µm de diámetro y su flexibilidad de membrana le permite pasar a través de los filtros usados en los cultivos celulares. Sus deficiencias estructurales y bioquímicas, los hacen altamente dependientes en su replicación de las células hospedadoras o del ambiente donde viven.

Pocas especies son patogénicas para el hospedador, pero bajo ciertas condiciones pueden provocar enfermedades. Causan principalmente enfermedades bronquiales y urogenitales en el hombre. Por ejemplo, *M. pneumoniae*, *M. salivarium* y *M. orale* provocan neumonías; *M. fermentans* causa infecciones secundarias a pacientes con VIH; *M. genitalium* y *M. hominis* causan infecciones en la zona urogenital.

Se deben establecer medidas que impliquen tanto a las instalaciones, como los procedimientos o el operador que lleva acabo la manipulación del producto para prevenir la contaminación, sobre todo con las operaciones que producen aerosoles (pipeteo, decantación, centrifugación). Los micoplasmas son muy sensibles a la mayoría de los desinfectantes, pero sobreviven en ambientes secos. Una buena limpieza al iniciar y finalizar el trabajo es esencial.

Para el ensayo de micoplasma, se siguió el método de análisis **2.6.7 “Micoplasmas”** descrito en la Farmacopea Europea, y en concreto la amplificación de ácido nucleico o PCR. Para ello se empleó, el kit comercial de Minerva Biolabs. A pesar de ser un test comercial, el límite de detección, la especificidad y la robustez del método, deben ser validados antes de utilizarse. Para ello:

- Se define el límite de detección como la mínima concentración que puede detectarse en el 95% de un número significativo de tests realizados, se da el valor de 24 repeticiones como estadístico válido.
- Para validar el **límite de detección**, se pueden utilizar diferentes especies según la probabilidad de que se encuentren en la muestra tales como *A. laidlawii* o *M. orale*. (especies recomendadas por la farmacopea). La validación del test debe demostrar una capacidad para detectar 10 UFC/ml. Son necesarias 3 series independientes de diluciones 1:10 en torno a una concentración de micoplasma que de señal positiva.
- Para la **especificidad** se utilizan bacterias relacionadas filogenéticamente con el micoplasma como es *Streptococcus*, con el objetivo de verificar que los *primers* utilizados son específicos del micoplasma.
- Mediante los controles internos (Minerva Biolabs) se verifica la ausencia de inhibición de la PCR. Se añade antes de la extracción del ADN para verificar que se ha hecho bien.
- Se utiliza un control positivo (Minerva Biolabs) con una concentración de micoplasma cercana a la sensibilidad que se quiere demostrar.
- También se puede evaluar la **robustez o solidez**, que representa la fiabilidad del test frente a cambios intencionados en el proceso. Por ejemplo, cambiando el kit de extracción de ADN.

Para la determinación de micoplasma en las muestras de lisado plaquetario, es necesario realizar una extracción de ADN previa al método, debido a que el alto contenido de proteínas de la muestra podría promover la inhibición de la reacción de la polimerasa. Además, con ello, se favorece la detección porque supone un paso de concentración de la muestra. Para este proceso se empleó proteinasa K (Minerva Biolabs) y el kit de extracción de ADN (Minerva Biolabs).

Después de la amplificación, las bandas de ADN fueron visualizadas mediante el sistema **FlashGel** de Lonza, chequeando la presencia de bandas con los siguientes pares de bases (pb): 191 pb para el control negativo (control interno), 191pb y 267pb (banda de micoplasma) para el control positivo. El criterio de aceptación establecido para este ensayo es ausencia de micoplasma.

3.2.5) Determinación de virus adventicios

Se llevó a cabo un análisis para la detección de virus adventicios en todos lotes representativos para cada tipo de lisado plaquetario fabricado, con el objetivo de para comprobar la ausencia de los mismos.

Este test se realizó analizando el efecto citopático sobre las líneas celulares VERO, MRC-5 y RD. Muestras de lisado plaquetario fueron testadas en paralelo con un control positivo (VHS-1), evaluando cambios estructurales potenciales en la célula hospedadora provocados por la infección viral.

Este ensayo se realizó cabo en el servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. El criterio de aceptación establecido para este ensayo es ausencia de virus.

3.2.6) Niveles de pH

Se llevó a cabo la medida de pH en todos los lotes de lisado plaquetario obtenidos (LP1, LP2 y LP2i).

Las medidas de pH se realizaron con el pH-metro de sobremesa HI 221 HANNA acorde al capítulo 2.2.3 Ph. Eur. El rango de pH para el lisado plaquetario se estableció entre 6 y 9. En caso de que el nivel de pH no cumpliera con los criterios de aceptación, esto podría reflejar degradación y contaminación del lisado plaquetario afectando a la calidad del producto.

3.2.7) Cuantificación de plaquetas y leucocitos

Se llevó a cabo la cuantificación de plaquetas y leucocitos en un número de lotes representativo de soluciones de lisado plaquetario LP2 y LP2i. La medida de leucocitos se realizó con el objetivo de detectar posibles impurezas en el producto terminado. En el caso de las plaquetas, estas se midieron para ver la eficacia del proceso de lisis.

La cuantificación de las plaquetas y los leucocitos se realizó en el equipo **Cell Dyn Ruby** de Abbot. Este equipo emplea métodos de detección basados en la citometría de flujo y se lleva a cabo acorde a las instrucciones del fabricante.

En resumen, la sangre aspirada por el equipo es dividida en tres partes para medir leucocitos, eritrocitos/plaquetas y hemoglobina. Un rayo láser de helio-neón polarizado interactúa con la muestra y se mide el esparcimiento lumínico. Las señales luminosas recogidas en cada detector se convierten en impulsos eléctricos, si el impulso es mayor que el umbral del hardware, el contador celular lo cuenta.

Los límites de concentración de lectura de fondo (proviene de los reactivos sin sangre y/o del ruido electrónico) admitidos por el equipo son para los leucocitos $\leq 100/\mu\text{L}$. y para las plaquetas $\leq 5000/\mu\text{L}$. Los análisis de imprecisión (31 replicados) muestran para los leucocitos en un intervalo de medida ($4,4 - 9,5 \times 10^3/\mu\text{L}$) un 2,7% de coeficiente de variación máximo y para las plaquetas en un intervalo de ($168 - 371 \times 10^3/\mu\text{L}$) un 3,9%. Los intervalos en los cuáles el sistema proporciona resultados con exactitud suficiente son para los leucocitos ($0,02 - 246,8 \times 10^3/\mu\text{L}$) y para las plaquetas ($0,00 - 3000 \times 10^3/\mu\text{L}$).

3.2.8) Determinación de los niveles de Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas AB (PDGF-AB)

Se cuantificó la concentración del factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB) en todos los lotes de lisado plaquetario fabricado (LP1, LP2 y LP2i), por ser un marcador representativo de nuestra solución necesario para promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis¹⁹.

La cuantificación del PDGF-AB se realizó empleando el kit "Human PDGF-AB Quantikine ELISA Kit" (R & D Systems, Minneapolis, MN) según las instrucciones del fabricante. Los patrones y las muestras empleadas se sometieron a ensayo al menos por duplicado y calculando los valores promedio. El ensayo fue llevado a cabo en la Unidad de Terapia Celular del Hospital Universitario Reina Sofía (HURS) de Córdoba. El criterio de aceptación establecido para este ensayo es ≥ 12 ng/ml.

3.2.9) Cuantificación de Proteínas Totales, Albúmina e Inmunoglobulinas

La cuantificación de proteínas totales (Pt), Albúmina (Alb) e inmunoglobulina G (IgG), se realizó en todos los lotes fabricados (LP1, LP2 y LP2i). Para ello se empleó el equipo **Dimension (Siemens)** por métodos colorimétricos (Pt, Alb) y turbidimétricos (IgG), en el laboratorio de Control de Calidad del Centro de Transfusión, Tejidos y Células (CTTC) de Sevilla. De forma resumida:

- El método de determinación de las **proteínas totales (Pt)** utilizado en el sistema de química clínica Dimension es una prueba de diagnóstico *in vitro* destinada a la determinación cuantitativa de la proteína total en suero humano y plasma heparinizado. El método de la proteína total es una modificación de la reacción de Biuret. El ion cúprico reacciona con los enlaces peptídicos de la proteína en una solución básica. El complejo proteínico azul de cobre (II) formado es proporcional a la concentración de proteína total de la muestra y se mide utilizando una técnica de punto final bicromático (540,700nm). El rango de medición analítico del ensayo es de 2,0 a 12,0 g/dL. Precisión según fabricante: para un valor medio de 4,80g/dL, la desviación estándar fue de 0,07g/dL y el coeficiente de variación del 1,4% (la muestra fue analizada por triplicado durante 20 ensayos). El intervalo de referencia se calcula de forma no paramétrica y representa el 95% central de la población. El intervalo de referencia para el plasma es de 6,3 a 8,5 g/dL.
- El método de la **Albúmina (Alb)** usado en el sistema de química clínica Dimension es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de la Albúmina en plasma y suero humanos. El procedimiento consiste en la fijación del colorante púrpura de bromocresol por la Albúmina a un pH de 4,9. La cantidad de complejo formado es directamente proporcional a la concentración de Albúmina. Y se mide por la absorbancia a punto final a 600nm. El rango de medición analítico está entre 6 y 80 g/L. Precisión según fabricante: para un valor medio de 32 g/L, la desviación estándar fue de 0,73 g/L,

un coeficiente de variación del 2,3 % (la muestra fue analizada por triplicado durante 20 ensayos). El intervalo de referencia para el plasma es de 34 a 50 g/L.

- El método de la **inmunoglobulina G (IgG)** del sistema de química clínica Dimension es una prueba de diagnóstico in vitro para la determinación cuantitativa de la IgG en plasma y suero humanos. El método de determinación es un análisis turbidimétrico cuantitativo. La IgG reacciona con su anticuerpo policlonal para formar inmunocomplejos. La turbidez resultante se mide mediante mediciones bicromáticas de punto final a 340 y 700nm. El rango de medición analítico está entre 0,5 y 45,0 g/L. Precisión según fabricante: para un valor medio de 11,68 g/L, la desviación estándar fue de 0,42 g/L y el coeficiente de variación de 3,6 % (la muestra fue analizada por triplicado durante 20 ensayos). El intervalo de referencia para el plasma es de 6,81 a 16,48 g/L.

3.2.1) Test de potencia: ensayo de actividad celular

Se realizó un test de actividad celular sobre fibroblastos dérmicos humanos y células madre mesenquimales aisladas de cordón umbilical en pases tempranos.

El test de actividad o proliferación celular tiene que estar bien definido para conocer la variabilidad entre los lotes de lisados plaquetarios producidos, la reproducibilidad del proceso de fabricación o la calidad del producto¹⁶. Para evitar mayor variabilidad, se intentó mantener el mismo lote de células empleada entre los diferentes test, preferiblemente en pases tempranos para evitar la senescencia (entre 5-7 pases) y aberraciones cromosómicas.

Se emplearon los siguientes medios de cultivo dependiendo del tipo celular:

- Para el caso de los fibroblastos: medio control [10% de FBS (Sigma-Aldrich), 1% de Glutamax (Gibco), 1% de NEAA (Sigma-Aldrich), 0,05% de gentamicina (40mg/mL; Normon Laboratories) en DMEM (Sigma-Aldrich)] y medio con lisado plaquetario [5% de LP, 1% de Glutamax (Gibco), 1% de NEAA (Sigma-Aldrich), 0,05% de gentamicina (40mg/mL; Normon Laboratories), 0,2% de heparina (10mg/mL; Hospira) en DMEM (Sigma-Aldrich)].
- Para el caso de las mesenquimales: medio control [15% de FBS (Sigma-Aldrich), 1% de ultraglutamina (Lonza), 1% de anfotericina B (250µg/mL; Sigma-Aldrich), 0,1% de gentamicina (40mg/mL; Normon Laboratories) 0,2% de heparina (10mg/mL; Hospira) en DMEM bajo en glucosa (Lonza)] y medio con lisado plaquetario [5% de LP, 1% de ultraglutamina (Lonza), 1% de anfotericina B (250µg/mL; Sigma-Aldrich), 0,1% de gentamicina (40mg/mL; Normon Laboratories) y 0,2% de heparina (10mg/mL; Hospira) en DMEM bajo en glucosa (Lonza)].

Las células se mantuvieron un mínimo de 48 horas en cultivo con 10% de FBS (en el caso de fibroblastos) o 15% de FBS (en el caso de mesenquimales) al inicio del test, con el objetivo de estabilizar la línea tras la descongelación. Posteriormente, se levantó el cultivo y se sembró en dos flasks de 25cm² a una concentración de 3000 células/cm², uno de ellos en presencia del medio control (10% o 15% de FBS dependiendo de la línea) y el otro el medio suplementado con un 5% del lisado plaquetario (LP1, LP2 y LP2i) a testar. Al cabo de un tiempo establecido según el tipo de lisado (5 días para el caso de LP1 y 3 días para el LP2 o LP2i), se calcularon la viabilidad celular y las duplicaciones celulares.

Para analizar la actividad de la solución se compara las tasas de crecimiento de las células calculadas con la solución a testar frente a la solución control. Para ello, se calculó el número de duplicaciones celulares (D) obtenidas durante un pase celular y el tiempo de duplicación (DT). La viabilidad celular se calculó empleando el método de exclusión del azul Tripán (Sigma-Aldrich).

Los criterios de aceptación establecidos fueron para las duplicaciones (D) ≥ 1 y para la viabilidad $\geq 80\%$.

3.2.2) Estudio de estabilidad a dos años

El estudio de estabilidad consistió en analizar diferentes parámetros a lo largo del tiempo, tanto en los materiales de partida (plasma y concentrados de plaquetas) como en las soluciones de lisado plaquetario obtenidas (productos terminados) almacenados a diferentes temperaturas. Para ello se evaluó:

- **Estabilidad de los concentrados de plaquetas.** Se compararon los niveles Pt y PDGF-AB y se llevó a cabo un test de actividad en fibroblastos en cultivo con lisados de plaquetas almacenadas durante menos de un mes frente a almacenamientos superiores a 13 meses a $\leq -80^{\circ}\text{C}$.
- **Estabilidad del plasma inactivado.** Se analizaron al menos 3 lotes de plasma inactivado y almacenados a $\leq -80^{\circ}\text{C}$ durante dos años. Para ello, cada bolsa de plasma sin inactivar se dividió en dos fracciones iguales, una para la inactivación y otra no inactivada (muestra control). Sobre ellas se midieron los niveles de pH y las concentraciones de Pt, Alb e IGG a tiempo 0, 12, 18 y 24 meses.
- **Estabilidad de los lisados plaquetarios:** se evaluó la estabilidad de lotes representativos de LP1 almacenados a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ y de LP2 y LP2i almacenados a temperaturas de $\leq -20^{\circ}\text{C}$ y $\leq -80^{\circ}\text{C}$. Sobre las muestras se midieron los niveles de pH, las concentraciones de PDGF-AB, Pt, Alb e IgG y la actividad en cultivo de fibroblastos y mesenquimales cultivadas en las diferentes soluciones. Adicionalmente se llevaron a cabo en las muestras controles microbiológicos de esterilidad, micoplasma, endotoxinas y virus.

Los equipos de almacenamiento empleados en el estudio fueron sometidos a cualificación anual para asegurar la calidad de los datos.

3.2.3) Análisis estadístico

Para el estudio estadístico de los datos se empleó el Software GraphPad Prism 5, versión 5.01 (GraphPad Software Inc.).

Los datos se indicaron como media +/- SEM (error típico de la media). Se aplicó el estadístico t de Student para comparar las medias de los grupos. Se usó un valor de $p < 0,05$ para evaluar el significado de las diferencias en los parámetros de ensayo medidos. Para más de dos grupos, se utilizó el estadístico ANOVA que analiza la varianza de un factor para una variable dependiente cuantitativa. Y para comparar las medias entre los diferentes grupos se aplicó el test de

Bonferroni o Tukey. Además, se utilizó la correlación (coeficiente de correlación de Pearson) para comprobar si variables dependientes cuantitativas estaban asociadas.

4) RESULTADOS

4.1) BLOQUE I: Análisis de diferentes puntos críticos durante la fabricación de un lisado plaquetario humano con calidad GMP.

Se llevaron a cabo varios experimentos de puesta a punto en los que se evaluaron diferentes aspectos durante el proceso de fabricación de lisado plaquetario humano. En resumen, se evaluó el impacto de aplicar un paso de concentración de plaquetas antes de los ciclos de lisis plaquetaria, la importancia de adicionar o no plasma y el porcentaje empleado en la preparación, el efecto de aplicar dos o tres ciclos completos de congelación y descongelación durante el proceso de lisis y el efecto de adicionar PBS al producto para resuspender las plaquetas en lugar de solución de Composol (solución normalmente empleada para la conservación de las plaquetas).

4.1.1) Impacto de aplicar un paso de concentración de plaquetas al inicio del proceso.

Se realizó un estudio para conocer si el paso de concentración de las plaquetas al inicio del proceso de fabricación del lisado plaquetario y antes de los ciclos de lisis plaquetaria afectaba a la composición final del mismo. El objetivo de llevar a cabo este paso de concentración, fue retirar el componente plasmático procedente de las plaquetas leucodeplecionadas de grupo 0 y con ellos la presencia de antígenos y anticuerpos de dicho grupo, que pudieran estar presentes en el producto terminado. Tras el paso de concentración, las plaquetas son resuspendidas en plasma grupo AB y solución de Composol.

Para ello, se llevó a cabo una prueba de concepto, en la cual se partió de dos mezclas de concentrados de plaquetas dónde se midieron los niveles de PDGF-AB antes y después del paso de concentración plaquetaria. Como se observa en la figura 2, obtuvimos una pérdida significativa de los niveles de PDGF-AB tras el paso de concentración de plaquetas, pasando de niveles de 38,1ng/mL (procesado 1) y 20,34ng/ml (procesado 2) en los concentrados de plaquetas a niveles de 20,33ng/mL y 11,43ng/mL (respectivamente) en los sobrenadantes, por lo que este paso suponía una pérdida de proteínas del 50% aproximadamente.

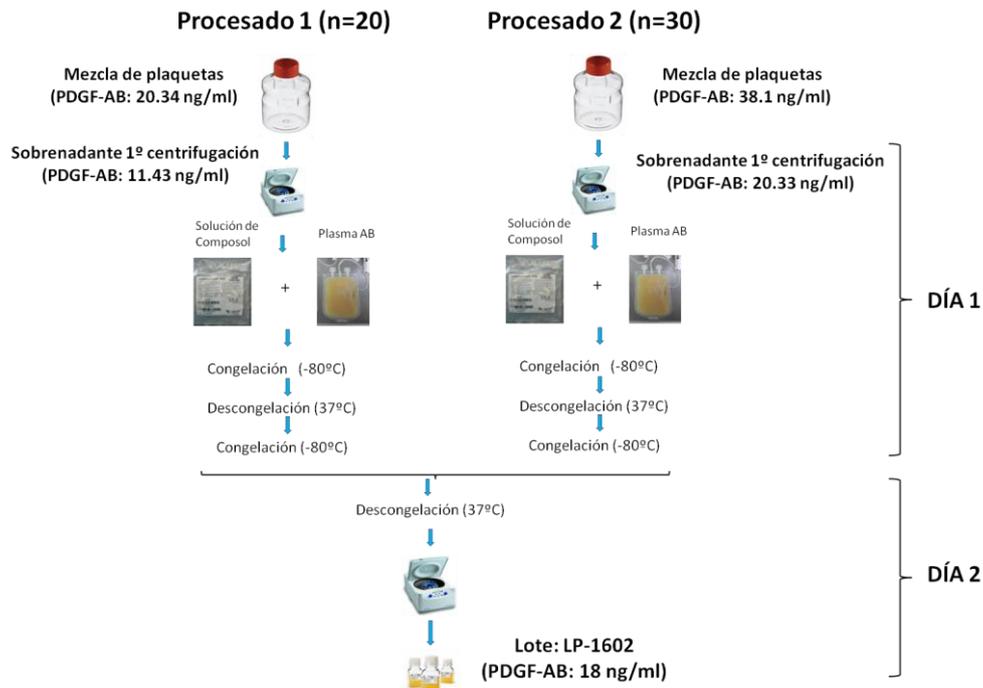


Figura 2. Diseño para el estudiar la pérdida de PDGF-AB durante un paso de concentración de plaquetas.

4.1.1) Efecto de aplicar un paso de filtración en los productos obtenidos.

Se analizó el efecto de aplicar un paso de filtración a los productos obtenidos para eliminar los coágulos presentes en las muestras, cuya presencia podría afectar a la adecuada proliferación celular. Para ello se comparó la condición 1 (sin filtrar), con la condición 2 (filtración con filtro de 0,48 μ). Estas dos condiciones se compararon a su vez con una tercera (condición 3) dónde se redujo a la mitad el % de plasma añadido (del 40% al 20%) y se sustituyó la solución de Composol por PBS como solución de dilución empleada durante el paso de concentración de plaquetas (ver figura 3).

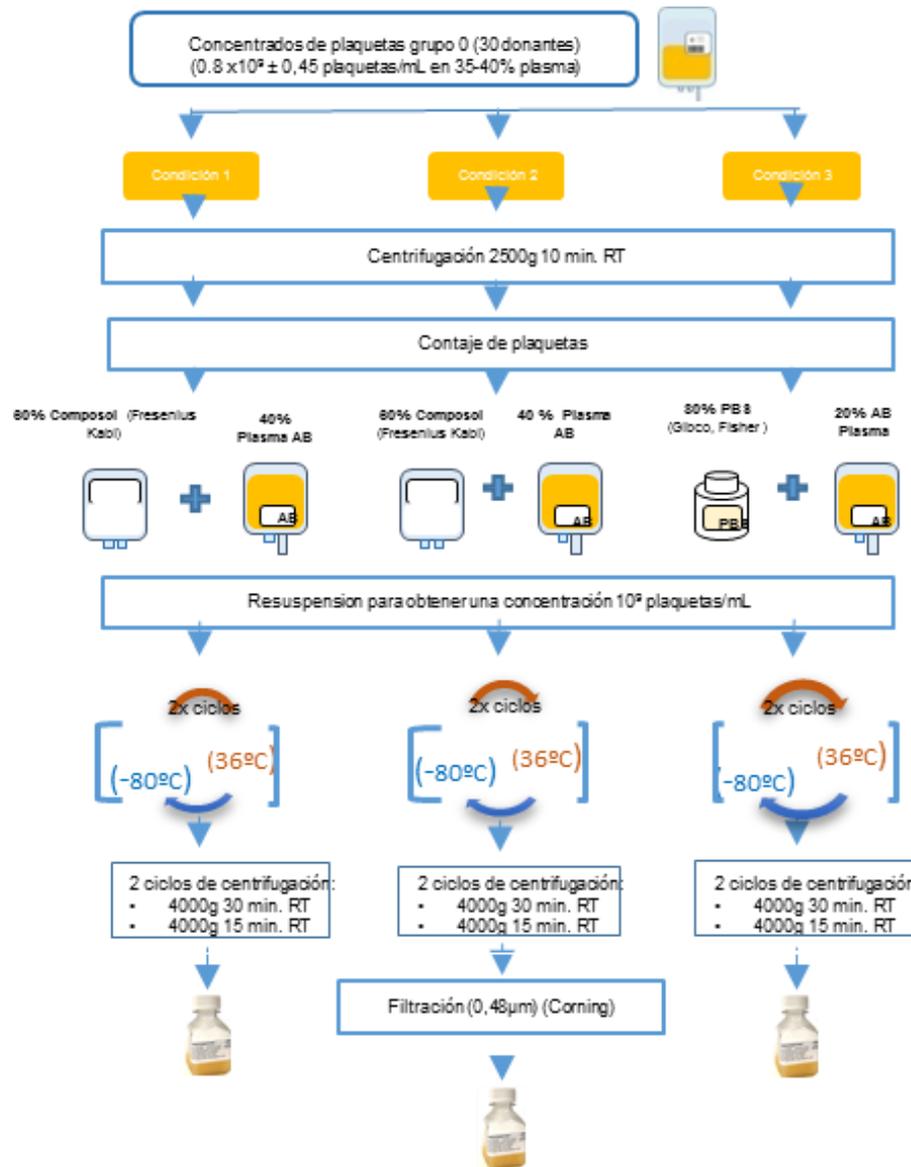


Figura 3. Diseño para estudiar el efecto de la filtración del producto.

Para estudiar el impacto de estos cambios en el proceso, se analizaron las tasas de duplicación obtenidas sobre fibroblastos cultivados durante 3 pases con medios suplementados con las tres soluciones de lisado plaquetario al 5%. Como se observa en la figura 4, la condición con menor porcentaje de plasma (condición 3) obtuvo un menor número de duplicaciones frente al lisado filtrado y sin filtrar ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente), así como frente al FBS ($p < 0,01$), lo cual podría estar debido a la presencia de menor concentración de componentes plasmáticos o séricos o a la sustitución de Composol por PBS como solución aditiva. Aunque no se observaron diferencias significativas entre el lisado filtrado y no filtrado, esta diferencia en las tasas de crecimiento se acentuó cuando comparamos el lisado sin filtrar (condición 1) frente a la condición 3 ($p < 0,01$). Esto indicaba que el proceso de filtración estaba retirando algunos componentes necesarios para la proliferación celular, posiblemente quedaban retenidos en el filtro.

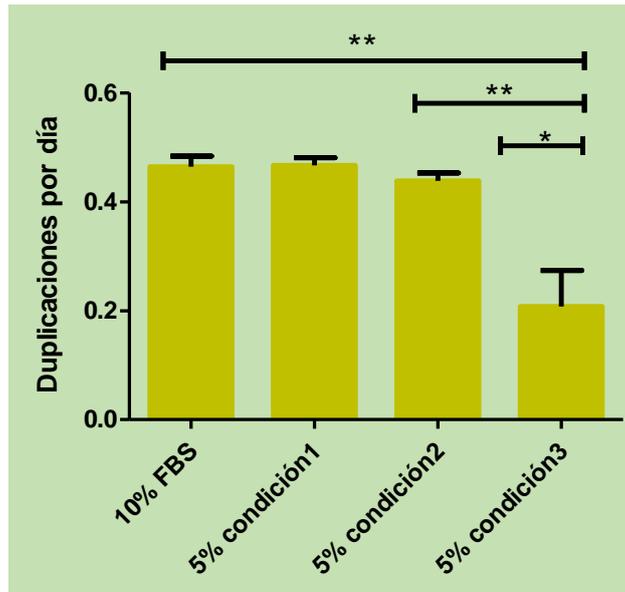


Figura 4: Tasas de duplicación en fibroblastos (n=3) cultivados durante 3 pases con tres condiciones de lisados al 5% y con FBS al 10%. Los datos representan la media \pm la desviación estándar de la media para 3 lotes de fibroblastos. Se aplicó ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey de comparaciones múltiples. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.1) Importancia de la presencia de plasma durante la fabricación del lisado plaquetario.

Debido a la pérdida de factores observada en el paso de concentración y a la necesidad de mejorar la logística de proceso, se decidió comparar la fabricación del lisado plaquetario partiendo de concentrados de plaquetas al que no se le aplicó un paso de concentración de previo al proceso de lisis (condiciones 2, 3 y 4), en lugar de aplicarlo (condición 1). Además, se analizó el efecto de añadir plasma antes (condición 2) o después del proceso de congelación/descongelación de plaquetas (condición 3) o fabricar el producto sin añadir plasma (condición 4). Otra mejora aplicada durante el proceso de fabricación fue realizar las centrifugaciones finales para eliminar los desechos celulares a 4°C en lugar de a temperatura ambiente, lo cual ayudaba a mantener los factores de crecimiento a un nivel óptimo.

La figura 5 describe los detalles del proceso de fabricación para cada una de las condiciones.

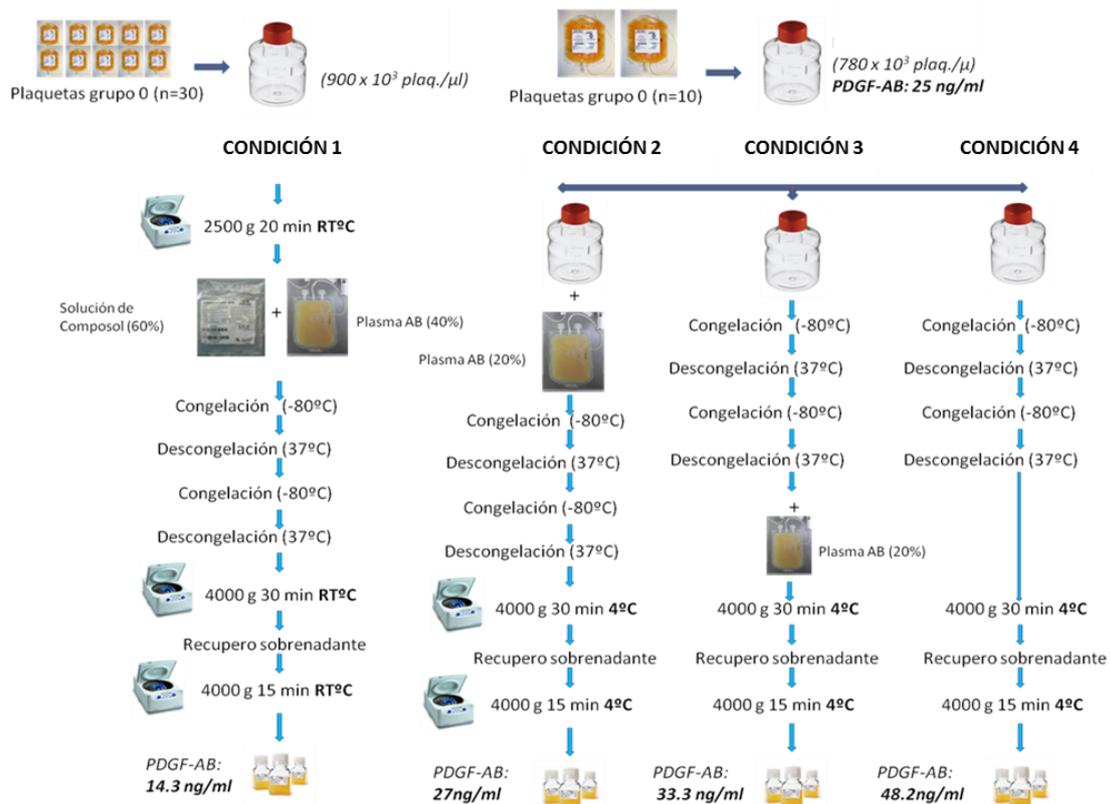


Figura 5: Diseño del estudio para analizar la presencia de plasma en las soluciones.

Como se observa en la figura 5, demostramos una vez más que los niveles de PDGF-AB obtenidos en las condiciones en las que eliminamos el paso de concentración son superiores para los lisados fabricados sin aplicar dicho paso. A pesar de que los niveles fueron algo superiores en los lisados plaquetarios obtenidos sin adicionar plasma (condición 4), no se observaron diferencias significativas entre esta condición y las demás (condición 2 y condición 3).

A continuación, analizamos los tiempos de duplicación obtenidos en fibroblastos (n=3) en los que se emplearon suplementos de las diferentes condiciones y a diferentes concentraciones (5, 10 y 15%). A diferencia de lo observado en el apartado 3.2.1., en este caso obtuvimos que la reducción de plasma añadido a la mitad (20% vs 40%) no afectaba a la calidad de los productos (condiciones 2 y 3 vs condición 1) y se compensaba con la eliminación del paso de concentración de plaquetas, mejorando así la calidad del producto y eliminando los costes al emplear menor concentración de plasma y una solución aditiva diferente (PBS) a la contenida en las plaquetas de partida (ver figura 6).

Por otro lado, los tiempos de duplicación obtenidos para los cultivos suplementados con el 15% de todas las soluciones fueron significativamente menores frente a la condición control (condición 1 al 5%), condición 4 (p<0,01) y condiciones 1, 2 y 3 (p<0,001), demostrando con ello que el porcentaje del suplemento empleado afectan a las tasas de proliferación. Con los tiempos de duplicación obtenidos para los cultivos con el 10% de lisado, se puso de manifiesto la pérdida de factores plaquetarios en la condición 1 ya que la diferencia en la disminución de los tiempos de duplicación fue más significativa para las condiciones 2 y 3 (p<0,001) que para la 1 (p<0,01).

En los estudios comparativos con suplementos del 5% de lisado, se obtuvo menor tiempo de duplicación para la condición 3 ($p < 0,01$), mientras que para la 2 y la 4, la disminución en el tiempo de duplicación fue menos significativa ($p < 0,05$). Esto demostraba que añadir el plasma después de los ciclos de congelación/descongelación era más favorable que añadirlo antes.

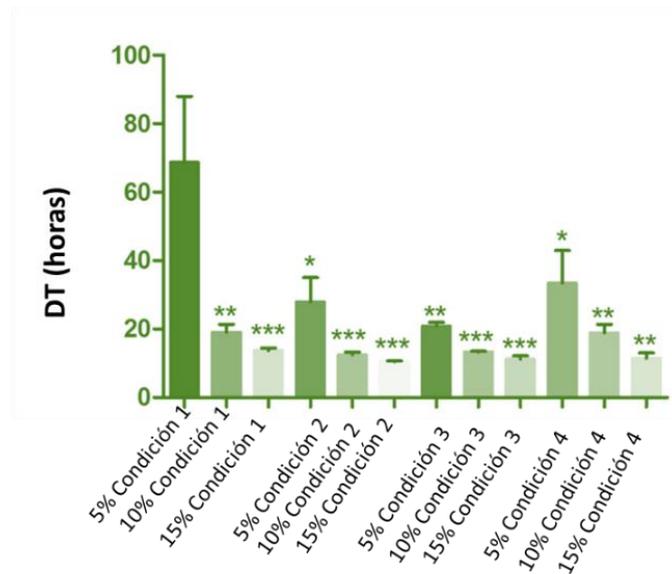


Figura 6: Tiempos de duplicación obtenidos en de fibroblastos (n=3) cultivados con diferentes suplementos de lisado plaquetario y a diferentes concentraciones (5, 10 y 15%). Se compararon cada condición de lisado con la condición 1 al 5% como solución control. Los datos representan la media \pm la desviación estándar tras aplicar t de Student * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

Aunque las tasas de proliferación fueron inferiores con un 5% del suplemento en cultivo, se observó la formación de agregados celulares tras emplear porcentajes altos de lisado (15%) (ver figura 7). Estos resultados sumados al hecho de tener una mejor logística durante el proceso de fabricación y un menor coste nos llevaron a decantarnos por el método de fabricación de la condición 3.

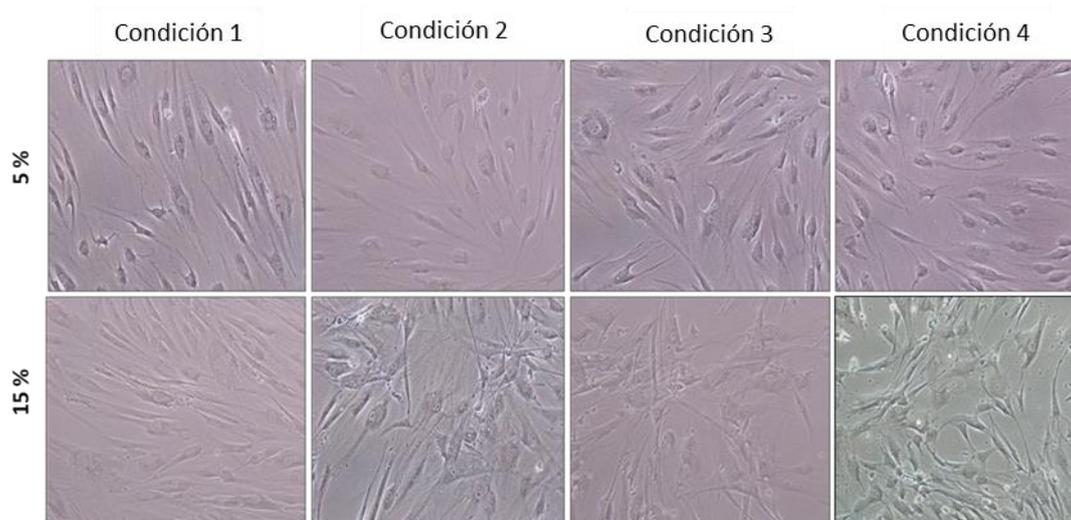


Figura 7: Morfología de fibroblastos en cultivo con suplementos del 5 % y 15% de lisado plaquetario.

4.1.1) Impacto de aplicar dos o tres ciclos de congelación-descongelación durante la etapa de lisis plaquetaria.

Por razones de operatividad se analizó también el impacto de aplicar en el proceso un tercer ciclo de congelación-descongelación. Para ello, se realizó una prueba en la que se incluyó en el proceso un nuevo ciclo de descongelación a -80°C y una descongelación progresiva durante toda la noche a 4°C . Con ello, eliminábamos la espera de la descongelación de todas las unidades de plaquetas el día de fabricación del lisado mejorando la logística y operatividad del proceso. Para este análisis se partió del modelo de fabricación más óptimo obtenido hasta el momento (condición 3 del apartado 4.1.3). Para la comparativa se partió de un mismo concentrado de plaquetas, que se dividió posteriormente en partes iguales antes de aplicar los diferentes ciclos de congelación y descongelación (ver figura 8).

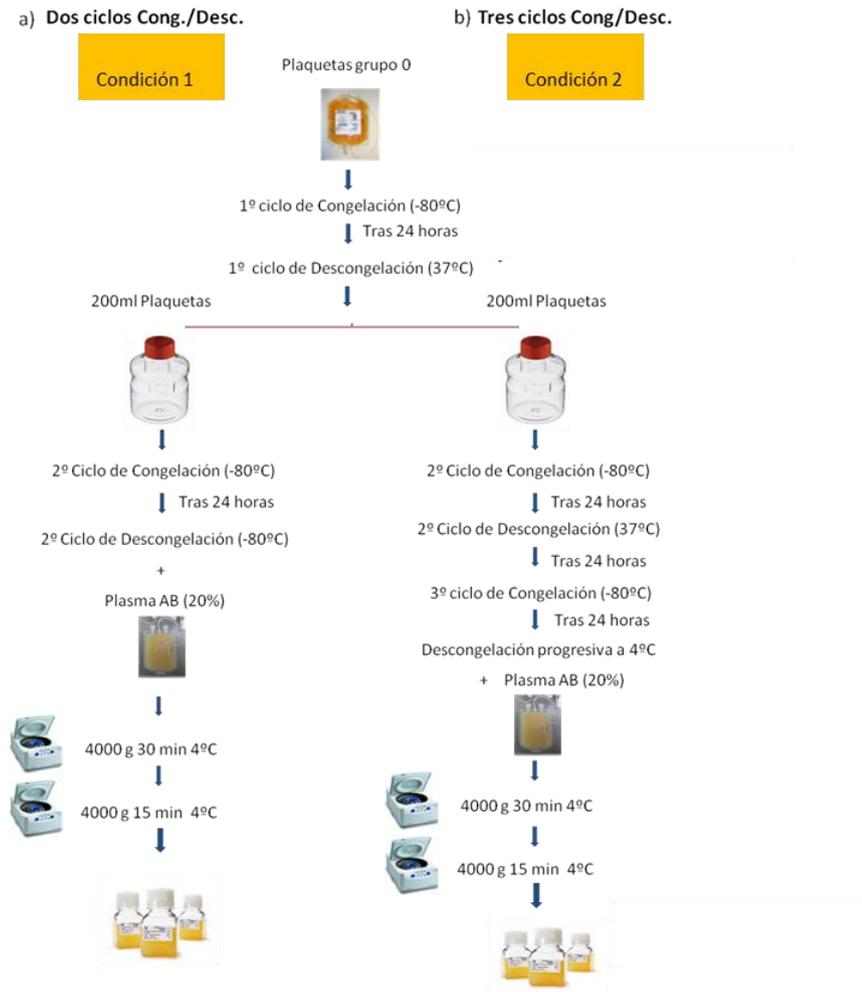


Figura 8: Diseño para analizar el impacto de aplicar dos o tres ciclos de congelación en el proceso.

Posteriormente analizamos las tasas de proliferación en un lote de fibroblastos cultivados con ambos lisados plaquetarios como suplemento del medio de cultivo. Como se observa en la figura 9, tanto el número de células obtenidas a lo largo de 5 pases celulares (figura 9a), como la media del número de duplicaciones celulares calculadas (figura 9b) fueron muy similares. Por lo que, un tercer ciclo de descongelación y descongelación progresiva no modificó significativamente la calidad del lisado, mejorando la operatividad del proceso.

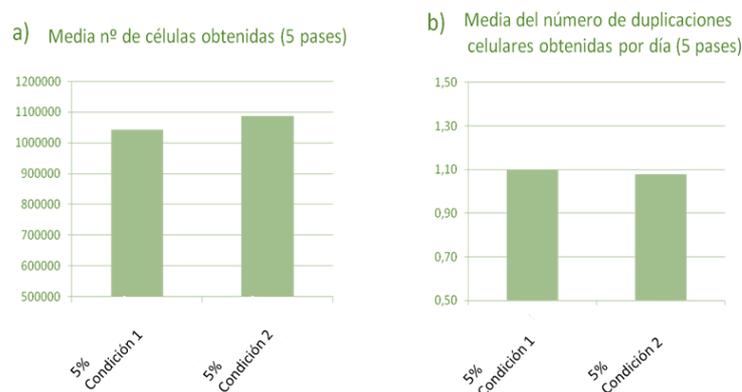


Figura 9. Dos vs tres ciclos de congelación/descongelación. a) Numero de células y b) media del número de duplicaciones celulares obtenidas en un lote de fibroblastos cultivados durante 5 pases con un 5% de la condición 1 (dos ciclos de congelación/descongelación) y condición 2 (tres ciclos de congelación-descongelación).

4.1.1.1) Aplicación de un método de reducción de patógenos sobre plasma y plaquetas empleadas en el proceso de fabricación

Una vez llevada a cabo todas las pruebas de puesta a punto y analizados los puntos del proceso que considerábamos más críticos, nos quedamos finalmente con tres formas de fabricación de lisado plaquetario humano para caracterizar nuestro producto en mayor profundidad. A partir de ahora dichas soluciones de lisado plaquetario quedan definidas como LP1, LP2 y LP2i (ver detalles de la forma de fabricación en la sección 3.2.1. de materiales y métodos).

El capítulo 5.2.12 Ph. Eur. destaca la necesidad de aplicar métodos de reducción de patógenos a los derivados sanguíneos para garantizar la seguridad de los lisados. Sin embargo, se desconoce el impacto que tiene dicho proceso sobre la calidad y la actividad funcional de los productos obtenidos. Por ello, tras realizar todas las pruebas de puesta a punto, decidimos aplicar un método de reducción de patógenos mediante el uso de riboflavina y luz ultravioleta (ver detalles del método en la sección 3.2.2. de materiales y métodos) sobre las muestras de plasma y plaquetas empleadas para fabricar la solución de lisado plaquetario más óptima obtenida. En este caso, decidimos aplicar únicamente el método de inactivación en plasma y plaquetas empleadas en la fabricación del lisado plaquetario 2 (LP2) debido a las limitaciones de logística que implicaban fabricar el lisado plaquetario 1 (LP1).

La aplicación de un método de inactivación de patógenos nos permite incrementar el número de muestras de plasma y plaquetas empleadas para la fabricación de una forma segura, aumentando con ello el volumen de producto final obtenido. Así, de los productos fabricados con un rango de donaciones de 14-16 unidades (LP2) se pudo pasar a la fabricación de lisado plaquetario con un rango de donaciones de 49-51 (LP2i). Los resultados de caracterización de los lisados plaquetarios LP1, LP2 y LP2i se detallan en el siguiente bloque de resultados.

4.2) BLOQUE II: Caracterización de las diferentes soluciones de lisado plaquetario obtenidas: LP1, LP2 y LP2i.

Tras la puesta a punto del proceso de obtención del lisado plaquetario humano, finalmente nos quedamos con tres formas de fabricación para caracterizar en mayor profundidad: LP1, LP2 y LP2i. Estos procesos de fabricación fueron previamente validados acordes a las Normas de Correcta Fabricación (NCF) y posteriormente, al menos 4 soluciones de lisado plaquetario (a partir de ahora denominadas lotes) fueron fabricadas en condiciones estériles. Todos los lotes obtenidos durante estos procesos fueron caracterizados y controlados desde el punto de vista microbiológico durante la liberación de los productos acorde a las NCF.

4.2.1) Medida de los niveles de pH, concentración de plaquetas y leucocitos

Los valores de pH son críticos para los cultivos celulares. Por ello, se chequeó si las diferentes formas de producción de lisado afectaban a los niveles de pH de los productos obtenidos.

Como muestra la figura 10, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el valor de pH entre LP1 y el LP2 ($7,6 \pm 0,1$; $n=7$ y $7,2 \pm 0,1$; $n=12$, respectivamente) ($p < 0,01$), no existieron diferencias significativas entre el LP2 y el LP2i ($7,2 \pm 0,1$; $n=12$ y $7,3 \pm 0,1$; $n=6$ respectivamente) ni entre el LP1 y el LP2i.

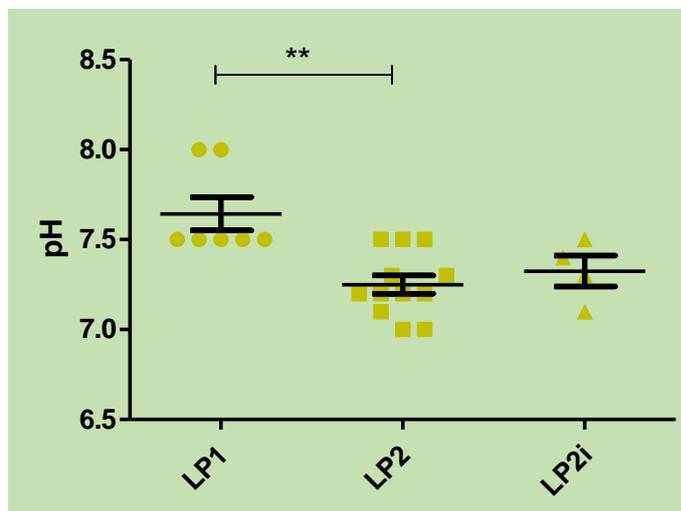


Figura 10: Efecto del método de fabricación del lisado sobre los niveles de pH. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni; ** $p < 0,01$.

La ausencia de plaquetas y leucocitos en los productos se analizó sobre las soluciones LP2 y LP2i (ver tabla 10). En el LP1 no se pudieron analizar, porque ya estaban congelados cuando se decidió conocer estos valores.

Tabla 10: Resultados de las concentraciones de plaquetas y leucocitos tras los ciclos de congelación/descongelación

Tipo de lisado	Lote	Plaquetas/ μ l	Leucocitos/ μ l
LP2	LP2-1801	0	2
	LP2-1802	1290	0
	LP2-1803	2450	0
	LP2-1804	21700	5,7
	LP2-1805	4920	1,3
	LP2-1806	0	1,3
	LP2-1807	16233,3	6,7
	LP2-1808	1157,3	0,7
	LP2-1809	1317,3	2,3
	LP2-1810	8660	0,7
	LP2-1812	8520	4,3
	LP2-1813	7023,3	5
	LP2i	HPL12-190528-1	5080
HPL12-190528-2		8196,7	5,7
HPL12-190529		3393,3	0,7
LPi-2001		9880	7

Teniendo en cuenta el rango de sensibilidad del equipo para las plaquetas ($0,00 - 3000 \times 10^3/\mu\text{L}$) y la imprecisión (3,9%), se han obtenido como valores más altos alrededor de los $20 \times 10^3/\mu\text{L}$ de plaquetas frente a una concentración inicial aproximada de $10^6/\mu\text{L}$, es decir un 2% de las plaquetas no se habrían lisado, en el peor de los resultados. Teniendo en cuenta que este valor está dentro de la imprecisión de la técnica, se podría afirmar que la lisis ha sido satisfactoria en todos los casos.

Para los leucocitos el rango de sensibilidad del equipo es de ($0,02 - 246,8 \times 10^3/\mu\text{L}$) y la imprecisión (2,7%), las medidas obtenidas han estado por debajo de la sensibilidad del equipo. Se puede afirmar que no existe presencia de leucocitos en todos los casos analizados.

4.2.2) Concentración de proteínas y niveles de PDGF-AB.

Con el propósito de evaluar la homogeneidad de la composición de los lisados, se analizó la concentración de proteínas totales, Albúmina e inmunoglobulina G (IgG), así como los niveles de PDGF-AB en todas las soluciones fabricadas.

Como muestra la figura 11, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de **proteínas totales** entre el LP1 y el LP2 ($2,50 \pm 0,04$ g/dL; $n=4$ y $2,77 \pm 0,04$ g/dL; $n=17$ respectivamente) ($p < 0,01$) y entre el LP2 y el LP2i ($2,77 \pm 0,04$ g/dL; $n=17$ y $2,50 \pm 0,04$ g/dL; $n=6$ respectivamente) ($p < 0,01$); y que no existían diferencias en dicha variable entre el LP1 y el LP2i.

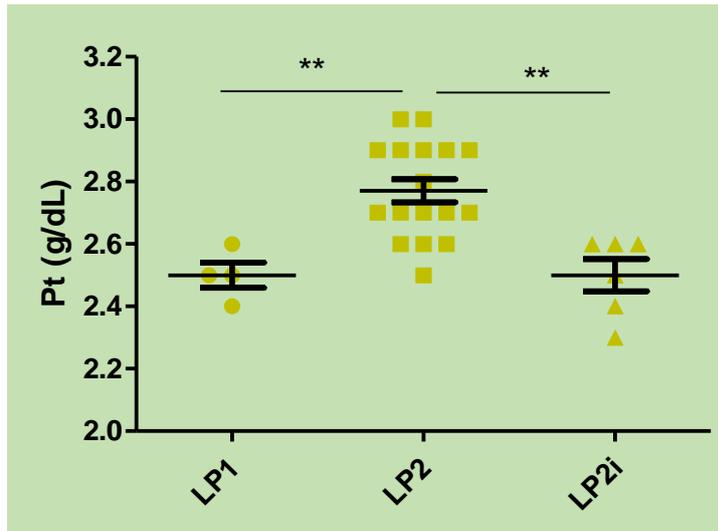


Figura 11: Efecto del método de fabricación del lisado sobre la concentración de proteínas totales. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni; ** $p < 0,01$

Los resultados para la concentración de **Albúmina** se representan en la figura 12. En este caso, obtuvimos diferencias significativas entre LP1 y LP2 (**13,73 \pm 0,28 g/L; n=4 y 15,10 \pm 0,19 g/L; n=17 respectivamente**) ($p < 0,01$); LP1 y LP2i (**13,73 \pm 0,28 g/L; n=4 y 11,88 \pm 0,28 g/L; n=6 respectivamente**) ($p < 0,01$), así como entre LP2 y LP2i (**15,10 \pm 0,19 g/L; n=17 y 11,88 \pm 0,28 g/L; n=6 respectivamente**) ($p < 0,001$).

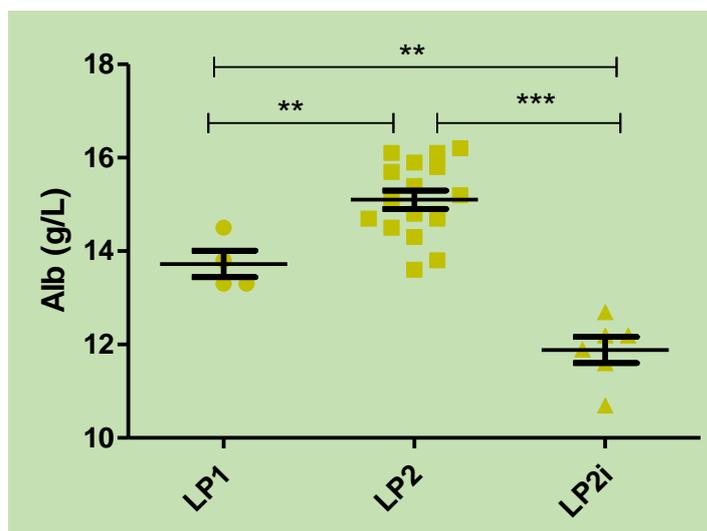


Figura 12: Efecto del método de fabricación del lisado sobre la concentración de Albúmina. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Los resultados obtenidos para la concentración de **IgG** se representan en la figura 13. En este caso se observaron diferencias significativas entre LP1 y LP2 (**3,30±0,16 g/L; n=4** y **3,92±0,11 g/L; n=17 respectivamente**) ($p<0,05$), así como entre LP2 y LP2i (**3,92±0,11 g/L; n=17** y **3,42±0,06 g/L; n=6 respectivamente**) ($p<0,05$). No se observaron diferencias significativas entre LP1 Y LP2i.

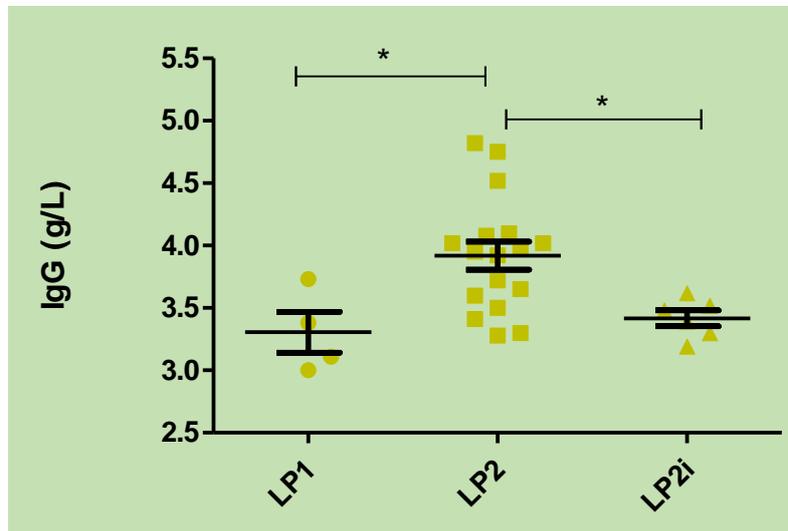


Figura 13: Efecto del método de fabricación del lisado sobre la concentración de IgG. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni; * $p<0,05$

Los resultados obtenidos para la concentración del factor plaquetario PDGF-AB (ng/mL) se representan en la figura 14 para cada tipo de lisado. En este caso se obtuvo que existían diferencias estadísticamente significativas en la concentración de PDGF-AB entre el LP1 y el LP2 (**17,74 \pm 2,08 ng/mL; n=7** y **33,29 \pm 2,04 ng/mL; n=18 respectivamente**) ($p<0,001$); entre el LP2 y el LP2i (**33,29 \pm 2,04 ng/mL; n=18** y **22,63 \pm 3,09 ng/mL; n=5, respectivamente**) ($p<0,05$); y que no existían diferencias en dicha variable entre el LP1 y el LP2i.

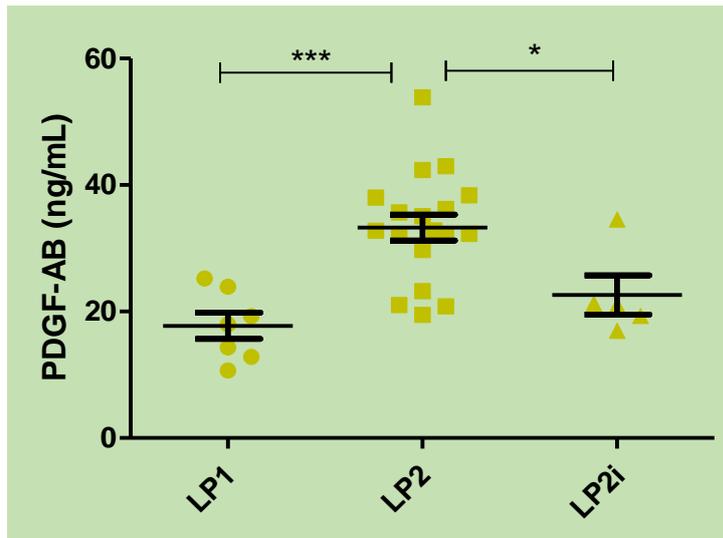


Figura 14: Efecto del método de fabricación del lisado en la concentración de PDGF-AB. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico ANOVA de un factor seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

4.2.1) Test de actividad de las soluciones sobre fibroblastos dérmicos (FBs)

Con el objetivo de conocer la funcionalidad de los lisados, se realizaron test de actividad con todos los lotes fabricados (mirar detalles del ensayo en la sección 3.2.11. de materiales y métodos) sobre fibroblastos dérmicos humanos (FBs) y sobre células madre mesenquimales aisladas de cordón (hUC-MSCs).

Para el caso de fibroblastos en cultivo, como se observa en la figura 15 se obtuvieron diferencias significativas entre LP2 y su control ($p < 0,001$); y entre LP2i y su control ($p < 0,05$). Entre LP1 y su control no se hallaron diferencias significativas.

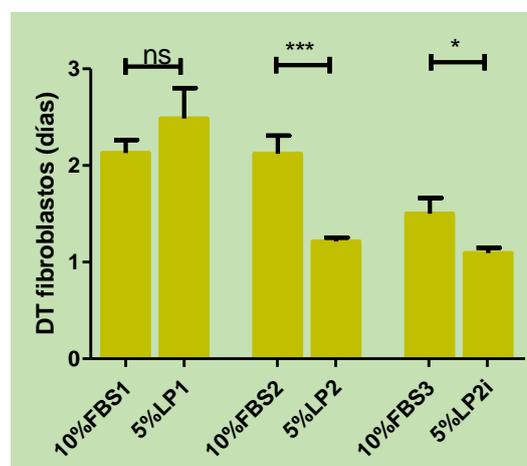


Figura 15: Efecto del método de fabricación del lisado sobre el tiempo de duplicación de fibroblastos en cultivo. Se empleó un 5% como suplemento de cada lisado frente a un 10% de

FBS (solución control). Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico t de Student cada lisado con su control de FBS; ns: no significativo, * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$

La morfología de los fibroblastos cultivados con los diferentes lisados plaquetario no se vio alterada, aunque si se apreció un menor tamaño y células más alargadas (ver figura 16).

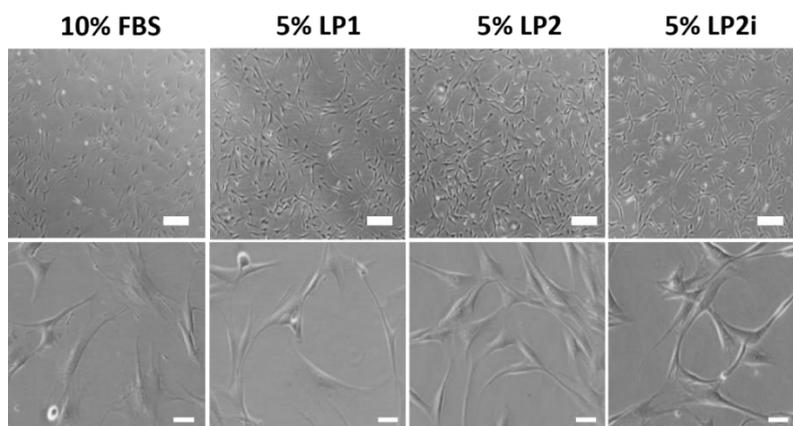


Figura 16: Morfología de fibroblastos. Células cultivadas al menos 3 pases con un 5% de las diferentes soluciones de lisado plaquetario (LP1, LP2 o LP2i), así como con un 10% de la solución control (FBS).

Para conocer si había **relación entre la proliferación celular y el valor del factor plaquetario**, se comparó el cociente en los tiempos de duplicación entre el FBS y el lisado (DT FBS/DT hLP) y la concentración de PDGF-AB, ver figura 17. En el caso de los fibroblastos, obtuvimos un coeficiente de correlación de Pearson ($r=0,64$), con un nivel de significación $p < 0,001$. Lo cual nos indicaba que a mayor concentración de PDGF-AB, el tiempo de duplicación del lisado disminuye frente al control, es decir es mejor la duplicación con el lisado.

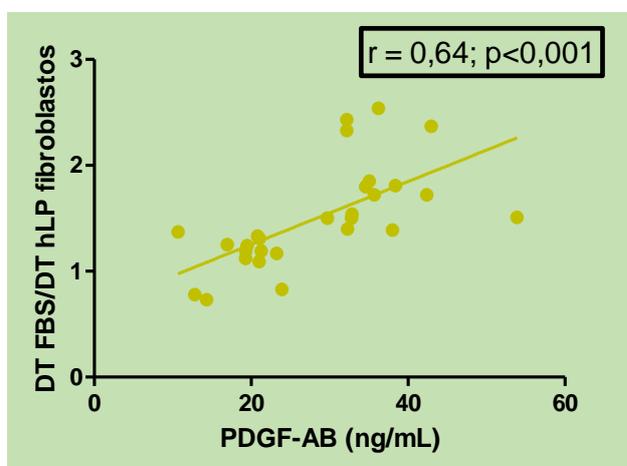


Figura 17: Correlación entre la ratio de los tiempos de duplicación control vs lisado y la concentración de PDGF-AB en cultivos de fibroblastos.

En el caso de los test de actividad realizados sobre células madre **mesenquimales de cordón**, los resultados se representan en la figura 18. En este caso no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de duplicación de las células *versus* su control. Cabe destacar que, en este caso, la solución control se empleó a un 15% a diferencia del 10% empleado en el test de actividad de fibroblastos.

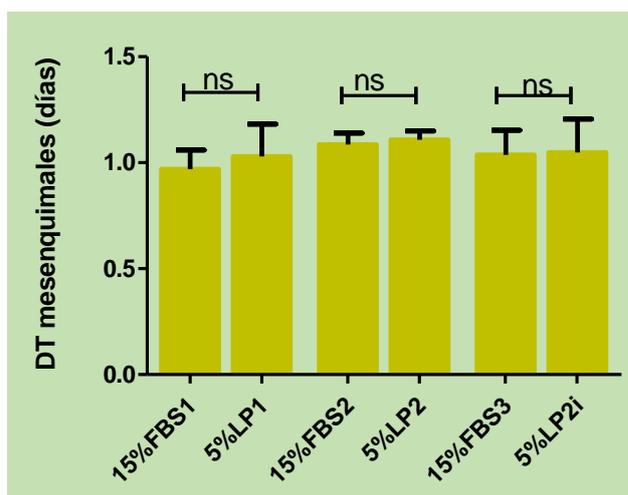


Figura 18: Test de actividad sobre células madre mesenquimales aisladas de cordón (hUC-MSCs). Se comparó cada lisado con el FBS control. Los datos se representan como la media \pm SEM y se analizaron con el estadístico t de Student cada lisado con su control de FBS; ns: no significativo,

En el caso de las células madre **mesenquimales** se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson (r)=0,80, con un nivel de significación $p < 0,01$ como se muestra en la figura 19.

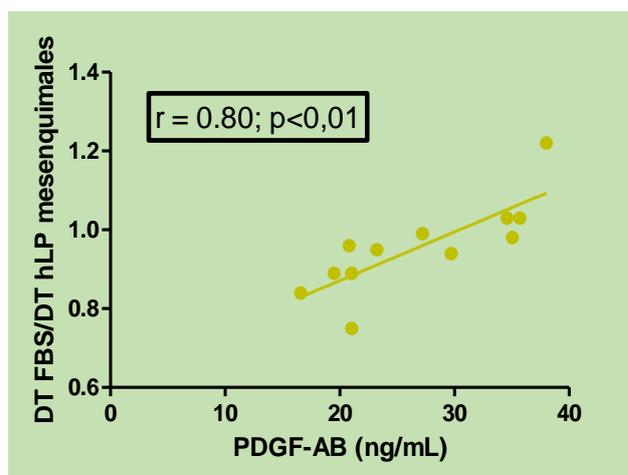


Figura 19: Correlación entre la ratio de los tiempos de duplicación control vs lisado y la concentración de PDGF-AB en cultivos de células mesenquimales

4.2.1) Controles microbiológicos

Acorde a lo establecido por las Autoridades Reguladoras, durante la fabricación de medicamentos es necesario controlar tanto el proceso de fabricación como los productos obtenidos desde el punto de vista microbiológico. Por ello, se realizó un test de micoplasma, endotoxinas, virus adventicios y test de esterilidad tras la liberación de los diferentes productos. Los resultados se recogen en la tabla 11.

Tabla 11: Resultados microbiológicos obtenidos en los lotes de lisado plaquetario fabricados.

Tipo de lisado	Lote de lisado	Ensayo			
		Esterilidad	Micoplasma	Endotoxinas	Virus Adventicios
LP1	LP-1501	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no realizado
	LP-1502	conforme	ausencia	<2,5Eu/mL	no realizado
	LP-1503	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no realizado
	LP-1601	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no realizado
	LP-1602	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no realizado
	LP-1701	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP-1702	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
LP2	LP2-1801	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1802	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1803	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1804	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1805	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1806	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1807	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1808	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1809	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2-1810	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
LP2i	LP2i-2001	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2i-2101	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan
	LP2i-2102	conforme	ausencia	<2,5EU/mL	no se detectan

4.3) Bloque III: Estudios de estabilidad de los lisados plaquetarios almacenados a diferentes temperaturas.

4.3.1) Estabilidad de los concentrados de plaquetas congelados

Para conocer la estabilidad de los concentrados de plaquetas congelados y con el objetivo de establecer su caducidad, se analizó si existían diferencias significativas entre lisados plaquetarios fabricados con plaquetas almacenadas a -80°C, con un tiempo de congelación (≥13 meses), y tras un corto tiempo de congelación (≤ 1 mes). Esto se testó durante la fabricación del LP2.

Para ello, se analizó la concentración de proteínas totales, la concentración de PDGF-AB y el número de duplicaciones celulares obtenidas tras el cultivo de fibroblastos suplementados con los dos grupos de lisados plaquetarios.

Como se observa en la figura 20, no se observaron diferencias significativas en la concentración de proteínas entre los dos grupos, obteniéndose para los fabricados con plaquetas con menos de un mes de congelación $2,83 \pm 0,04 \text{g/dL}$; ($n=6$), y para los de 13 meses $2,70 \pm 0,07 \text{g/dL}$; ($n=6$), $p=0,14$ (figura 20a). Sin embargo, si se obtuvieron diferencias significativas respecto a los resultados de PDGF-AB tras comparar el grupo de 1 mes versus 13 meses ($37,38 \pm 1,94 \text{ng/mL}$ y $25,89 \pm 3,04 \text{ng/mL}$, $p=0,009$, respectivamente) (figura 20b).

Respecto a las tasas de duplicación obtenidas en fibroblastos cultivados con las soluciones, se obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos ($2,57 \pm 0,23$ y $1,79 \pm 0,08$, $p=0,02$) para 1 mes y 13 meses respectivamente (figura 20c).

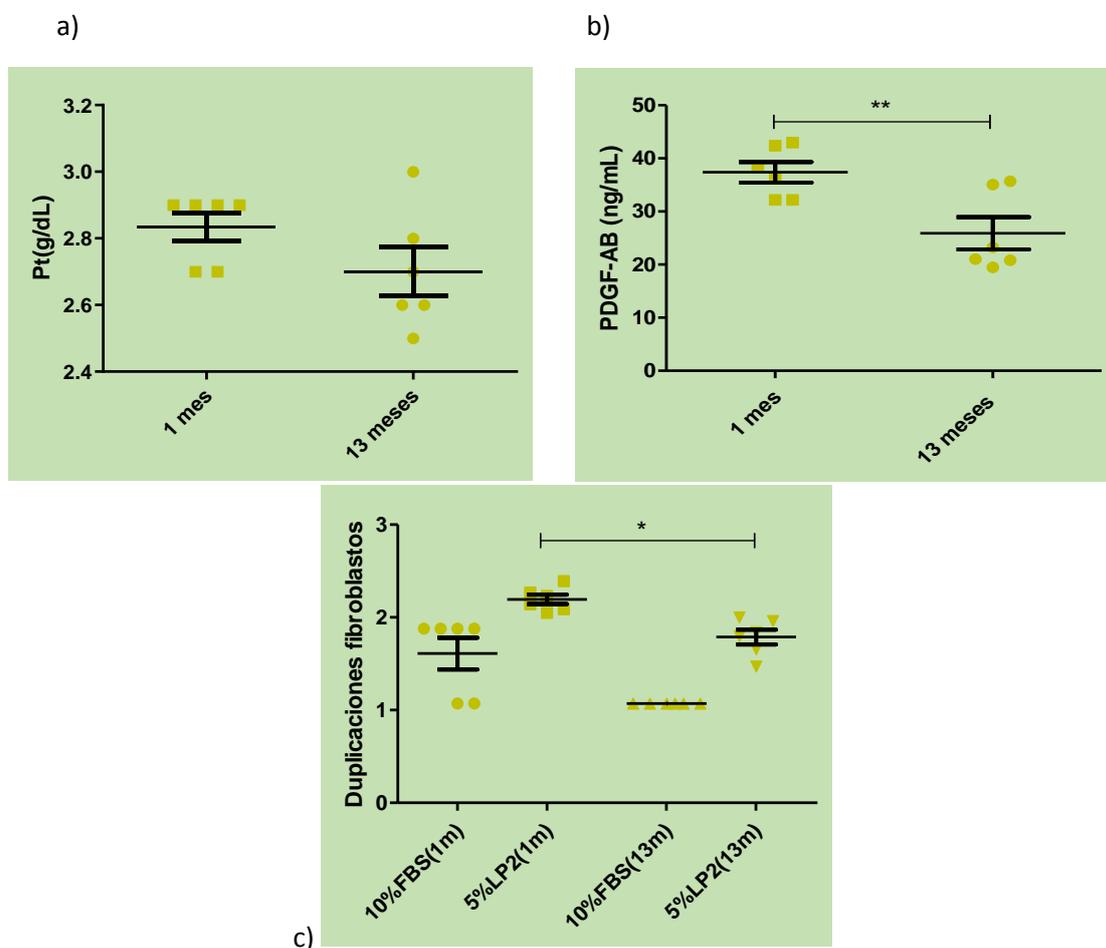


Figura 20: Estudio de variación en la concentración de proteínas, PDGF-AB y las tasas de duplicación en fibroblastos para los lisados fabricados a partir de plaquetas congeladas almacenadas a distinto tiempo. Los datos se representan como la media \pm SEM para $n=6$ y se analizaron con el estadístico t de Student para muestras independientes. * $p<0,05$; ** $p<0,01$

4.3.2) Estabilidad del plasma inactivado congelado

Para estudiar la estabilidad del plasma inactivado almacenado a -80°C durante dos años, se analizaron diferentes parámetros en las muestras: niveles de pH, concentración de proteínas totales, Albúmina e IgG.

No se encontraron diferencias significativas para los valores de pH ($7,12\pm 0,06$ y $7,07\pm 0,02$, $p=0,34$) para tiempo 0 y 24 meses respectivamente (figura 21a). Respecto a la cuantificación de proteínas, se encontraron diferencias significativas en la concentración de proteínas totales ($5,4\pm 0,11\text{g/dL}$ y $4,9\pm 0,08\text{g/dL}$, $p=0,005$) y de Albúmina ($29,33\pm 1,93\text{g/L}$ y $26,70\pm 1,56\text{g/L}$, $p=0,04$), entre el tiempo 0 y a los 24 meses (figuras 21b y 21c respectivamente). La concentración de IgG no mostró diferencias significativas ($5,52\pm 0,21\text{g/L}$ y $5,14\pm 0,08\text{g/L}$, $p=0,19$) entre los grupos analizados (figura 21d).

Si se tienen en cuenta los coeficientes de variación de los métodos de medición de concentración de proteínas y de Albúmina según fabricante (1,4% y 2,3% respectivamente), se puede considerar que las diferencias observadas no tienen una relevancia significativa. Por lo que podemos concluir que los lisados fabricados con plasma inactivado y almacenado a -80°C durante 24 meses sigue siendo óptimo.

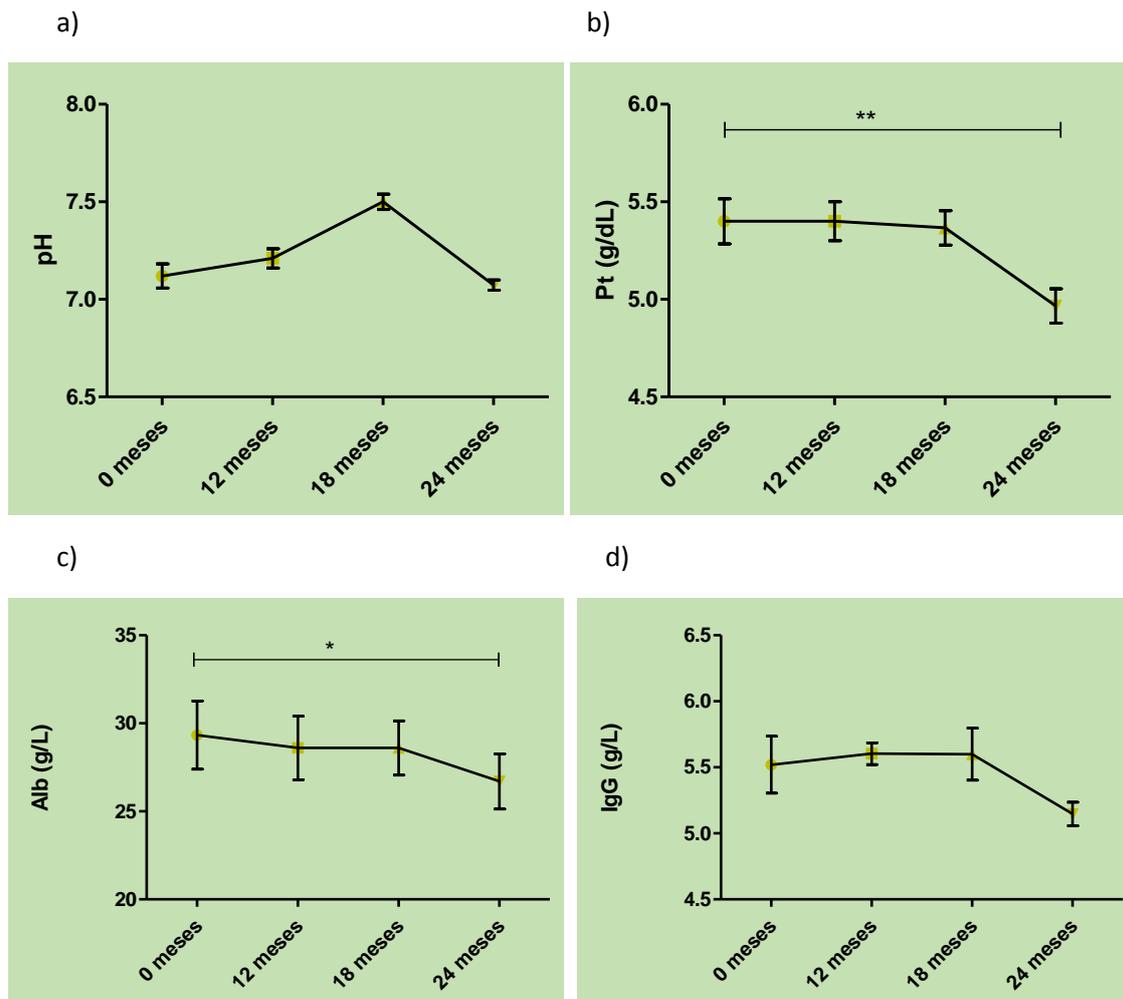


Figura 21: Estudio de estabilidad del plasma inactivado almacenado a -80°C durante 24 meses. Los datos de pH (a), Proteínas totales (b), Albúmina (c) e IgG (d) se representan como la media

± SEM para n=3. Se aplicó el estadístico t de Student par muestras relacionadas entre los grupos 0 y 24 meses. * p<0,05 y ** p<0,01.

4.3.3) Estabilidad del lisado plaquetario 1 (LP1)

Para los estudios de estabilidad del lisado plaquetario 1 se evaluaron diferentes parámetros en muestras (n=3) congeladas y almacenadas durante 18 y 24 meses a -20°C. Los resultados para los ensayos de esterilidad, micoplasma, endotoxinas y virus adventicios estuvieron dentro de los criterios de aceptación (ver sección Materiales y Métodos), a los 24 meses de almacenamiento.

En este caso se analizó los niveles de pH (figura 22a), concentración de PDGF-AB (figura 22b) y duplicaciones celulares (figura 22c) en fibroblastos cultivados con las soluciones, no observándose diferencias significativas entre los grupos analizados. Los resultados fueron: pH (7,5±0,01 y 7,4±0,03, p=0,22); PDGF-AB (16,10±2,56ng/mL y 13,86±1,91ng/mL, p=0,22) y número de duplicaciones para fibroblastos (1,63±0,24 y 2,14±0,12, p=0,13) para los tiempos 0 y 24 meses respectivamente. Por lo que demostramos la estabilidad de estos lisados a -20°C durante 24 meses.

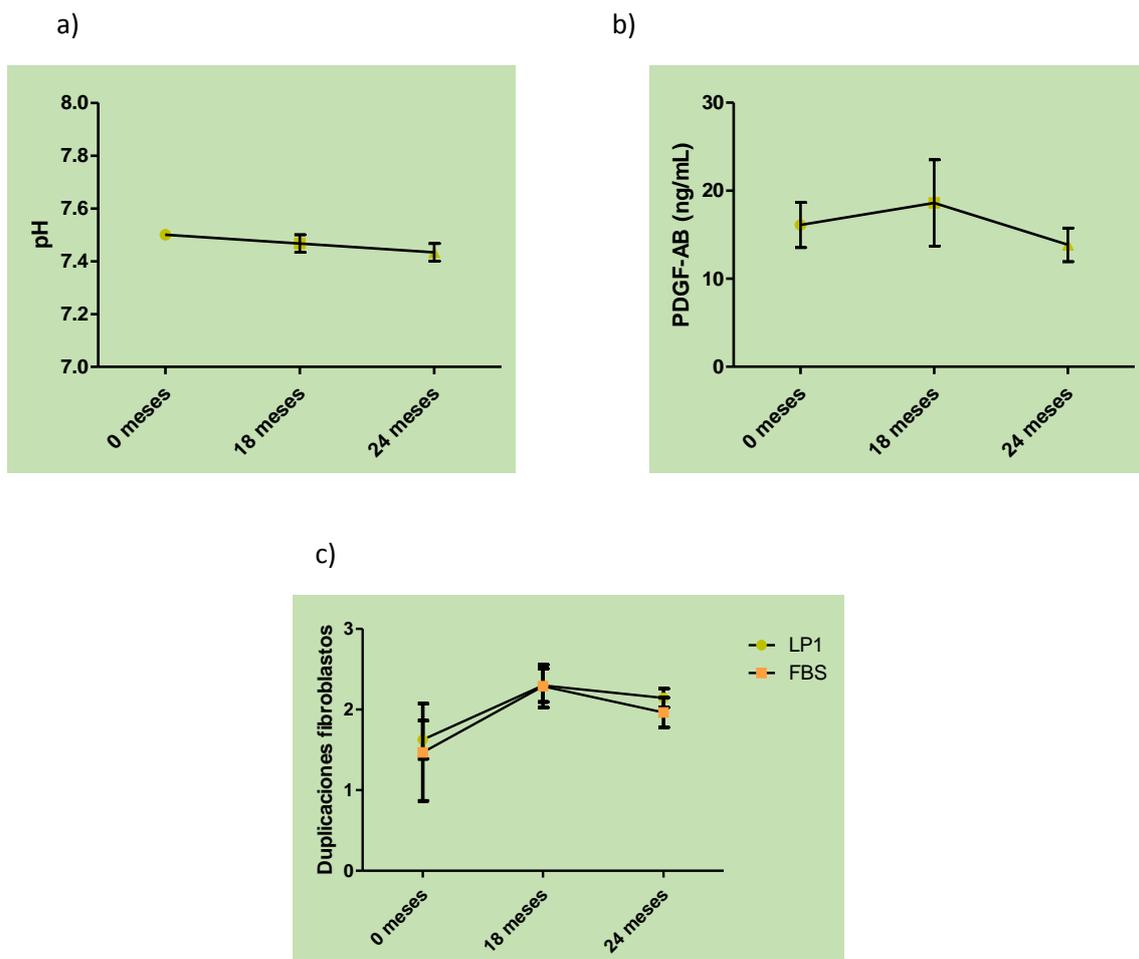


Figura 22: Estudio de estabilidad de los lisados LP1 almacenados durante 24 meses a -20°C. Los datos de pH (a), PDGF-AB (b) y duplicaciones celulares (c) se representan como la media ±

SEM, para n=3. Se aplicó el estadístico t de Student para muestras relacionadas entre 0 y 24 meses.

Todos estos resultados nos indican que el lisado plaquetario 1 (LP1) se mantiene estable almacenado a -20°C durante 24 meses.

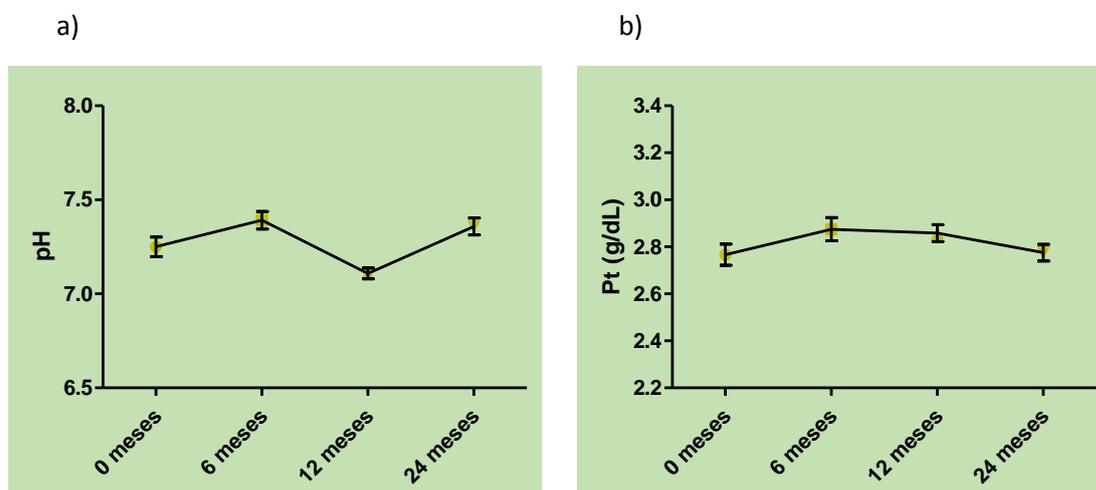
4.3.4) Estabilidad del lisado plaquetario 2 (LP2)

Para establecer la fecha de caducidad de los lisados LP2, se analizaron 12 lotes a los tiempos 0, 6, 12 y 24 meses a -80°C. Además, se analizaron muestras de los mismos lotes almacenadas a -20°C a los 24 meses.

Los resultados para los ensayos de esterilidad, micoplasma, endotoxinas y virus adventicios estuvieron dentro de los criterios de aceptación (ver sección Materiales y Métodos) a los 24 meses de almacenamiento a -80°C.

Se aplicó de t de Student para muestras relacionadas entre los grupos de los tiempos 0 y 24 meses para los datos de pH, Pt, Alb, IgG, PDGF-AB y duplicaciones de fibroblastos (ver figura 23). En este caso se obtuvo que no había diferencias significativas en los valores de pH ($7,2\pm 0,05$ y $7,4\pm 0,04$, $p=0,23$) (figura 23a), en las concentraciones de Pt ($2,77\pm 0,04\text{g/dL}$ y $2,77\pm 0,03\text{g/dL}$, $p=0,84$) (figura 23b), en las concentraciones de IgG ($3,89\pm 0,13\text{g/L}$ y $3,93\pm 0,06\text{g/L}$, $p=0,73$) (figura 23d), y en las concentraciones de PDGF-AB ($31,64\pm 2,44\text{ng/mL}$ y $28,27\pm 1,85\text{ng/mL}$, $p=0,10$) (figura 22e), para tiempos 0 y 24 meses respectivamente. Sin embargo, sí se obtuvieron diferencias significativas para las concentraciones de Alb ($15,21\pm 0,22\text{g/L}$ y $14,34\pm 0,24\text{g/L}$, $p=0,005$) (figura 23c) y en el número de duplicaciones de fibroblastos ($2,45\pm 0,10$ y $3,07\pm 0,07$, $p=0,003$) (figura 23f), para tiempos 0 y 24 meses almacenados a -80°C, respectivamente.

Analizando la diferencia estadísticamente significativa encontrada en la concentración de Alb y teniendo en cuenta el coeficiente de variación de la técnica (2,3%), las diferencias de las medias estarían próximas al error de precisión, por lo que podemos considerar que la concentración de Albúmina se mantiene estable en los 24 meses.



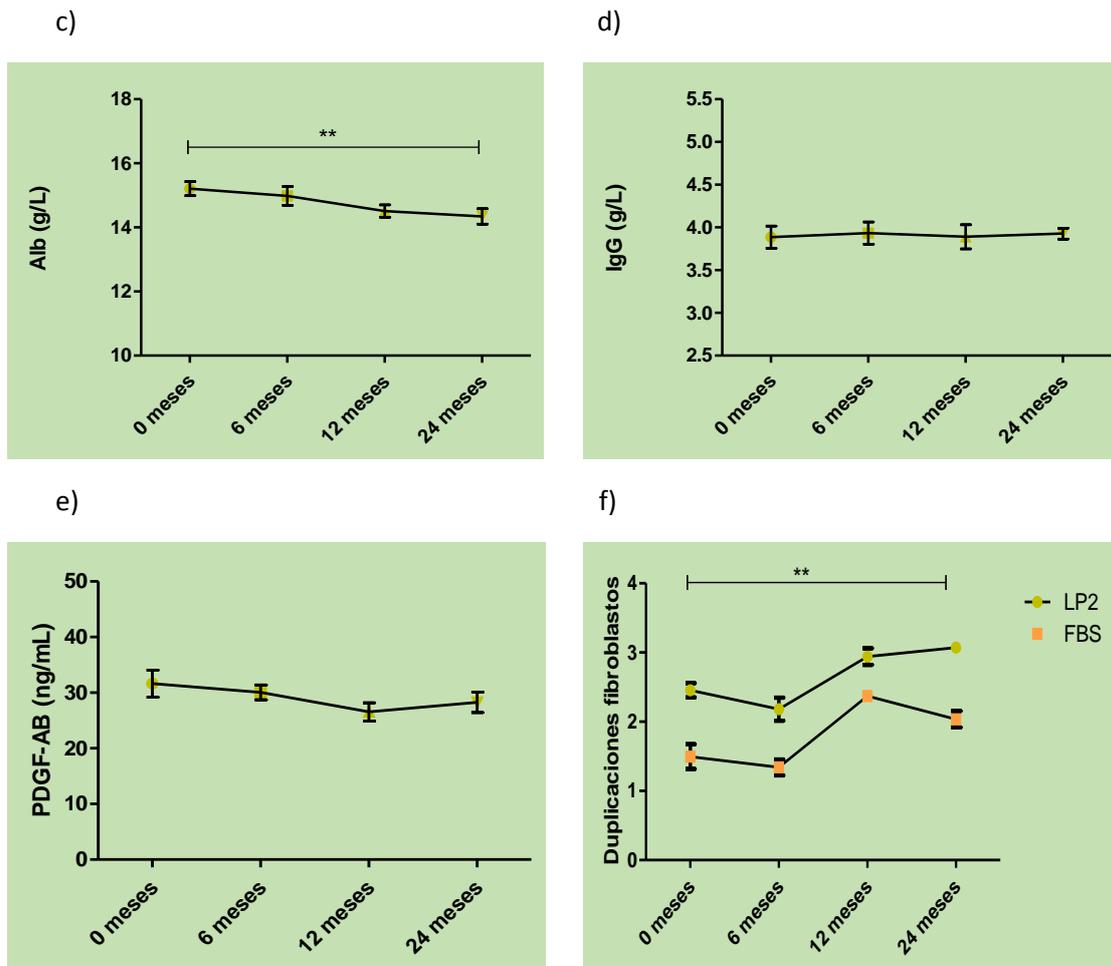


Figura 23: Estudio de estabilidad de los lisados LP2 almacenados durante 24 meses a -80°C. Los datos de pH (a), Pt (b), Alb (c), IgG (d), PDGF-AB (e) y duplicaciones celulares (f) se representan como se representan como la media \pm SEM, para n=12. Se aplicó el estadístico t de Student para muestras relacionadas entre 0 y 24 meses, ** p<0,01.

Todos estos resultados nos indican que el lisado plaquetario 2 (LP2) se mantiene estable almacenado a -80°C durante 24 meses.

Adicionalmente, se compararon 12 lotes de lisado LP2 almacenados durante 24 meses a las dos temperaturas, -20°C y -80°C. En este caso, no se obtuvieron diferencias para los valores de pH ($7,32\pm 0,05$ y $7,36\pm 0,05$, $p=0,09$) (figura 24a), las concentraciones de Pt ($2,79\pm 0,04$ g/dL y $2,77\pm 0,03$ g/dL, $p=0,44$) (figura 24b), las concentraciones de IgG ($3,90\pm 0,11$ g/L y $3,93\pm 0,06$ g/L, $p=0,74$) (figura 24d), las concentraciones de PDGF-AB ($27,10\pm 1,41$ ng/mL y $28,27\pm 1,85$ ng/mL, $p=0,49$) (figura 24e) y para el número de duplicaciones con fibroblastos ($3,01\pm 0,09$ y $3,07\pm 0,03$, $p=0,07$) (figura 24f) para temperaturas de -20°C y -80°C respectivamente.

Sin embargo, si se observaron diferencias significativas para la concentración de Alb ($14,78\pm 0,22$ g/L y $14,34\pm 0,24$ g/L, $p=0,003$) (figura 24c), para temperaturas de -20°C y -80°C respectivamente. La diferencia estadísticamente significativa estuvo dentro de la imprecisión de la técnica de medición.

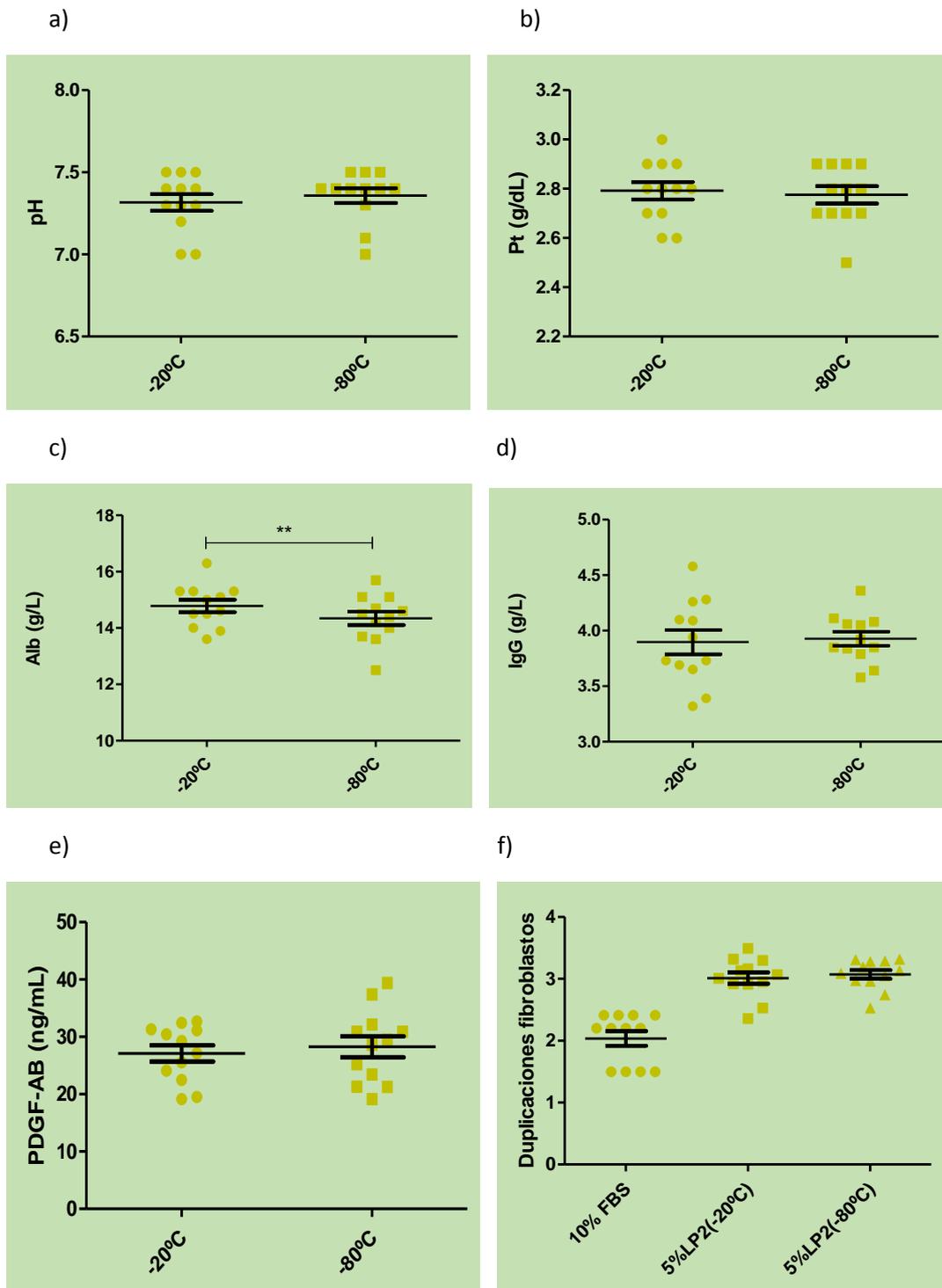


Figura 24: Estudio de estabilidad de los lisados LP2 almacenados durante 24 meses a -20°C y a -80°C. Los datos de pH (a), Pt (b), Alb (c), IgG (d), PDGF-AB (e) y duplicaciones celulares (f) se representan como la media \pm SEM. Se analizó con la prueba t de Student para muestras relacionadas entre las dos temperaturas. Los datos se representan como la media \pm SEM, para $n=12$, ** $p<0,01$.

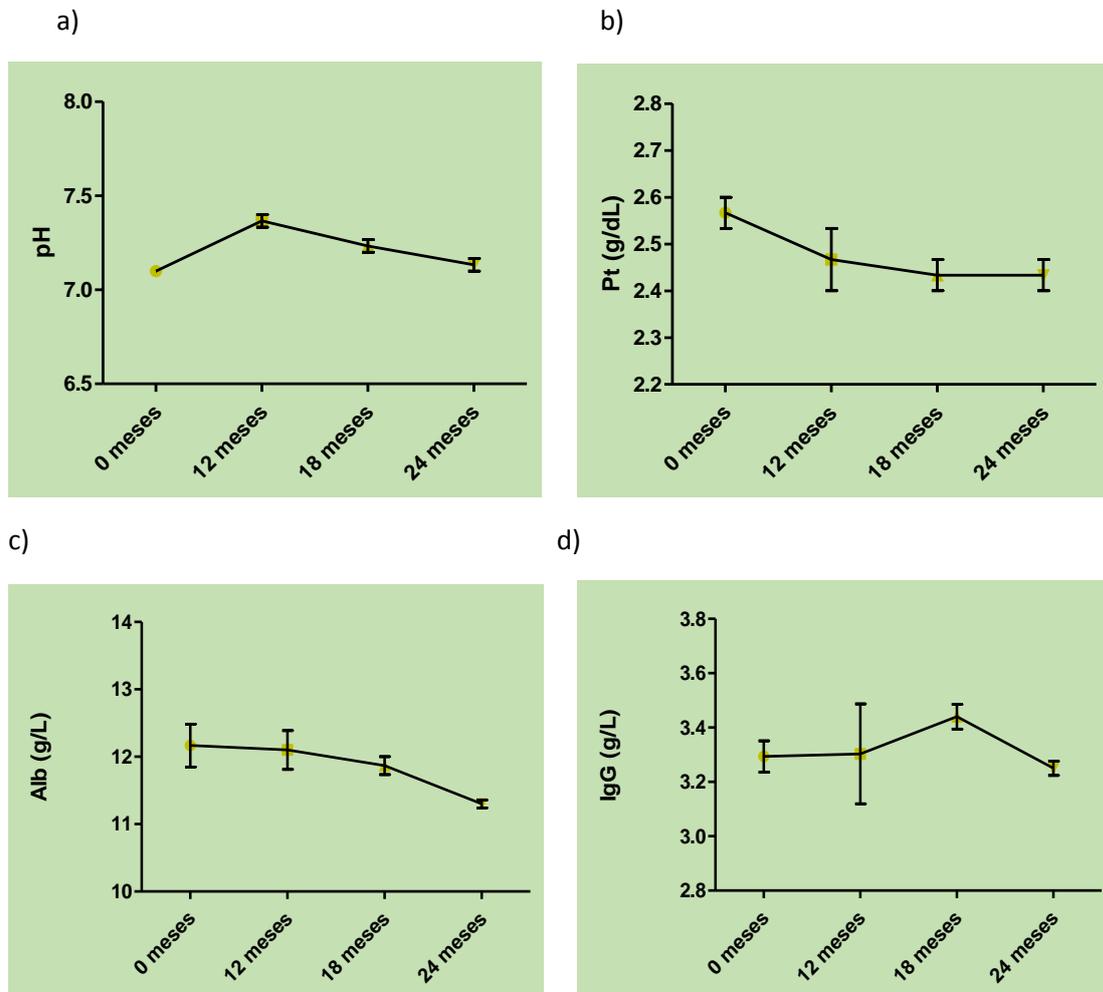
Todos estos resultados nos indican que el lisado plaquetario 2 (LP2) se mantiene estable almacenado a -20°C y a -80°C durante 24 meses.

4.3.1) Estabilidad del lisado plaquetario inactivado (LP2i)

En el estudio de estabilidad del lisado inactivado se analizaron 3 lotes almacenados a -80°C a los tiempos 0, 12, 18 y 24 meses. También se compararon estos parámetros a los 24 meses de almacenamiento entre las dos temperaturas -20°C y -80°C .

En el caso de las soluciones almacenadas a -80°C , no se obtuvieron diferencias significativas para los valores de pH ($7,10\pm 0,00$ y $7,13\pm 0,03$, $p=0,42$) (figura 25a), para las concentraciones de Pt ($2,57\pm 0,03\text{g/dL}$ y $2,43\pm 0,03\text{g/dL}$, $p=0,057$) (figura 25b), de Alb ($12,17\pm 0,32\text{g/L}$ y $11,30\pm 0,06\text{g/L}$, $p=0,080$) (figura 25c), de IgG ($3,29\pm 0,06\text{g/L}$ y $3,25\pm 0,03\text{g/L}$, $p=0,43$) (figura 25d) y de PDGF-AB ($20,18\pm 0,57\text{ng/mL}$ y $28,89\pm 3,38\text{ng/mL}$, $p=0,24$) (figura 25e).

Para el análisis de las tasas de crecimiento se realizaron test de actividad con fibroblastos y mesenquimales. En este caso, no se obtuvieron diferencias significativas en el número de duplicaciones en fibroblastos ($3,04\pm 0,05$ y $2,55\pm 0,20$, $p=0,08$) (figura 25f) y mesenquimales ($3,26\pm 0,72$ y $3,41\pm 0,09$, $p=0,85$) (figura 25g) cultivadas con las soluciones almacenadas a tiempo 0 y 24 meses respectivamente.



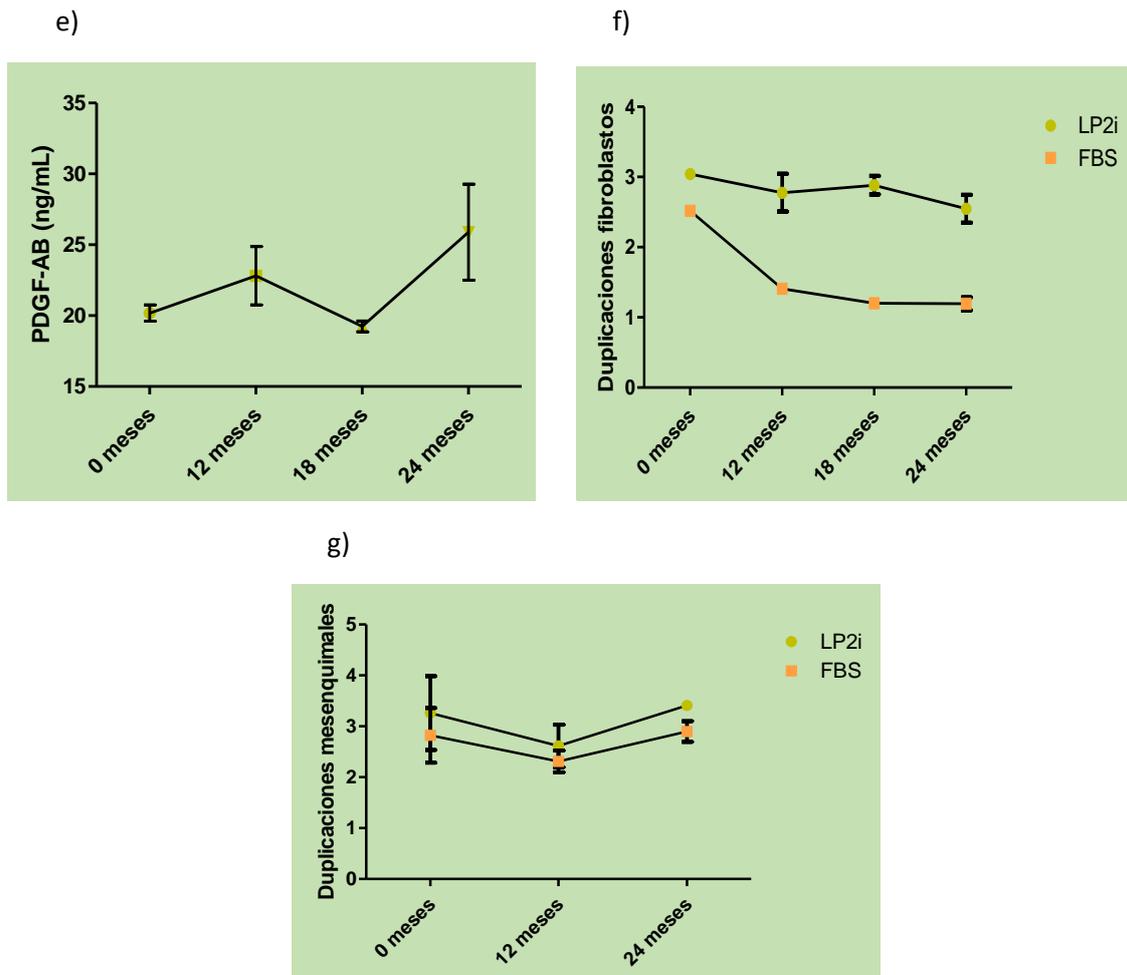
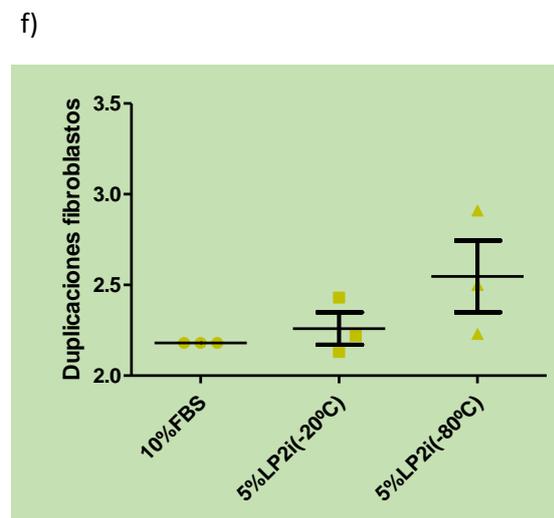
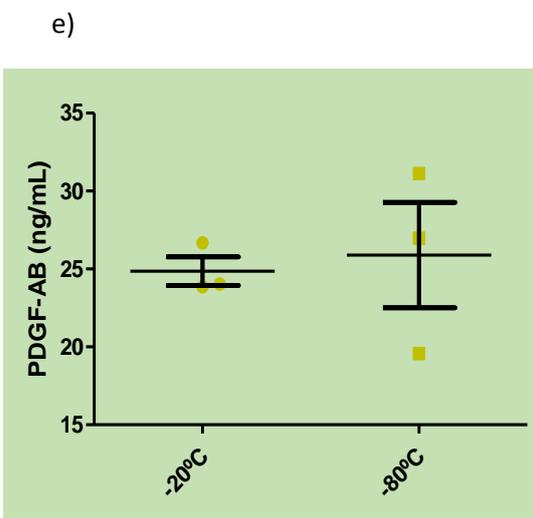
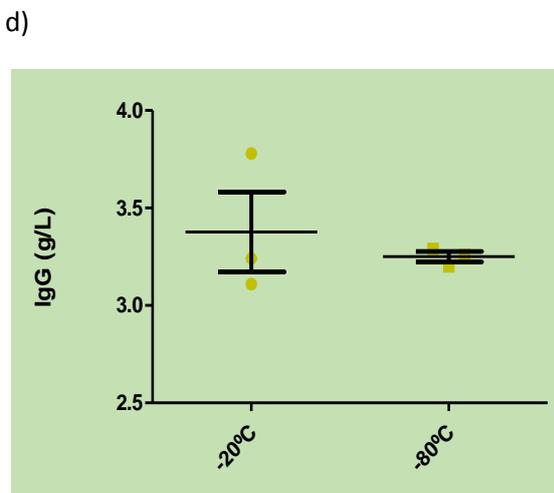
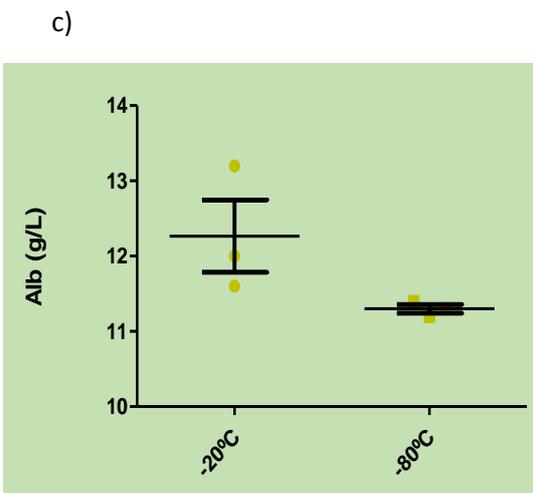
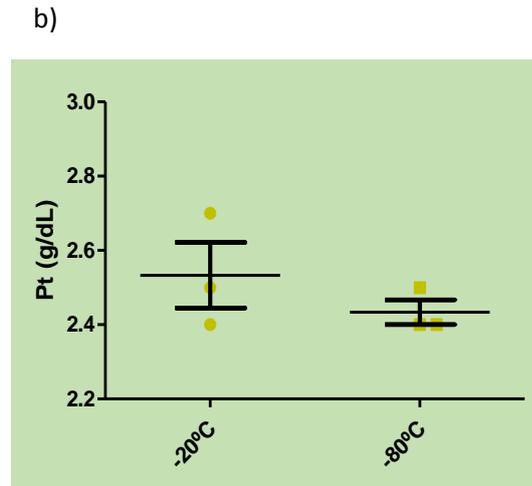
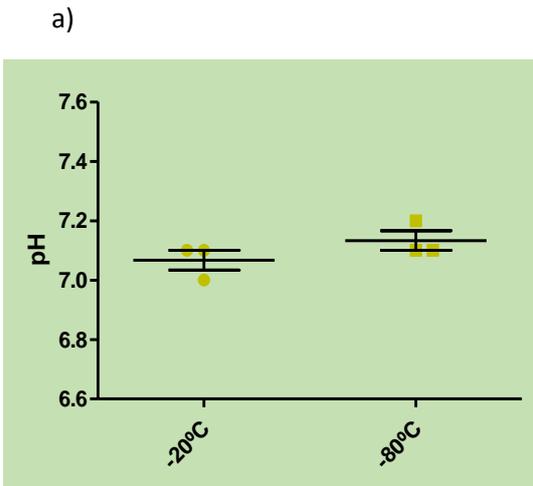


Figura 25: Estudio de estabilidad de los LP2i almacenados durante 24 meses a -80°C. Los datos de pH (a), Pt (b), Alb (c), IgG (d), PDGF-AB (e), duplicaciones celulares en fibroblastos (f) y duplicaciones celulares en mesenquimales (g) se representan como la media \pm SEM, n=3. Análisis de t de Student para muestras relacionadas entre 0 y 24 meses, $p > 0,05$.

En el caso de la comparativa realizada entre las soluciones almacenadas a -20°C y -80°C, tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de pH ($7,06 \pm 0,03$ y $7,13 \pm 0,03$, $p=0,18$) (figura 26a), en las concentraciones de Pt ($2,53 \pm 0,09$ g/dL y $2,43 \pm 0,03$ g/dL, $p=0,42$) (figura 26b), de Alb ($12,27 \pm 0,48$ g/L y $11,30 \pm 0,06$ g/L, $p=0,21$) (figura 26c), de IgG ($3,38 \pm 0,20$ g/L y $3,25 \pm 0,03$ g/L, $p=0,59$) (figura 26d) y de PDGF-AB ($24,85 \pm 0,91$ ng/mL y $25,89 \pm 3,38$ ng/mL, $p=0,83$) (figura 26e). Respecto a las tasas de crecimiento, el número de duplicaciones obtenidas en fibroblastos ($2,26 \pm 0,09$ y $2,55 \pm 0,20$, $p=0,18$) (figura 26f) no se alteraron con el tiempo a ambas temperaturas de -20°C y -80°C. Sin embargo, el número de duplicaciones con las mesenquimales experimentó un aumento estadísticamente significativo utilizando lisados inactivados almacenados a -20°C ($3,18 \pm 0,09$) frente a los lisados inactivados almacenados a -80°C ($3,41 \pm 0,09$), $p=0,003$.



g)

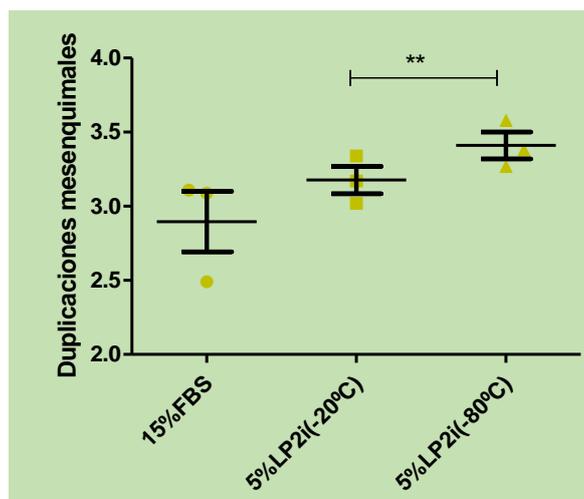


Figura 26: Estudio de estabilidad de los LP2i almacenados durante 24 meses a -20°C y a -80°C. Los datos de pH (a), Pt (b), Alb (c), IgG (d), PDGF-AB (e), duplicaciones celulares en fibroblastos (f) y duplicaciones celulares en mesenquimales (g) se representan como la media \pm SEM, para $n=3$. ** $p<0,01$. Se aplicó el estadístico t de Student para muestras relacionadas. Los datos se representan.

Todos estos resultados nos indican que el lisado plaquetario 2 inactivado (LP2i) se mantiene estable almacenado a -20°C y a -80°C durante 24 meses.

5) DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis se ha centrado en optimizar el proceso de fabricación de un lisado plaquetario humano calidad GMP, analizando etapas críticas del método de obtención con el fin de mantener la calidad de los productos. Finalmente nos hemos centrado en tres métodos concretos (LP1, LP2 y LP2i) que presentaban mayores ventajas, ya fuese desde el punto de vista logístico como desde el punto de vista de la calidad del producto obtenido, garantizando la homogeneidad de los procesos y seguridad.

Estos métodos han sido validados bajo NCF y caracterizados en mayor profundidad. Durante el proceso de validación se han aplicado controles de calidad que nos han ayudado a controlar la calidad de nuestros productos desde el punto de vista de su composición y funcionalidad. Para analizar la potencia de nuestras soluciones, se han testado como suplementos del medio de cultivo de fibroblastos dérmicos adultos y células madre mesenquimales aisladas de cordón. Estos tipos celulares están a su vez siendo empleados en la fabricación de otros medicamentos de terapias avanzadas, para uso compasivo o en ensayos clínicos.

5.1.1) Uso de concentrados de plaquetas frescas vs caducadas.

La concentración de plaquetas está relacionada con la concentración de factores plaquetarios en el lisado^{61, 62}. En la literatura encontramos valores para la fabricación del hPL como la del grupo Bianchetti⁶³ de 1×10^6 Plt/ μ L. O según los datos analizados de varios centros de producción por Strunk⁴⁸ y colaboradores, la concentración más frecuente fue 2×10^{11} plaquetas por concentrado, por lo que para un concentrado de 400mL, esta sería $0,5 \times 10^6$ Plt/ μ L.

En el trabajo de investigación de Lange⁶² encontraron que por debajo de $1,5 \times 10^6$ Plt/ μ L, la proliferación de las MSCs disminuía. Según el grupo de Becherucci⁶⁴ la concentración de plaquetas para un lote de hPL debe estar entre $1,6$ y $2,4 \times 10^6$ Plt/ μ L, para que la proliferación celular sea adecuada, de hecho es uno de los criterios de liberación de sus lotes. Laitinen¹⁸ y colaboradores, en su estudio vieron que la proliferación de hBM-MS, se reducía si partían de una concentración de plaquetas menor a $0,8 \times 10^5$ Plt/ μ L.

La concentración de plaquetas para nuestra solución LP1 quedó establecida en 1×10^6 Plt/ μ L, contenida en un 40% de plasma y un 60% de solución aditiva. Para el caso del LP2, se partió de concentrados de plaquetas acorde al estándar de transfusión ($1,5 \times 10^6$ Plt/ μ L). A estos se le añadió un 20% volumen de plasma, por lo que, teniendo en cuenta la dilución, la concentración final de plaquetas para el LP2 se estableció en $1,2 \times 10^6$ Plt/ μ L.

Con respecto a las ratios de proliferación observados en fibroblastos y mesenquimales, con las soluciones establecidas en nuestro estudio (LP1, LP2 y LP2i) se han obtenido ratios de proliferación celulares iguales o superior a los observados con la solución control. Para el caso del lisado plaquetario inactivado (LP2i) la tasa de proliferación se mantuvo a pesar de que con el método de inactivación se alteró significativamente su composición. Respecto a la concentración de plaquetas de partida, podemos concluir que nuestros lisados plaquetarios han cumplido con los estándares de la transfusión para mantener una proliferación adecuada tanto en células mesenquimales como en fibroblastos dérmicos.

Otro factor estudiado en la literatura ha sido la comparación entre utilizar **plaquetas de aféresis o de buffy – coat (BC)**. Según los datos del equipo de Lozano⁶⁵ el contenido plaquetario y el volumen del producto es similar entre la aféresis y 4-5 *pool*es de BC. El grupo de Fekete³¹ comprobó que no existían diferencias significativas entre los dos grupos, en el contenido de citoquinas o en la proliferación de MSCs. Mientras que Sonker⁶⁶ y colaboradores encontraron mayor concentración de factores a partir de BC, pudiendo ser la diferencia procedente de los leucocitos, aunque la proliferación de fibroblastos fue similar. En nuestro caso, los productos empleados para la fabricación de los lisados plaquetarios han sido concentrados de plaquetas leucodeplecionados procedentes de BC, comprobando la ausencia de leucocitos en los productos finales.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de fabricar el lisado plaquetario es el **empleo o no de plaquetas caducadas**. En una sesión de 2019⁹ del grupo de trabajo de Terapia Celular de la ISBT, dónde participaron 40 interesados en el lisado tanto del mundo académico como de la industria, se concluyó que hay suficientes evidencias para recomendar el **uso de** concentrados de plaquetas caducados para la fabricación de estos productos. Hasta el momento, los estudios se han centrado en analizar cómo afecta utilizar concentrados de plaquetas después de su fecha de caducidad sobre la proliferación celular. A Este respecto, Chan⁶⁷ y colaboradores no hallaron diferencias significativas en el crecimiento de fibroblastos cultivados con lisado plaquetario fabricado a partir de plaquetas con dos días de producción y 21 días de almacenamiento. Fekete³¹ y su equipo también compararon lisados preparados a partir de *buffy coat* obtenidos el día 2 con los obtenidos el día 6 de la donación, obteniendo similares crecimiento en las hBM-MSC. Otro estudio fue el realizado por el grupo de Jonsdottir-Buch⁶⁸, quienes comprobaron en hBM-MSC cultivadas durante 6 pases que utilizar concentrados de plaquetas caducadas no afectaba a su proliferación. Por el contrario, Dessels⁶⁹ y colaboradores, obtuvieron una proliferación de hAT-MSC ligeramente menor con los concentrados caducados, pero en ambos casos los lisados superaron a la proliferación con FBS, lo cual fue atribuido a la menor concentración de plaquetas después del almacenamiento ($0,41 \times 10^9 \text{Plt}$ vs $2,03 \times 10^9 \text{Plt}$).

Otro de los estudios que analizó el efecto de usar o no plaquetas caducadas fue el realizado por el equipo de Glovinski⁷⁰. Estos utilizaron plaquetas caducadas aprovechando las que se desechan (del 13% al 17%), ya que para ellos el contenido de factores de crecimiento y de citoquinas en el hPL era lo más importante y no la función *in vivo* de las plaquetas. Comprobaron que las proteínas contenidas en los gránulos de las plaquetas, aún conservan su funcionalidad el 5º día⁵⁶.

En cuanto a la variación de la concentración de los factores de crecimiento y cómo se ve afectado el transcriptoma de las células sembradas con los distintos lisados, el grupo de Glovinski⁷⁰ comparó 3 lisados fabricados con plaquetas caducadas frente a uno control preparado con plaquetas frescas. Las diferencias de concentraciones de los factores (VEGF, EGF, PDGF-AB, TGF- β , bFGF e IGF-1) analizados tras emplear las soluciones de hPL en el cultivo de hAT-MSC no fueron relevantes. Se encontraron valores superiores para el bFGF e IGF-1 en los cultivos en los que se emplearon concentrados frescos y valores mayores para el EGF en los cultivos con concentrados caducados. Las diferencias se atribuyen a la liberación de los factores durante el almacenamiento o a la pérdida cuando se retira la solución aditiva para añadirle el plasma. Para el VEGF se encontraron valores similares en el día 0, pero conforme progresaba el cultivo aumentó unas 8 veces, indicando que las hAT-MSC lo producen. No se hallaron diferencias significativas en la proliferación de las hAT-MSC sembradas con los distintos lisados, aunque

expresaron 17 genes diferentes, dónde 10 de ellos estaban relacionados con el crecimiento celular.

Otro estudio realizado al respecto fue el de Sellberg⁷¹ y colaboradores, quienes observaron un aumento de un 30% en los niveles de PDGF-AB/BB, en el TGF- β y en PF4 en los lisados con concentrados de plaquetas almacenadas 5 días, mientras que para los factores IGF-1 y FGF-2 disminuyeron en un 20%. El aumento en los factores puede ser debido a la capacidad de las plaquetas de sintetizar proteínas a partir del ARNm presente en ellas. Además, este tampoco se vio alterado por el tratamiento de reducción de patógenos con amotosalen/UV.

Otros estudios analizaron además el fenotipo, las capacidades de diferenciación o de inmunomodulación de las células sembradas con los distintos lisados. En el grupo de Jonsdottir-Buch⁷² obtuvieron resultados similares para células mesenquimales cultivadas con concentrados de plaquetas del día 1 vs del día 6. Bianchetti⁶³ y colaboradores prefirieron utilizar concentrados de plaquetas frescos (tras 24h de la producción) para evitar la variabilidad en los lisados por la concentración de los factores.

Nuestros lisados plaquetarios han sido fabricados a partir de concentrados de plaquetas en el 5º día de almacenamiento antes de ser desechadas, por lo que, en nuestro caso, el uso de plaquetas caducadas no fue un factor limitante para la calidad de nuestros productos referida a la cantidad de proteínas analizadas y niveles de PDGF-AB. Esta diferencia en la concentración en los factores por el almacenamiento tendría que ser estudiada en mayor profundidad para analizar su significado clínico.

5.1.1) Uso de plasma grupo AB y plaquetas grupo O

Otro de los puntos importantes a decidir la hora de fabricar lisado plaquetario es que grupo sanguíneo de plasma y plaquetas a emplear. Al igual que realizó el grupo de Bianchetti⁶³, para la fabricación de nuestras soluciones hemos partido de concentrados de plaquetas leucodeplecionadas de grupo O y de plasma transfusional del grupo AB, evitando así la influencia de los antígenos ABO y de las isoaglutininas y con ello, una posible activación inmune o la hemólisis en la producción.

En el trabajo de revisión publicado sobre la fabricación del lisado realizado entre las dos asociaciones AABB (*American Association of Blood Banks*) e ISCT (*International Society of Cell Therapy*)²⁰, a pesar de que se recomienda como grupos de elección el grupo O para plaquetas y el AB para plasma para evitar interacciones de los antígenos y los anticuerpos con las células o con el paciente, demostraron que utilizar concentrados plaquetarios del grupo AB, no tenía efectos en la seguridad o en la funcionalidad de las células.

Según Burnouf⁵⁵ y colaboradores no se ha probado que los antígenos y anticuerpos AB afecten a la biología *in vitro* de las MSCs. Tan⁷³ y su grupo de investigación encontraron que las concentraciones de CD41 y CD61 en las membranas residuales de las plaquetas estaban en el rango de los picogramos, por lo que los antígenos plaquetarios no podrían afectar.

En el estudio de Moll⁷⁴ y su equipo, el grupo sanguíneo en la fabricación del lisado no afectó a la proliferación de las MSC. Demostraron que estas no expresan antígenos del grupo ABO ni ejercen ninguna regulación en su expresión. Y además comprobaron que sólo una incubación con plasma AB al 100%, producía la absorción de los antígenos AB por las hBM-MS.

Sólo 4 centros de los 14 encuestados durante el foro internacional de Vox Sanguinis⁴⁸ celebrado en el año 2017, tuvieron en cuenta como requisito el grupo sanguíneo durante la fabricación del lisado C (ver anexo 1).

En cuanto a la elección de grupos sanguíneos, el grupo de trabajo de la ISBT en Terapia Celular¹² celebrado en 2020, sólo recomendó medir la concentración de isoaglutininas en el lisado plaquetario por contener plasma, sobre todo en el cultivo de progenitores endoteliales que pueden expresar los antígenos del grupo ABO. El grupo de Oeller¹⁶ lo realizó así siguiendo estos criterios, considerando aceptable un título de isoaglutininas $\leq 1:256$.

5.1.2) Importancia del plasma y sus componentes en el producto.

En la literatura se encuentran diversos estudios para conocer el factor limitante en la proliferación celular, si es el componente plaquetario o el plasmático. Además, se ha analizado si el porcentaje de plasma influye en las duplicaciones celulares o si la conversión del plasma en suero es más beneficiosa para el cultivo.

Las diferencias en los distintos lisados plaquetarios según la forma de producción, los hace más específicos para un uso determinado. Así, el lisado obtenido de la lisis del pellet de plaquetas, que no contiene plasma, es útil por no tener trombina para la administración vía cerebral⁷⁵ o en la reparación de la córnea⁷⁶. Otro ejemplo sería el obtenido tras ciclos de congelación/descongelación, ya que en este caso es adecuado en el tratamiento de úlceras o quemados por contener trombina⁷⁷.

Pero hasta que no se conozcan bien los mecanismos de actuación de los factores de crecimiento sobre los distintos tipos celulares, no se puede llegar a una estandarización del lisado como señalan Astori⁷⁸. Son necesarios más estudios como propone Bieback⁷⁹, para ver si la composición y la concentración de los factores definen la calidad del hPL.

En el estudio de Oeller¹⁶ y colaboradores encontraron que, la inhibición de los factores plaquetarios PDGF-BB, bFGF y TGF- β redujo un 25% la proliferación de las células estromales. Aunque una mezcla de estos factores únicamente, no era suficiente para provocar la división celular. Por lo que era la mezcla compleja de los factores plaquetarios junto con las proteínas plasmáticas, los responsables de la proliferación.

El grupo de Muraglia⁸⁰ comparó dos medios, uno sin ningún componente plasmático (sólo plaquetas lisadas) y otro sin ningún componente plaquetario (sólo suero), y no obtuvo proliferación en cultivos de MSCs procedentes de lipoaspirado de médula ósea o de sangre de cordón, aunque se activó todo el ciclo celular de la proliferación, por lo tanto eran necesarios los componentes mitogénicos presentes en las plaquetas y en el plasma. De la misma forma, Horn⁸¹ y colaboradores, no obtuvieron proliferación celular en hBM-MSCs cuando sólo utilizaban lisado de plaquetas sin componente plasmático.

El equipo de Poloni⁸² en su estudio encontraron mayor número de duplicaciones para hBM-MSCs cuando las cultivaron con suero alogénico que con lisado (15 frente a 10 duplicaciones en 5 pases). Esto pudo deberse a que el lisado plaquetario lo obtuvieron a partir de un solo ciclo de congelación/descongelación, evitando con ello la completa liberación de los factores.

Por el contrario, el equipo de Rauch⁵³ obtuvo proliferación de células epiteliales renales y condrocitos utilizando lisados sin componentes plasmáticos.

En el estudio del grupo de Glovinski⁷⁰ compararon lisados con distintos porcentajes de plasma, y dónde se había sustituido la solución aditiva totalmente por el plasma, fue la más efectiva en la expansión celular. Teniendo peores crecimientos, el que no contenía nada de plasma. También demostró que el lisado que contenía mitad de plasma y mitad de solución aditiva, a pesar de presentar el menor tiempo de duplicación celular, producía agregados y las células perdían su adherencia al llegar a la confluencia. El equipo de Laitinen¹⁸ también obtuvo que el lisado con mayor porcentaje de plasma producía tiempos de duplicación menores para hBM- MSC.

En este estudio hemos comprobado que la proliferación de fibroblastos dérmicos y mesenquimales de cordón es superior al aumentar la concentración de plasma en nuestros productos tras comparar lisados con una concentración plasmática que procedía sólo de los concentrados versus lisados dónde a la concentración de partida se le añadía un 20% más respecto al volumen total.

5.1.3) Filtración, depleción y uso de heparina

Según el grupo del Instituto de Medicina Transfusional de Ulm⁵⁰, los coágulos presentes en el medio de cultivo no van a interferir en la expansión celular pero lo usual es eliminarlos, bien por depleción del fibrinógeno o con heparina. Aunque la depleción del fibrinógeno para evitar el uso de la heparina no es un procedimiento muy extendido entre los fabricantes⁵⁰, algunos realizan un lavado del pellet de plaquetas antes de su activación para bajar el contenido de fibrinógeno y resto de proteínas plasmáticas o recalifican el lisado para deplecionar el fibrinógeno. Otros utilizan la inactivación por calor para prevenir el coágulo.

El estudio de Copland⁸³ y colaboradores apoya la depleción del fibrinógeno al encontrar que los cultivos de MSCs con lisado dónde no se había eliminado la proteína, tenían menor capacidad inmunosupresora. Además, durante el proceso de coagulación para eliminar el fibrinógeno, el equipo de Muraglia⁸⁰ demostró que favorecía a las células que crecían en adhesión porque activa proteínas o factores que intervienen en ello.

En contraposición a la depleción de fibrinógeno para evitar los coágulos está el estudio de Mojica-Henshaw⁸⁴ y colaboradores, quienes emplearon la seroconversión al añadir cloruro de calcio. Aunque este paso no hizo que disminuyeran los factores de crecimiento de una forma significativa, esto tuvo un significado biológico, incrementando la proliferación de las MSCs.

Durante este trabajo de tesis nos decidimos por aplicar un proceso de filtración para retirar los coágulos presentes en los productos, ya que estudios previos realizados en nuestra unidad nos indicaban que la eliminación de proteínas hemostáticas y los métodos empleados para ello, podían tener un mayor impacto sobre la composición del producto final. A este respecto, durante el proceso de fabricación del LP1, se analizó si un paso de filtración final podría afectar a la calidad del producto. A pesar de no se obtener diferencias significativas en las tasas de proliferación de fibroblastos cultivados con lisado plaquetario filtrado o no filtrado, sí que obtuvimos un mayor número de células en cultivo con suplementos de la solución no filtrada.

Este hecho también fue analizado por el equipo Fekete³¹, quienes obtuvieron que la filtración no interfería en la capacidad de proliferación de las hBM-MSK.

En cuanto al uso de la **heparina** para eliminar los coágulos, el grupo de Burnouf⁵⁵ recomendó de 0,6 a 2 UI/mL de heparina, ya que valores superiores afectarían negativamente a la proliferación.

Que la heparina afecte a la expansión celular lo han mostrado estudios como el del equipo de Bianchetti⁶³, quienes tras reducir la concentración de fibrinógeno mediante la crioprecipitación del plasma añadido para la fabricación del lisado, necesitaron menor concentración de heparina, de 2 UI/mL se pasó a 0,6 UI/mL en el medio de cultivo, lo cual reflejó una disminución del DT (80h vs 67h).

Otro trabajo que confirmó este hecho es el de Hameda⁸⁵ y colaboradores, quienes mostraron que aumentando la concentración de heparina (por encima de 0,6 U/mL) disminuía la proliferación de hBM-MSK y hAT-MSK, además de la capacidad de diferenciación a adipocitos y osteocitos. Esto lo justifica por la presencia de alcohol bencílico (excipiente de la heparina), que a alta concentración dificulta la expansión, y por la misma heparina que se une a los factores de crecimiento.

El grupo de Laner-Plamberger⁸⁶ realizó un estudio dónde investigaron la influencia de la heparina en hBM-MSK, hAT-MSK y hUC-MSK, en la expresión genética, las proteínas y su funcionalidad. Encontraron una variabilidad en la concentración de heparina que entraba en las células. Dependiendo del origen celular (fue mayor para hBM-MSK y hUC-MSK) encontraron que la heparina influía en la regulación de grupos de genes involucrados en la proliferación, adhesión celular, apoptosis, angiogénesis e inflamación. Sorprendentemente, a pesar de estos efectos la heparina (para concentraciones entre 2 y 4 UI/mL) no tuvo una influencia significativa en cultivos de larga duración, en la proliferación o en la capacidad de diferenciación, pudiendo ser porque la alta concentración de factores en el lisado superaba el efecto de la heparina.

En el grupo de trabajo de Terapias Celular de la ISBT¹² recomiendan que sólo cuando las células se vean afectadas por el uso de la heparina, se realice la seroconversión del lisado por coagulación.

Otro inconveniente de la heparina es ser un componente de origen animal (porcino) aunque ha sido utilizado en la práctica clínica durante décadas⁸⁶. La heparina sintética⁸⁷, no ha sido probada en el lisado plaquetario⁸⁶ y tampoco existe en el mercado heparina sintetizada a partir de células humanas y utilizando genes también humanos, el trabajo de Lord⁸⁸ ha sido el primero en intentarlo.

En nuestro caso, hemos empleado una concentración de heparina en el medio de cultivo de 2 UI/mL basándonos en la bibliografía, no teniendo consecuencias sobre la proliferación celular.

5.1.4) Ciclos de congelación y temperaturas aplicadas.

En la literatura se encuentran muchos intentos de definir un número de ciclos óptimo durante el proceso de lisis celular. El equipo de Fekete³¹ comparó un ciclo con dos ciclos de congelación y no encontró diferencias significativas en la proliferación de hBM-MSK. El grupo de Bianchetti⁶³, en su estudio encontraron que pasar de uno a cuatro ciclos produjo un aumento en la liberación por los gránulos α de las plaquetas. Esto se tradujo en una disminución del DT en la expansión

de MSC ($p < 0,001$). Se compararon los dos lisados con un análisis proteómico y se vio que ambos compartían el 86% del total de las proteínas, y que tres de las proteínas exclusivas del lisado de cuatro ciclos correspondían a factores de crecimiento. Además, la distinta variabilidad en las proteínas encontradas entre los lisados de un ciclo ($>20\%$) y entre los de cuatro ciclos ($<20\%$) se relacionó con el mayor coeficiente de variación en el DT, entre los lisados de un ciclo que entre los de cuatro (5,39% vs 2,74%). La identificación de estas proteínas ayudaría a entender el mecanismo de la proliferación celular.

Otros han verificado que aumentar la cantidad de ciclos puede degradar los factores de crecimiento, como el estudio de Laitinen¹⁸ y colaboradores, que obtuvieron tiempos de duplicación para hBM-MSC, menores para los lisados de dos ciclos con respecto a los de cinco. Un número de 5 ciclos también puede inactivar otros componentes del lisado.

El grupo de Strandberg¹³ estudió como variaban las concentraciones de determinados factores plaquetarios según el número de ciclos aplicados (1, 3, 5, 10 y 30). Se observó un patrón de concentración diferente durante el aumento del número de ciclos, no afectando por igual a los distintos factores. Así, para los factores EGF y PDGF-AB/BB había poca variación a partir del 5º ciclo, para el factor PF-4 se duplicaba desde el ciclo 3 al 30 y para los factores TGF- β 1 y FGF-2 alcanzaban un pico entre los ciclos 3-5, descendiendo sus concentraciones a partir de ahí. El factor VEGF permaneció constante para todos los ciclos. Otro factor importante era el origen de los factores. Finalmente se llegó a la conclusión de que el número de ciclos óptimos estaba entre 3 y 5.

Además del número de ciclos, las temperaturas en los que se da la congelación/descongelación pueden influir en la cantidad de factores liberados. Mojica-Henshaw⁸⁴ y colaboradores compararon la concentración de varios factores de crecimiento entre lisados fabricados aplicando ciclos de congelación y descongelación, para valores de temperaturas de (-196°C/4°C), (-196°C/37°C), (-80°C/4°C) y (-80°C/37°C), obteniendo la mayor concentración para los valores (-196°C/4°C).

Según la encuesta realizada por la ISBT⁴⁸, los ciclos de congelación/descongelación han sido más utilizados que el método de liberación de factores plaquetarios por activación con trombina o calcio (a este tipo de lisado también se le conoce como re-lisado) entre los fabricantes de lisado plaquetario. En todos los centros utilizaron para la lisis los ciclos de congelación/descongelación y en dos de ellos emplean también la activación con cloruro de calcio (ver anexo 2).

En nuestro estudio, los resultados que se obtuvieron de pasar de 2 a 3 ciclos de congelación/descongelación no supusieron una diferencia significativa en la proliferación, facilitando con ello la logística de fabricación durante los productos.

Algunos estudios de comparación mostraron, por ejemplo el realizado en el Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck⁴⁸ (Austria), que no existían diferencias en la proliferación celular entre el lisado y el re-lisado. La ventaja del re-lisado para ellos está en no tener que usar heparina en el cultivo, y en el método físico, que no hay que añadir ningún componente químico para la activación.

El grupo de Astori⁷⁸ obtuvo tiempos de duplicación para hBM-MSC dos veces mayor cuando fueron cultivadas con lisados activados con cloruro de calcio en lugar de con lisados obtenidos tras ciclos de congelación/descongelación. Al contrario de lo observado por Bieback¹⁷ y colaboradores sobre la proliferación de hBM-MSC. En otro estudio, el grupo de Bieback⁷⁹ mostró que existían diferencias en la presencia de factores de crecimiento plaquetarios al comparar el

lisado con el re-lisado, en donde sólo estaban los liberados por la activación de las plaquetas, recomendando con ello el uso del lisado por ser más fácil su producción, menos costoso y no tener los activadores de las plaquetas, que pueden afectar a la proliferación.

5.1.5) El % de lisado como suplemento de los cultivos

El **porcentaje de lisado**, aunque no es una característica del lisado, afecta a las tasas de proliferación. En la literatura se encuentran porcentajes entre 1-60%, aunque los más frecuentes están entre 5-10% según el trabajo publicado por la AABB y la ISCT²⁰, aunque esto también va a depender de la concentración de plaquetas de las que se parta. Burnouf⁵⁵ y colaboradores también recomendaron la utilización de lisado a concentraciones del 5 -10%. El grupo de Rauch⁵³ comparó porcentajes del 1%, 5% y 10% y obtuvo para el de 5% la proliferación más óptima. También, el equipo de Griffiths⁸⁹ encontró valores menores en los DT con porcentajes bajos (2-5%) frente al 10% de hPL o al 16% de FBS para el cultivo de hBM-MSC. Otro estudio que apoyó el uso de porcentajes bajos fue el de Fekete³¹ y colaboradores, quienes comparando porcentajes entre 0% y 20%, obtuvieron el máximo crecimiento para las MSCs con una concentración de lisado al 10%. Contrariamente, Cholewa⁹⁰ y su equipo obtuvieron una correlación entre el porcentaje de lisado y la proliferación (aumento desde el 1% al 20%), observando una respuesta dosis dependiente en hAT-MSC.

En nuestro estudio se compararon diferentes porcentajes (5%, 10 y 15%) en el cultivo de fibroblastos, observando una correlación entre el porcentaje empleado y las tasas de duplicación. Sin embargo, también observamos que, a mayor concentración empleada, la aparición de agregados era también mayor. Finalmente decidimos emplear un 5% de lisado para evitar la agregación celular y reducir los costes durante la expansión celular, ya que el uso de estos suplementos se incrementa cuando se cultivan células a gran escala.

5.1.6) Aumentar el número de donaciones con la inactivación

En el foro internacional de Vox Sanguinis⁴⁸, el **número de concentrados de plaquetas** variaron entre 4 y 125 unidades en la fabricación de los lisados de los centros encuestados. En la decisión sobre el número mínimo a usar influyen distintos aspectos como puede ser el volumen de lisado necesario, la variabilidad en su composición o el riesgo de contaminantes.

Burnouf⁵⁵ y colaboradores, en su revisión sobre el lisado como suplemento en el cultivo celular, sugirieron que hasta 50 donaciones eran necesarias para obtener un volumen suficiente para la expansión celular de uso clínico.

El grupo de Laitinen¹⁸ obtuvo para lisados fabricado a partir de 8 donaciones, duplicaciones entre 3,0 y 5,88 frente a duplicaciones entre 3,32 y 4,32 para lisados fabricados a partir de 52 donaciones. Por lo tanto, el rango disminuyó por una mayor homogeneidad en la composición. El equipo de Bianchetti⁶³, sólo necesitó 25 donantes para reducir la variabilidad en la fabricación de su lisado (un mayor número no mejoraba el tiempo de duplicación). El estudio del grupo de Agostini⁹¹, demostró que un mínimo de 16 donaciones reducía a un nivel óptimo esta variabilidad y que utilizar más de 16 donaciones en la fabricación del lisado, no mejoraba

significativamente la composición en los factores de crecimiento. Finalmente, el grupo de trabajo de Terapia Celular de la ISBT¹² sugirió un número de donaciones entre 10 y 16 para conseguir una homogeneidad en el lisado.

La desventaja de mezclar los concentrados es que aumenta el riesgo de transmisión de patógenos, por ello la Farmacopea Europea en su capítulo 5.2.12, recomienda reducir el número de donaciones si no hay inactivación, aunque no especifica el número limitante. En el trabajo de revisión sobre la fabricación del lisado realizado entre las dos asociaciones AABB e ISCT²⁰ se aconseja limitar las donaciones a un número de 16 si no se va a inactivar.

La inactivación de nuestro lisado plaquetario nos permitió utilizar un número de donaciones en torno a 50 sin alterar significativamente la calidad de nuestros productos. Si se comparan las desviaciones en los distintos parámetros analizados para los lisados plaquetarios LP2i y LP2, no hubo diferencias entre los lotes fabricados dentro de cada grupo, indicando que 14-16 donaciones (número de donaciones empleadas para fabricar el LP2) ya se había alcanzado la homogeneidad que se busca.

5.1.7) pH, plaquetas, leucocitos y otras determinaciones bioquímicas en las soluciones.

Según la normativa y la experiencia de los fabricantes en lisado plaquetario, es necesario establecer controles para la caracterización y estandarización de los productos.

Los resultados obtenidos de pH para las soluciones LP1, LP2 y LP2i, estuvieron en el rango de 7,0 a 8,0. La diferencia que se observó entre ellos estaba dentro de la variabilidad del pH-metro. Como se observa en la tabla 20, el rango para otros fabricantes fue similar. El grupo de Ruane²² halló en su investigación sobre concentrados de plaquetas irradiadas con Mirasol, cambios en el pH aunque nunca estuvieron por debajo de 7, debido a aumento de la glucólisis por la activación plaquetaria.

Por otro lado, se hicieron medidas en los LP2 y LP2i de la concentración de plaquetas y leucocitos y los resultados para las plaquetas estuvieron dentro de la imprecisión de la técnica y para los leucocitos por debajo de la sensibilidad del método. Por lo que se confirmó la eficacia de la lisis y la leucodepleción.

El que se parta de concentrados de plaquetas dónde no se ha realizado una **leucodepleción** puede afectar la calidad del lisado. Algunos autores son partidarios de la presencia de leucocitos por el aumento de la concentración de factores crecimiento, como confirma el estudio de Castillo⁹² y colaboradores, debido a la liberación por los propios leucocitos o porque éstos estimulan su liberación en las plaquetas. También, Zimmermann⁹³ y colaboradores explicaron la variabilidad entre la mitad y la tercera parte en la concentración de los factores por la concentración de los leucocitos.

Aunque si hay leucodepleción se evita los problemas proinflamatorios de las proteasas e hidrolasas ácidas contenidas en los leucocitos⁹² y se reduce el riesgo de contaminación priónica, algunos fabricantes establecen como criterio de calidad un umbral mínimo de leucocitos como el grupo de Dessels⁶⁹. Para ellos, la concentración de leucocitos debe ser menor 1×10^6 en los concentrados de plaquetas para producir el lisado. En nuestro caso, partimos de concentrados

de plaquetas con los criterios de calidad del Centro de Transfusión que es $< 1 \times 10^6$ /Unidad (90% de las Unidades).

Otro factor al que ponen límite algunos fabricantes de lisado es la **hemoglobina**⁴⁸. La Unidad del Banco de Sangre del Hospital Landspítali en Reikiavik y la Unidad de Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah, EEUU lo tienen establecido en $< 20 \text{mg/dL}$. O para el Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria, que ponen límite a la concentración de **eritrocitos**⁴⁸ (3000×10^6 por unidad). Aunque no se conoce el efecto que tienen en los cultivos, nosotros lo hemos establecido para nuestros productos en los rangos establecidos para la obtención del plasma (glóbulos rojos $< 6 \times 10^9$ /L).

Otros centros fabricantes, completan la caracterización del lisado con la determinación de parámetros bioquímicos que pueden afectar al medio de cultivo celular. El grupo de Schallmoser⁹ mide pH, osmolaridad, colesterol, electrolitos, glucosa. Y parámetros en los que encuentran una gran variabilidad como el fibrinógeno y los triglicéridos, aunque esta variabilidad no está relacionada con la funcionalidad del lisado en la expansión celular, por lo que su determinación no es esencial. Delorme⁹ de Macopharma, analiza los parámetros de pH, osmolaridad y lípidos como controles del lisado plaquetario. En el centro de Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah⁵⁰, EEUU, además del pH y la osmolaridad, determinan el Na, K, Cl, CO₂, gap aniónico, urea, creatinina, glucosa, fosfatasa alcalina, aspartato amino transferasa, alanina amino transferasa, Ca, y bilirrubina. Y el equipo de Bianchetti⁶³ analiza el pH, los electrolitos, el fosfato, la vitamina B12 y la glucosa.

En el anexo 3 pueden consultarse los valores de referencia para distintos parámetros bioquímicos que caracterizan los lisados de diversos centros fabricantes según la encuesta de la ISBT⁴⁸.

5.1.8) Proteínas y factores de crecimiento.

El grupo de trabajo de Terapia Celular de la ISBT¹² ha recomendado un rango de concentraciones en función de la concentración de plasma con la que se obtiene el lisado. Así para aquellos con un 100% de plasma, los valores fueron, **Pt** (6,5 – 8,5 g/dL); **Alb** (35 – 55 g/L); **IgG** (8 – 12 g/L). Cuando se obtienen por activación con formación de coágulo, las concentraciones disminuyen por no ser tan efectiva la lisis o porque queden atrapadas en el coágulo, éstas son las siguientes: Pt (6,0 -8,0 g/dL), Alb (35 – 40 g/L), IgG (8 – 12 g/L).

El grupo de Shih¹⁹ ha establecido en el rango para Pt entre 4- 6 g/dl. El equipo de Fekete³¹ obtuvo para sus lisados fabricados a partir de *buffy coat* y filtrados, un rango de Pt de $2,6 \pm 0,5 \text{ g/dL}$. Este resultado es similar al obtenido para nuestros lisados para LP1, LP2 y LP2i ($2,50 \pm 0,04 \text{g/dL}$; $2,77 \pm 0,04 \text{g/dL}$ y $2,50 \pm 0,04 \text{g/dL}$, respectivamente), donde la concentración de plasma estuvo en el rango entre 40% y 60%.

Para los valores de IgG, el grupo de Delila⁹⁴ obtuvo valores de $11,54 \pm 4,11 \text{g/L}$ (lisado obtenido de ciclos de congelación/descongelación), de $9,20 \pm 5,17 \text{g/L}$ (lisado obtenido por activación con cloruro cálcico) y de $8,09 \pm 1,98 \text{g/L}$ (lisado obtenido a partir de la lisis del pellet de plaquetas sin plasma). Según Astori⁷⁸, los valores de IgG deben estar definidos en los lisados porque pueden presentar un riesgo para el paciente al que se trate con las células cultivadas con dichos productos, al aumentar el riesgo de presencia de inmunoglobulinas alogénicas. Nuestros valores de IgG fueron bajos para LP1, LP2 y LP2i ($3,30 \pm 0,16 \text{g/L}$; $3,92 \pm 0,11 \text{g/L}$ y $3,42 \pm 0,06 \text{g/L}$, respectivamente).

El **factor plaquetario** medido en nuestros lisados ha sido el **PDGF-AB** como representativo de la lisis plaquetaria y necesario para la proliferación celular. Como afirmó el equipo de Doucet⁹⁵, los factores plaquetarios PDGF-AB, TGF- β 1 y bFGF juegan un papel importante en la proliferación de las MSC.

Otro estudio el de Fekete³¹ y colaboradores, obtuvo que los factores que más influyen en la proliferación de las hBM-MSC son el PDGF-BB, el bFGF y el TGF- β 1, aunque una combinación de ellos únicamente no era suficiente. Este estudio propone la necesidad de un cierto umbral de citoquinas y factores de crecimiento para que haya proliferación celular.

El equipo de Lang⁹⁶ encontró relación entre la proliferación de hAT-MSC y los receptores B del PDGF. Comparando cultivos con el 20% de PRP y 20% de FBS, al añadir el inhibidor del receptor B del PDGF, la proliferación con el PRP bajaba en gran medida, mientras que con FBS permanecía similar. Horn⁸¹ y colaboradores, también encontraron correlación entre la concentración de PDGF-AB y la proliferación celular. Según el trabajo del equipo de Bieback²⁰ medir los factores de la familia PDGF puede ser un buen indicador de proliferación celular.

En nuestro estudio hemos obtenido una correlación entre la concentración de PDGF-AB y la proliferación celular, tanto de MSC como de fibroblastos, al comparar el cociente DT FBS/ DT hPL vs concentración PDGF-AB. Concretamente se han obtenido coeficientes de correlación $r=0,64$ para fibroblastos y $r=0,80$ para MSC, indicando que al aumentar el valor del PDGF-AB, disminuía el DT del hPL con respecto al DT del FBS.

En cuanto a la concentración medida de los factores plaquetarios, la revisión bibliográfica del equipo de Guiotto⁹⁷, obtuvo valores del PDFG-AB de 0,01ng/mL; 99,06ng/mL, para el FBS y el hPL respectivamente. Además, analizaron las concentraciones de tres investigaciones^{95, 98, 99} dónde se relacionan la variabilidad de los factores plaquetarios entre el FBS y el hPL con la mayor proliferación de las MSC cultivadas con hPL. Nuestros resultados de PDGF-AB fueron inferiores pero similares a los obtenidos por el equipo el Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga, Alemania⁴⁸. En nuestro estudio hemos encontrado una diferencia significativa entre el LP2 ($33,29\pm 2,04$ ng/mL) y el LP1 ($17,74\pm 2,08$ ng/mL) ($p<0,001$), lo cual fue debido a las pérdidas en el sobrenadante ocasionadas durante la centrifugación de las plaquetas durante la fabricación de LP1 como paso inicial antes de los ciclos de congelación/descongelación.

El anexo 4 resume los valores establecidos para las proteínas y los factores de crecimiento medidos por distintos centros fabricantes de lisado recogidos en la encuesta realizada por la ISBT⁴⁸.

En el análisis de cómo influye el tratamiento de reducción de patógenos en las proteínas y factores plaquetarios, hemos encontrado investigaciones como la del equipo de Prowse¹⁰⁰ con cambios en el transcriptoma de las plaquetas tratadas con UV y amotosalen. O la investigación de Osman¹⁰¹ y su grupo que, tras comparar plaquetas de aféresis tratadas con amotosalen/UV o riboflavina/UV observaron una disminución en el ARN mensajero y en micro ARN en las inactivadas con amotosalen, mientras que con riboflavina/UV no se produjo. Prudent¹⁰² y sus colaboradores también analizaron el proteoma de plaquetas inactivadas con amotosalen/UV A, riboflavina/UV B y UV C, observando alteración en 58, 67 y 48 proteínas respectivamente.

En nuestro estudio hemos encontrado cambios significativos en la concentración de Albúmina al comparar el lisado sin inactivar (LP2) con el inactivado (LP2i) ($15,10\pm 0,19$ g/dL, $n=17$ y $11,88\pm 0,28$ g/dL, $n=6$, respectivamente) pudiendo deberse al efecto del tratamiento, aunque es necesario aumentar el tamaño muestral para tener más certeza.

Entre los estudios que se han realizado para analizar las proteínas plasmáticas relacionadas con la **hemostasia**, encontramos el del grupo de Smith²⁶. En este estudio fueron analizados 20 plasmas tratados con el sistema Mirasol (riboflavina/UV). Obtuvieron que el factor VIIIc, que es una de las proteínas más lábiles, se mantuvo en un 75% con respecto al plasma control. El factor XI fue el más sensible al tratamiento manteniéndose en un 67% de su actividad. La actividad del fibrinógeno se vio más afectada que su concentración como antígeno, conservándose en un 77%. Entre los inhibidores de la coagulación la más sensible fue la proteína C que retuvo su actividad en un 81%. Estos efectos de la aplicación de riboflavina y luz UV como método de inactivación de patógenos puede explicar la menor presencia de coágulos observadas en nuestras soluciones inactivadas (LP2i).

En cuanto a los cambios en los factores de crecimiento por la inactivación, los grupos de Viau¹⁰³ y Iudicone¹⁰⁴ han observado una disminución en el TGF- β 1 tras el tratamiento con UV C, y ninguna variación significativa con el tratamiento de amotosalen/UV A.

Las diferencias de PDGF-AB para los lisados sin tratar (LP2) y tratados (LP2i) han sido significativas ($33,29 \pm 2,04$ ng/mL; n=18 y $22,63 \pm 3,09$ ng/mL; n=5, respectivamente) ($p < 0,05$), pudiendo ser debidas al tratamiento con UV/riboflavina.

5.1.9) Análisis funcionales del lisado: test de potencia.

Los lisados utilizados para suplementar los medios de cultivo deben mantener las propiedades físicas, morfológicas, fenotípicas y funcionales¹⁰⁵ propias de las células sembradas.

El anexo 5 resumen los ensayos que han decidido como fundamentales diversos centros fabricantes según una encuesta realizada por la ISBT⁵⁰ o los que realizan distintas casas comerciales en sus certificados de análisis de lote.

En la fabricación de nuestros lisados plaquetarios se estableció como test de potencia de nuestros productos la actividad celular en cultivo. Para ello, se tomó como criterio de aceptación para la liberación de producto un número de duplicaciones (DT) ≥ 1 tras mantener las células en cultivo 3 o 5 días (dependiendo del tipo de lisado) con 5% de HPL frente a la solución control (10 o 15% en función del tipo celular).

Para el test de actividad en fibroblastos, los resultados que obtuvimos fueron: LP1 vs FBS (2,48 vs 2,13 días), LP2 vs FBS (1,21 vs 2,12 días) y LP2i vs FBS (1,09 vs 1,50 días). Todos nuestros cultivos tuvieron tiempos de duplicación inferiores a la solución control, aunque las diferencias no fueron significativas entre el LP1 y el FBS.

Para el test de actividad en hU-MS-C, los DT fueron: LP1 vs FBS (1,03 vs 0,97 días), LP2 vs FBS (1,10 vs 1,08 días) y LP2i vs FBS (1,04 vs 1,03 días), no observando diferencias significativas entre los lisados y los controles. Las investigaciones encontradas en la literatura muestran diferencias a favor del lisado, aunque comparan con FBS a menor concentración (10%).

En el estudio publicado por Carrancio¹⁰⁶, obtuvieron menores tiempos de duplicación entre P0 y P1 al cultivar hBM-MS-C con 5% de hPL y compararlos con la solución control (10% FBS) (6,5 y 7,5 días respectivamente).

Otro ejemplo fue el trabajo de Dessels⁶⁹ y colaboradores, que obtuvieron mayor proliferación tras cultivar hAT-MSC con lisado plaquetario frente al FBS. Además, no observaron diferencias entre emplear concentrados de plaquetas frescas o caducadas.

En la revisión de Guiotto⁹⁷ de 2019, 47 artículos de 56 seleccionados, señalaron mayor tasas de proliferación para MSCs cultivadas con hPL frente a FBS (sin hacer distinción en el origen o en la fabricación del hPL), y en el resto no mencionan diferencias. En la misma línea, otros estudios demuestran las mismas tendencias en las tasas de duplicación en células cultivadas con hPL^{89 78 90}.

En cuanto a cómo ha afectado la inactivación del lisado sobre las tasas de proliferación, no hemos obtenido diferencias significativas entre los lisados LP2 y LP2i en el cultivo de MSC. Los fibroblastos tuvieron menores DT con los lisados al compararlas con el FBS, con diferencias significativas para el LP2 ($p < 0,001$) y para el LP2i ($p < 0,05$). Varios estudios han sido realizados al respecto (ver anexo 6).

Como se observa en la tabla 23, tres estudios mostraron una proliferación aumentada y uno de ellos, el de Fazzina¹⁰⁷ y colaboradores para líneas celulares leucemogénicas (JURKAT) o de cáncer de mama humano (MCF-7), la proliferación disminuyó respecto al control. No observaron diferencias significativas en las tasas de proliferación en 5 de las publicaciones.

Otro factor que también se ha analizado en la literatura, es si existen diferencias cuando la **inactivación** se realiza **después de la lisis** de las plaquetas. En el trabajo de Christensen¹⁰⁸ y su equipo, se encontraron diferencias entre lisados producidos con concentrados de plaquetas inactivados y lisados producidos con plaquetas lisadas y después inactivadas. La inactivación se realizó con amotosalen/UV. Se obtuvieron descensos en los factores de crecimiento lo cual pudo ser debido a la fotodegradación de los factores después de la lisis al exponerse a la luz UV. Consecuentemente, esto afectó a la tasa de proliferación, pero no a la capacidad de diferenciación celular.

5.1.10) Morfología celular, capacidad inmunomoduladora y capacidad de diferenciación en las MSCs.

En cuanto a la **morfología** hemos encontrado células de menor tamaño y más alargadas, al sembrarse con lisado tanto para mesenquimales como con fibroblastos. Y cuando el porcentaje de lisado era alto (15%) se favorecía la formación de agregados.

El equipo de Carrancio¹⁰⁶ también describieron la morfología de las MSC con hPL más pequeña que con FBS y encontraron mayor tendencia a la formación de clusters.

En la revisión de Guiotto⁹⁷ de 2019, comparando cultivos de MSC con hPL o con FBS, de los 56 artículos seleccionados, en 25 artículos hallaron que las células eran más alargadas y pequeñas con el lisado.

Aunque no se han presentado resultados de cómo afecta el lisado a la capacidad de las MSC de **inhibir la respuesta inmunitaria** (inhibir a los linfocitos T y modular la proliferación y diferenciación de los B), es un aspecto necesario en la caracterización de estos productos. En la literatura se encuentran resultados contradictorios, por ejemplo, el grupo de Flemming¹⁰⁹ no encontró diferencias entre hPL y FBS, para un estudio de cultivo de hBM-MSC (n=5). Tampoco

encontraron diferencias significativas en la inmunosupresión el grupo de Laitinen¹⁸ en su análisis de 15 muestras de hBM-MSC cultivadas con hPL y con FBS. Y en la revisión de 38 artículos de Burnouf⁵⁵ y colaboradores, encontraron que la capacidad inmunosupresora de las MSC cultivadas con hPL no se modificaba.

Abdelrazik¹¹⁰ y su grupo obtuvieron que hBM-MSC cultivadas en 10% de FBS tienen mayor capacidad de inmunosupresión, siendo necesaria incrementar la cantidad de MSC cultivadas en hPL al 10% para alcanzar el mismo efecto. El equipo de Bernardo¹¹¹ también demostró en su estudio con hBM-MSC una inmunosupresión ligeramente mayor en células las cultivadas con FBS frente al hPL. Contrariamente, Oikonomopoulos¹¹² estudió el efecto en hBM-MSC y hAT- MSC observando mayor actividad inmunosupresora de las MSCs cultivadas con 10% de hPL frente a las cultivadas con 10% de FBS. Castegnaro¹¹³ y colaboradores observaron el mismo efecto en hAT- MSCs. Otros estudios se han llevado a cabo con lisados inactivados (ver anexo 7).

Como se observa en la tabla 24, 3 de los estudios analizados no mostraron diferencias significativas en la capacidad inmunosupresora al comparar los cultivos de MSC con lisado inactivado frente al sin inactivar o al FBS. En el estudio de Jonsdottir-Buch⁷² la capacidad de las MSC cultivadas con el lisado inactivado aumentó, la inactivación actúa sobre los pocos leucocitos presentes en los concentrados de plaquetas leucodeplecionadas, y se disminuye la producción de citoquinas inflamatorias, no interfiriendo el lisado en la inmunosupresión de las células.

Otra característica analizada por algunos fabricantes del lisado ha sido la **capacidad de diferenciación** de las MSC. En 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica (ISCT) a través de su Comité de tejidos y MSC, propuso tres criterios mínimos que definían a las MSC: adherencia al plástico, expresión de antígenos de superficie específicos y capacidad de diferenciación multipotente¹¹⁴. Al menos se deben diferenciar a las tres líneas celulares: osteoblastos, adipocitos y condrocitos^{115,116}.

En la revisión del grupo de Guiotto⁹⁷, de los 54 artículos revisados, en 32 de ellos la capacidad de diferenciación a osteoblastos, condrocitos o adipocitos fue similar entre el hPL y el FBS, mientras que en el resto de los ensayos mostraron una gran variabilidad de resultados. Burnouf⁵⁵ y colaboradores en un análisis de 38 artículos encontraron que la capacidad de diferenciación de las MSC cultivadas con hPL no se vio afectada.

Grupos de investigación que hallaron similar capacidad de diferenciación entre cultivos con hPL o con FBS fueron el de Carrancio¹⁰⁶ (hBM-MSC; con 5% PL o 10% de FBS; n=11). En el estudio de Laitinen¹⁸ también confirmó la diferenciación a las tres líneas con hBM-MSC (n=15) cultivadas con hPL. El estudio del equipo de Juhl¹¹⁷ obtuvo para tres hPL comerciales, la capacidad de diferenciación de hBM-MSC y hAT- MSC, no se veía afectada.

El grupo de Mojica-Henshaw⁸⁴ encontró la misma capacidad de diferenciación para MSC cultivadas en 10% hPL (n=3) que en 10% FBS, aunque el porcentaje de células conteniendo gotas de grasa fue mayor para el hPL (61% vs 22%).

Mientras que Boraldi¹¹⁸ y colaboradores encontraron diferencias en la mineralización de la matriz extracelular de las hBM-MSC en su diferenciación a osteoblastos, al comparar 4 hPL comerciales con FBS (dos de ellos experimentaron similar diferenciación y con los otros dos fue menor), indicando la importancia de la caracterización físico-química de los lisados.

Uno de los lisados producidos por el grupo de Manfredini¹¹⁹ no fue capaz de diferenciar a condrocitos las hBM-MSC, si no se partía de un determinado número de células, y lo

relacionaron con la composición del lisado en factores anticondrogénicos (VEGF y EGF), y el tiempo de duración del cultivo con el lisado.

Otro estudio que ha analizado los factores de los medios de cultivo, ha sido el de Gong¹²⁰ y colaboradores dónde vieron el efecto de 6 medios de cultivo en la diferenciación de las hBM-MSCs a células del músculo liso.

Encontramos varios trabajos que analizan como la inactivación puede afectar a la capacidad de diferenciación de células mesenquimales. En 7 de los estudios analizados, el proceso de inactivación del lisado no afectó la capacidad de diferenciación de hBM-MSCs ni de hAT-MSCs, al compararla con el lisado sin inactivar o el FBS. Por otro lado, el estudio de Jonsdottir-Buch⁷² demostró como el uso de lisado plaquetario inactivado afectó a la capacidad de diferenciación de MSCs (condrogénesis y la osteogénesis) (ver anexo 8).

En colaboración con otras unidades se están realizando estudios para ver si el uso de nuestras soluciones (LP1, LP2 y LP2i) afecta a la capacidad inmunomoduladora en hUC-MSCs, a la inmunogenicidad y si se ve alterada la capacidad de diferenciación a condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Estos resultados están en vías de publicación.

5.1.11) Ensayos de seguridad: fenotipo y cariotipo celular.

Otro de los controles de calidad establecidos durante la liberación de medicamentos empleados en terapia celular es el análisis del fenotipo celular tras el cultivo. El fenotipo celular para MSCs ha sido definido por la Sociedad Internacional de Terapia Celular y Génica (ISCT) a través de su Comité de tejidos y MSC. Estas debían ser positivas para los antígenos no específicos CD105, CD73 y CD90 y negativas para los marcadores hematopoyéticos CD45, CD34, CD14 o CD11B, CD79 α o CD19 y HLA-DR^{114,121}.

Diversos estudios se han realizado al respecto. En el estudio de Carrancio¹⁰⁶ no encontraron diferencias en la expresión de los marcadores en hBM-MSCs cultivadas con 10% de FBS o 5% de hPL. Encontraron positividad para los marcadores CD73, CD90, CD105, CD106 y CD166 y negativos los CD14, CD19, CD34, CD45 Y HLA-DR. El grupo de Mojica⁸⁴ obtuvo el mismo fenotipo (positividad para CD73, CD90 y CD105 y negativos para CD34, CD45 y HLA-DR) para MSC cultivadas con 10% FBS y con 10% lisado. En la misma línea, Juhl¹¹⁷ y colaboradores evaluaron tres hPL comerciales y vieron que no afectaban al inmunofenotipo de hBM-MSCs y hAT-MSCs.

Cabe destacar que el grupo de Laitinen¹⁸ encontró diferencias para el HLA-DR que fue positivo con el hPL y negativo con el FBS, hallando una discrepancia con los criterios dados por la ISCT como caracterización de las mesenquimales. Otros autores también encontraron positividad para el HLA-DR al cultivar las MSC con hPL, como Fekete¹²² o Tarte¹²³.

Grau-Vorster¹²⁴ y colaboradores realizaron un estudio de MSC cultivadas con suero humano y con hPL y obtuvieron un porcentaje de MSC HLA-DR positivas que no se correlacionó con el medio de cultivo utilizado. Esto les llevó a afirmar que este marcador debería ser más un criterio informativo que uno específico de las mesenquimales por no modificar su funcionalidad (capacidad inmunosupresora o diferenciación). Es necesaria más investigación para entender si la positividad de este marcador podría afectar a determinados usos clínicos de las MSC.

En la revisión de Guiotto⁹⁷, de los 56 artículos revisados, 44 mencionaron similar positividad para los marcadores CD73, CD90 y CD105 de las MSC en el hPL como en el FBS, en 6 artículos hallaron señal débil o ausencia de estos marcadores para el hPL y en los otros 6 no lo mencionaron. Otras investigaciones al respecto se han llevado a cabo (ver anexo 9).

De los 9 estudios analizados no se encontraron diferencias significativas en el inmunofenotipo tanto de hBM-MSc o de hAT-MSc o de líneas celulares tumorales epiteliales y hematológicas, al cultivarlas con lisado plaquetario inactivado frente al lisado sin inactivar o al FBS.

En colaboración con otros grupos investigadores, se ha analizado el fenotipo de hUC-MSCs cultivadas con nuestras soluciones (LP1, LP2 y LP2i), no viéndose alteración alguna (resultados pendientes de publicación). Los fibroblastos dérmicos tampoco alteraron su fenotipo cuando se cultivaron con las soluciones LP1 y LP2⁵⁴.

Otro control necesario que se puede establecer tras el cultivo de células destinadas al uso clínico es verificar si los suplementos empleados en el medio de cultivo provocan aberraciones cromosómicas en las células cultivadas a largo de los pases.

Burnouf⁵⁵ y colaboradores tras una revisión amplia de artículos no encontraron alteraciones cromosómicas tras el cultivo de células empleando suplementos de hPL. Los mismos resultados fueron observados en el trabajo de Juhl¹¹⁷ y colaboradores, quienes demostraron que el cariotipo de hBM-MSc y hAT-MSc no se veía alterado con tres hPL comerciales diferentes. El grupo de Crespo-Diaz¹²⁵ tampoco encontró alteraciones cromosómicas en el cariotipo de hBM-MSCs y hAT-MSCs cultivadas con lisado plaquetario hasta un pase 12. Este dato también fue demostrado por el grupo de Muraglia⁸⁰. Sin embargo, otros estudios han demostrado alteraciones del cariotipo tras cultivar las células con FBS pero no con hPL^{79, 125, 126}.

En colaboración con otros grupos investigadores, se ha analizado el cariotipo de hUC-MSCs cultivadas con nuestras soluciones (LP1, LP2 y LP2i), no viéndose alteración alguna (resultados pendientes de publicación). Los fibroblastos dérmicos tampoco alteraron su cariotipo cuando se cultivaron con las soluciones LP1 y LP2⁵⁴.

5.1.12) Estabilidad de los materiales de partida y los hPL.

Se desconoce el tiempo máximo de almacenamiento de **las plaquetas congeladas y el plasma inactivado congelado** para que sean efectivas en la producción del lisado¹².

Bihm¹²⁷ y colaboradores, analizaron la concentración de proteínas sobre muestras de plasma irradiadas con el sistema Mirasol y almacenadas dos años a -30°C. Los resultados mostraron diferencias significativas a tiempo cero con el plasma sin tratar en algunas proteínas como los factores de coagulación VIII y VII, pero en un intervalo aceptable clínicamente. Por ejemplo, los factores de la vía intrínseca se mantuvieron en un rango de 69-90% y los de la vía extrínseca en 73-88%. El rango de variabilidad en la pérdida de los factores tras el tratamiento, se explicó por la diversidad biológica de los donantes. Durante el almacenamiento no hubo pérdidas significativas, excepto para el factor VII (64 -76%).

En nuestro estudio hemos analizado los datos de lisados fabricados a partir de concentrados de plaquetas almacenadas durante 13 meses a -80°C antes de fabricar los lisados plaquetarios. Observamos diferencias significativas en los niveles de PDGF-AB (37,38±1,94ng/mL a

25,89±3,04ng/mL ($p<0,001$) y las tasas de duplicaciones celulares calculadas (2,57±0,23 a 1,79±0,08 ($p<0,05$)), tras comparar 1 mes vs 13 meses. Mientras que las concentraciones de proteínas totales no experimentaron diferencias significativas al pasar de 1 mes a 3 meses de congelación. A pesar de ello, cumplieron con los criterios de aceptación establecidos para estos parámetros, por lo que consideramos que siguen siendo óptimos para su uso. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de pH e IgG, aunque sí en los niveles de Pt y Alb al comparar el plasma inactivado congelado con el plasma control almacenados durante 24 meses a -80°C.

Varios centros han evaluado la estabilidad mediante el análisis de la proliferación celular y/o determinados factores de crecimiento plaquetario⁵⁰ (ver anexo 10).

Respecto a los datos obtenidos en este trabajo de tesis, los resultados de estabilidad para los **LP1** almacenados durante 24 meses a -20°C fueron: los valores de pH se mantuvieron estables para todo el periodo de almacenamiento; la concentración de PDGF-AB y las duplicaciones con fibroblastos no experimentaron diferencias significativas entre el tiempo 0 y 24 meses.

Los resultados de estabilidad para los **LP2** almacenados durante 24 meses a -20°C y a -80°C se mantuvieron estables el pH; las concentraciones de Pt e IgG no experimentaron diferencias significativas entre el tiempo 0 y 24 meses, y tampoco entre las dos temperaturas de almacenamiento. Para la Alb se obtuvieron diferencias significativas tanto para el tiempo almacenado como para las temperaturas, aunque las diferencias de las medias estuvieron dentro del error de imprecisión de la técnica, no teniendo significado biológico las diferencias estadísticas. Entre las concentraciones de PDGF-AB, tampoco se hallaron diferencias significativas ni durante el tiempo de almacenamiento ni para las dos temperaturas. Y en las duplicaciones con fibroblastos, no hubo diferencias significativas entre los lisados almacenados a -20°C o a -80°C, pero sí se obtuvo entre tiempo 0 y 24 meses ($p<0,01$), los valores fueron 2,45±0,10 y 3,07±0,07 respectivamente.

Los resultados para los **LP2i** almacenados durante 24 meses a -20°C y a -80°C fueron: el pH se mantuvo estable durante los 24 meses tanto a -20°C como a -80°C; las concentraciones de Pt, Alb, IgG y PDGF-AB no tuvieron diferencias significativas al comparar entre tiempo 0 y 24 meses o entre -20°C y -80°C. En las duplicaciones con fibroblastos tampoco hubo cambios significativos durante el tiempo almacenado o entre las dos temperaturas. Y para las duplicaciones con mesenquimales, durante los 24 meses no hubo diferencias significativas, pero sí se hallaron al comparar entre -20°C y -80°C ($p<0,01$), con valores de 3,18±0,09 y 3,41±0,09 respectivamente. Las diferencias entre las medias, aunque es significativo estadísticamente, biológicamente son similares.

La estabilidad de nuestros lisados coincide con lo establecido por otros centros como el Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga en Alemania (24m a -20°C o a -80°C para el LP2 y LP2i ó 24m a -20°C para el LP1).

6) CONCLUSIONES

1. El proceso de fabricación de un lisado plaquetario puede optimizarse evitando la concentración de plaquetas, añadiendo una concentración de plasma adecuada y aplicando tres ciclos de congelación/descongelación, manteniendo a su vez la calidad de los productos.
2. La concentración de proteínas totales, albúmina, inmunoglobulinas, PDGF-AB y medidas de pH, han demostrado ser parámetros adecuados para la caracterización de las soluciones, y por lo tanto, pueden ser establecidos como test de identidad.
3. La aplicación de un sistema de reducción de patógenos basado en la combinación de riboflavina y luz ultravioleta sobre muestras de plasma y plaquetas, no afecta a la actividad biológica de los lisados plaquetarios a pesar de alterar su composición.
4. El lisado plaquetario fabricado en nuestras instalaciones es una alternativa eficaz y segura que puede usarse como suplemento del medio de cultivo de fibroblastos y células madre mesenquimales aisladas de cordón destinadas al uso clínico.
5. El lisado plaquetario 1 es estable durante 24 meses almacenado a -20°C.
6. El lisado plaquetario 2 y el lisado plaquetario 2 inactivado son estables almacenados a -20°C y -80°C durante 24 meses.
7. El plasma inactivado mantiene sus propiedades almacenado a -80°C durante 24 meses.
8. Las plaquetas almacenadas durante 13 meses disminuyen significativamente los niveles de PDGF-AB, afectando con ello a las tasas de crecimiento durante el cultivo.

7) BIBLIOGRAFÍA

1. Tema 1. Composición y funciones de la sangre. Opencourseware. Universidad de Cantabria.
2. Álvarez de Cienfuegos Rodríguez A, Tevar Sánchez M. Electroforesis de proteínas plasmáticas: proteinograma. *Rev Soc Val Reuma*. 2017;7(12):5-7.
3. González J., Garzón S., Campos R.M^a., Gil A. JA. Capítulo 6.1. Transfusión de sangre y hemoderivados. In: *Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos*. UNINET.
4. Fundación CAT. *Estándares En Transfusión Sanguínea*. 4^a edición.; 2012.
5. Wroblewski AP, Mejia HA, Wright VJ. Application of platelet-rich plasma to enhance tissue repair. *Oper Tech Orthop*. 2010;20(2):98-105. doi:10.1053/j.oto.2009.10.006
6. Gato Calvo L, Blanco García FJ (dir. tes. ., Fernández Burguera E (codir. tes. . Estandarización del plasma rico en plaquetas como medicamento para la artrosis. 2019. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=221225&orden=0&info=link%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/exttes?codigo=221225>.
7. García Sánchez, José M. Sepúlveda Sanchís, P.(director tesis) Mirabet Lis V (director tesis). Estudio sobre la cicatrización de la zona donante de injerto de piel parcial en pacientes quemados tras aplicación de plasma rico en plaquetas o plasma rico en factores de crecimiento frente a la forma terapéutica habitual. 2019.
8. Ministerio de Sanidad SS e I. Informe de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios sobre el uso de Plasma Rico en Plaquetas. Informe/V1/23052013. 23 de mayo de 2013.
9. Henschler R, Gabriel C, Schallmoser K, Burnouf T, Koh MBC. Human platelet lysate current standards and future developments. *Transfusion*. 2019;59(4):1407-1413. doi:10.1111/trf.15174
10. Moreno Díaz R, Carreño MG, Torres JJ, Herreros JMA, Villimar A, Sánchez PL. Methods to obtain platelet-rich plasma and osteoinductive therapeutic use. *Farm Hosp*. 2015;39(3):130-136. doi:10.7399/FH.2015.39.3.7998
11. Pla Palau R. *Guía Sobre La Transfusión de Componentes Sanguíneos y Derivados Plasmáticos*.; 2010.
12. Schallmoser K, Henschler R, Gabriel C, Koh MBC, Burnouf T. Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate: A Position Statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion. *Trends Biotechnol*. 2020. doi:10.1016/j.tibtech.2019.06.002
13. Strandberg G, Sellberg F, Sommar P, et al. Standardizing the freeze-thaw preparation of growth factors from platelet lysate. *Transfusion*. 2017;57(4):1058-1065. doi:10.1111/trf.13998
14. Bernardi M, Albiero E, Alghisi A, et al. Production of human platelet lysate by use of ultrasound for ex vivo expansion of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2013. doi:10.1016/j.jcyt.2013.01.219
15. Burnouf T, Tseng YH, Kuo YP, Su CY. Solvent/detergent treatment of platelet concentrates enhances the release of growth factors. *Transfusion*. 2008;48(6):1090-

1098. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01691.x
16. Oeller M, Laner-plamberger S, Krisch L, Rohde E, Strunk D, Schallmoser K. Human platelet lysate for good manufacturing practice-compliant cell production. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10). doi:10.3390/ijms22105178
 17. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells.* 2009;27(9):2331-2341. doi:10.1002/stem.139
 18. Laitinen A, Oja S, Kilpinen L, Kaartinen T, Mo J, Nystedt J. A robust and reproducible animal serum-free culture method for clinical-grade bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotechnology.* 2016:891-906. doi:10.1007/s10616-014-9841-x
 19. Tzu-Bi Shih D, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N Biotechnol.* 2015;32(1). doi:10.1016/j.nbt.2014.06.001
 20. Bieback K, Fernandez-Muñoz B, Pati S, Schäfer R. Gaps in the knowledge of human platelet lysate as a cell culture supplement for cell therapy: a joint publication from the AABB and the International Society for Cell & Gene Therapy. *Transfusion.* 2019;59(11):3448-3460. doi:10.1111/TRF.15483
 21. Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: An update. *Transfus Med Hemotherapy.* 2014;41(4):309-325. doi:10.1159/000365646
 22. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion.* 2004. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.03355.x
 23. Valenciana) RR (Centro de transfusión de la C. Inactivación de patógenos en componentes sanguíneos. Estado del Arte.
 24. Technology G. Lisado plaquetario inactivado que contiene factores de crecimiento empobrecido en PDGF y VEGF y su procedimiento de preparación. Boletín Oficial de Propiedad Industrial. (2013).
 25. Irsch J, Lin L. Pathogen inactivation of platelet and plasma blood components for transfusion using the INTERCEPT blood system. *Transfus Med Hemotherapy.* 2011. doi:10.1159/000323937
 26. Smith J, Rock G. Protein quality in Mirasol pathogen reduction technology-treated, apheresis-derived fresh-frozen plasma. *Transfusion.* 2010;50(4):926-931. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02517.x
 27. Viau S, Eap S, Chabrand L, Lagrange A, Delorme B. Viral inactivation of human platelet lysate by gamma irradiation preserves its optimal efficiency in the expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Transfusion.* 2019. doi:10.1111/trf.15205
 28. Committee for medicinal products for human use (2011). Guideline on plasma-derived medicinal products. EMA/CHMP/BWP/706271/2010, European Medicines Agency.
 29. AEMPS. Guía de Normas de Correcta Fabricación de la Unión Europea. Medicamentos de uso humano y uso veterinario.
 30. Chapter 5.2.12. Raw materials of biological origin for the production of cell-based and gene therapy medicinal products. In European Pharmacopoeia 10th ed.; Council of Europe, Strasbourg, France, 2019.

31. Fekete N, Gadelorge M, Frst D, et al. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: Production process, content and identification of active comp. *Cytotherapy*. 2012. doi:10.3109/14653249.2012.655420
32. Turner ML, Ludlam CA. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol*. 2008. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07376.x
33. Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RSG, et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*. 2004. doi:10.1016/S0140-6736(04)15486-X
34. Peden A, Mccardle L, Head MW, et al. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia*. 2010. doi:10.1111/j.1365-2516.2009.02181.x
35. Solomon J, Csontos L, Clarke D, et al. Current perspectives on the use of ancillary materials for the manufacture of cellular therapies. *Cytotherapy*. 2016. doi:10.1016/j.jcyt.2015.09.010
36. Anitua E, Orive G, Aguirre JJ, Andía I. Clinical Outcome of Immediately Loaded Dental Implants Bioactivated With Plasma Rich in Growth Factors: A 5-Year Retrospective Study. *J Periodontol*. 2008. doi:10.1902/jop.2008.070580
37. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004. doi:10.1016/j.bone.2003.12.010
38. Sánchez M, Azofra J, Anitua E, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: A case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003. doi:10.1249/01.MSS.0000089344.44434.50
39. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Jt Surg - Ser A*. 2012. doi:10.2106/JBJS.L.00019
40. Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, et al. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*. 2010. doi:10.1136/bjism.2010.079822
41. Filardo G, Kon E, Pereira Ruiz MT, et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections for cartilage degeneration and osteoarthritis: Single- versus double-spinning approach. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc*. 2012. doi:10.1007/s00167-011-1837-x
42. Sánchez M, Fiz N, Azofra J, et al. A randomized clinical trial evaluating plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) versus hyaluronic acid in the short-term treatment of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg*. 2012. doi:10.1016/j.arthro.2012.05.011
43. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2008. doi:10.1002/jbm.b.30886
44. Anitua E, Sánchez M, Orive G. Potential of endogenous regenerative technology for in situ regenerative medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010. doi:10.1016/j.addr.2010.01.001
45. Anitua E, Orive G. Endogenous regenerative technology using plasma- and platelet-

- derived growth factors. *J Control Release*. 2012. doi:10.1016/j.jconrel.2011.11.011
46. Beitia M, Delgado D, Sánchez P, de la Cueva AV, Cugat JR, Sánchez M. Platelet lysate nebulization protocol for the treatment of covid-19 and its sequels: Proof of concept and scientific rationale. *Int J Mol Sci*. 2021. doi:10.3390/ijms22041856
 47. Nebie O, Carvalho K, Barro L, et al. Human platelet lysate biotherapy for traumatic brain injury: preclinical assessment. *Brain*. 2021;(June). doi:10.1093/brain/awab205
 48. Strunk D, Lozano M, Marks DC, et al. International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation. *Vox Sang*. 2018;113(1):e1-e25. doi:10.1111/vox.12594
 49. Trento C, Bernardo ME, Nagler A, et al. Manufacturing Mesenchymal Stromal Cells for the Treatment of Graft-versus-Host Disease: A Survey among Centers Affiliated with the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018. doi:10.1016/j.bbmt.2018.07.015
 50. Strunk D, Lozano M, Marks DC, et al. International Forum on GMP-grade human platelet lysate for cell propagation: summary. *Vox Sang*. 2018;113(1):80-87. doi:10.1111/vox.12593
 51. Pérez-Simon JA, López-Villar O, Andreu EJ, et al. Mesenchymal stem cells expanded in vitro with human serum for the treatment of acute and chronic graft-versus-host disease: Results of a phase I/II clinical trial. *Haematologica*. 2011. doi:10.3324/haematol.2010.038356
 52. Sánchez-Guijo F, Caballero-Velázquez T, López-Villar O, et al. Sequential Third-Party Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Refractory Acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014. doi:10.1016/j.bbmt.2014.06.015
 53. Rauch C, Feifel E, Amann E-M, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX*. 2011;28(4):305-316. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22130485>. Accessed March 25, 2018.
 54. Fernández Muñoz B, Lopez-Navas L, Gonzalez Bermejo M, et al. a Proprietary Gmp Human Platelet Lysate for the Expansion of Dermal Fibroblasts for Clinical Applications. *Platelets*. 2021;00(00):1-12. doi:10.1080/09537104.2020.1856356
 55. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*. 2016. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.065
 56. Burnouf T. Multifaceted regenerative lives of 'expired' platelets. *ISBT Sci Ser*. February 2018. doi:10.1111/voxs.12415
 57. Thieme D, Reuland L, Lindl T, Kruse F, Fuchsluger T. Optimized human platelet lysate as novel basis for a serum-, xeno-, and additive-free corneal endothelial cell and tissue culture. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(2):557-564. doi:10.1002/term.2574
 58. Gonzales VK, De Mulder ELW, De Boer T, et al. Platelet-rich plasma can replace fetal bovine serum in human meniscus cell cultures. *Tissue Eng - Part C Methods*. 2013. doi:10.1089/ten.tec.2013.0009
 59. Mazzocca AD, McCarthy MBR, Chowaniec DM, et al. The Positive Effects of Different Platelet-Rich Plasma Methods on Human Muscle, Bone, and Tendon Cells. *Am J Sports Med*. 2012;40(8):1742-1749. doi:10.1177/0363546512452713
 60. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (2020). Guide to the

Preparation, Use and Quality Assurance of Blood Components (20th edn.), Council of Europe.

61. Schallmoser K, Strunk D. Generation of a pool of human platelet lysate and efficient use in cell culture. *Methods Mol Biol.* 2013. doi:10.1007/978-1-62703-128-8_22
62. Lange C, Cakiroglu F, Spiess AN, Cappallo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007. doi:10.1002/jcp.21081
63. Bianchetti A, Chinello C, Guindani M, et al. A Blood Bank Standardized Production of Human Platelet Lysate for Mesenchymal Stromal Cell Expansion: Proteomic Characterization and Biological Effects. *Front Cell Dev Biol.* 2021. doi:10.3389/fcell.2021.650490
64. Becherucci V, Piccini L, Casamassima S, et al. Human platelet lysate in mesenchymal stromal cell expansion according to a GMP grade protocol: A cell factory experience. *Stem Cell Res Ther.* 2018. doi:10.1186/s13287-018-0863-8
65. Lozano ML, Rivera J, Vicente V. Concentrados de plaquetas procedentes de sangre total (buffy coat) u obtenidos por aféresis; ¿qué producto emplear? *Med Clin (Barc).* 2012;138(12):528-533. doi:10.1016/j.medcli.2011.05.008
66. Sonker A, Dubey A. Determining the effect of preparation and storage: An effort to streamline platelet components as a source of growth factors for clinical application. *Transfus Med Hemotherapy.* 2015. doi:10.1159/000371504
67. Chan RK, Liu P, Lew DH, et al. Expired liquid preserved platelet releasates retain proliferative activity. *J Surg Res.* 2005. doi:10.1016/j.jss.2005.01.013
68. Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet Lysates Produced from Expired Platelet Concentrates Support Growth and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One.* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0068984
69. Dessels C, Durandt C, Pepper MS. Comparison of human platelet lysate alternatives using expired and freshly isolated platelet concentrates for adipose-derived stromal cell expansion. *Platelets.* 2019. doi:10.1080/09537104.2018.1445840
70. Glovinski P V., Herly M, Mathiasen AB, et al. Overcoming the bottleneck of platelet lysate supply in large-scale clinical expansion of adipose-derived stem cells: A comparison of fresh versus three types of platelet lysates from outdated buffy coat-derived platelet concentrates. *Cytotherapy.* 2017;19(2):222-234. doi:10.1016/j.jcyt.2016.10.014
71. Sellberg F, Berglund E, Ronaghi M, et al. Composition of growth factors and cytokines in lysates obtained from fresh versus stored pathogen-inactivated platelet units. *Transfus Apher Sci.* 2016;55(3):333-337. doi:10.1016/j.transci.2016.08.004
72. Jonsdottir-Buch SM, Sigurgrimsdottir H, Lieder R, Sigurjonsson OE. Expired and pathogen-inactivated platelet concentrates support differentiation and immunomodulation of mesenchymal stromal cells in culture. *Cell Transplant.* 2015. doi:10.3727/096368914X683043
73. Tan C, Shichinohe H, Wang Z, et al. Feasibility and Efficiency of Human Bone Marrow Stromal Cell Culture with Allogeneic Platelet Lysate-Supplementation for Cell Therapy against Stroke. *Stem Cells Int.* 2016. doi:10.1155/2016/6104780

74. Moll G, Hult A, Lv B, Alm JJ, Heldring N. Do ABO Blood Group Antigens Hamper the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stromal Cells? *PLoS One*. 2014;9(1):85040. doi:10.1371/journal.pone.0085040
75. Chou ML, Wu JW, Gouel F, et al. Tailor-made purified human platelet lysate concentrated in neurotrophins for treatment of Parkinson's disease. *Biomaterials*. 2017;142:77-89. doi:10.1016/j.BIOMATERIALS.2017.07.018
76. Lambiase A, Manni L, Bonini S, Rama P, Micera A, Aloe L. Nerve growth factor promotes corneal healing: Structural, biochemical, and molecular analyses of rat and human corneas. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000.
77. Somani A, Rai R. Comparison of efficacy of autologous platelet-rich fibrin versus saline dressing in chronic venous leg ulcers: A randomised controlled trial. *J Cutan Aesthet Surg*. 2017. doi:10.4103/JCAS.JCAS_137_16
78. Astori G, Amati E, Bambi F, et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: Present and future. *Stem Cell Res Ther*. 2016. doi:10.1186/s13287-016-0352-x
79. Bieback K. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfus Med Hemotherapy*. 2013. doi:10.1159/000354061
80. Muraglia A, Nguyen VT, Nardini M, et al. Culture Medium Supplements Derived from Human Platelet and Plasma: Cell Commitment and Proliferation Support. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:66. doi:10.3389/fbioe.2017.00066
81. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, et al. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2010. doi:10.3109/14653249.2010.501788
82. Poloni A, Maurizi G, Serrani F, et al. Human AB serum for generation of mesenchymal stem cells from human chorionic villi: comparison with other source and other media including platelet lysate. *Cell Prolif*. 2012;45(1):66-75. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00799.x
83. Copland IB, Garcia MA, Waller EK, Roback JD, Galipeau J. The effect of platelet lysate fibrinogen on the functionality of MSCs in immunotherapy. *Biomaterials*. 2013. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.06.050
84. Mojica-Henshaw MP, Jacobson P, Morris J, et al. Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*. 2013;15(12):1458-1468. doi:10.1016/j.jcyt.2013.06.014
85. Hemedá H, Kalz J, Walenda G, Lohmann M, Wagner W. Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*. 2013. doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.006
86. Laner-Plamberger S, Oeller M, Poupardin R, et al. Heparin Differentially Impacts Gene Expression of Stromal Cells from Various Tissues. *Sci Rep*. 2019. doi:10.1038/s41598-019-43700-x
87. Chandarajoti K, Liu J, Pawlinski R. The design and synthesis of new synthetic low-molecular-weight heparins. *J Thromb Haemost*. 2016. doi:10.1111/jth.13312
88. Lord MS, Cheng B, Tang F, Lyons JG, Rnjak-Kovacina J, Whitelock JM. Bioengineered human heparin with anticoagulant activity. *Metab Eng*. 2016.

doi:10.1016/j.ymben.2016.07.006

89. Griffiths S, Baraniak PR, Copland IB, Nerem RM, McDevitt TC. Human platelet lysate stimulates high-passage and senescent human multipotent mesenchymal stromal cell growth and rejuvenation in vitro. *Cytotherapy*. 2013. doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.020
90. Cholewa D, Stiehl T, Schellenberg A, et al. Expansion of Adipose Mesenchymal Stromal Cells is Affected by Human Platelet Lysate and Plating Density. *Cell Transplant*. 2011;20(9):1409-1422. doi:10.3727/096368910X557218
91. Agostini F, Polesel J, Battiston M, et al. Standardization of platelet releasate products for clinical applications in cell therapy: a mathematical approach. *J Transl Med*. 2017;15(1):107. doi:10.1186/s12967-017-1210-z
92. Castillo TN, Pouliot MA, Kim HJ, Dragoo JL. Comparison of Growth Factor and Platelet Concentration From Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems. *Am J Sports Med*. 2011;39(2):266-271. doi:10.1177/0363546510387517
93. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, et al. Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion*. 2001. doi:10.1046/j.1537-2995.2001.41101217.x
94. Delila L, Wu YW, Nebie O, et al. Extensive characterization of the composition and functional activities of five preparations of human platelet lysates for dedicated clinical uses. *Platelets*. 2021. doi:10.1080/09537104.2020.1849603
95. Doucet C, Ernou I, Zhang Y, et al. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol*. 2005. doi:10.1002/jcp.20391
96. Lang S, Herrmann M, Pfeifer C, et al. Leukocyte-reduced platelet-rich plasma stimulates the in vitro proliferation of adipose-tissue derived mesenchymal stem cells depending on PDGF signaling. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2017;67(2):183-196. doi:10.3233/CH-170246
97. Guiotto M, Raffoul W, Hart AM, Riehle MO, Di Summa PG. Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: A systematic review. *J Transl Med*. 2020. doi:10.1186/s12967-020-02489-4
98. Shanskii YD, Sergeeva NS, Sviridova IK, et al. Human platelet lysate as a promising growth-stimulating additive for culturing of stem cells and other cell types. *Bull Exp Biol Med*. 2013. doi:10.1007/s10517-013-2298-7
99. Shichinohe H, Kuroda S, Sugiyama T, et al. Biological Features of Human Bone Marrow Stromal Cells (hBMSC) Cultured with Animal Protein-Free Medium-Safety and Efficacy of Clinical Use for Neurotransplantation. *Transl Stroke Res*. 2011. doi:10.1007/s12975-011-0088-y
100. Prowse C V. Component pathogen inactivation: A critical review. *Vox Sang*. 2013. doi:10.1111/j.1423-0410.2012.01662.x
101. Osman A, Hitzler WE, Meyer CU, et al. Effects of pathogen reduction systems on platelet microRNAs, mRNAs, activation, and function. *Platelets*. 2015. doi:10.3109/09537104.2014.898178
102. Prudent M, D'Alessandro A, Cazenave JP, et al. Proteome changes in platelets after pathogen inactivation-an interlaboratory consensus. *Transfus Med Rev*. 2014. doi:10.1016/j.tmr.2014.02.002

103. Viau S, Chabrand L, Eap S, et al. Pathogen reduction through additive-free short-wave UV light irradiation retains the optimal efficacy of human platelet lysate for the expansion of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Burns JS*, ed. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181406. doi:10.1371/journal.pone.0181406
104. Iudicone P, Fioravanti D, Bonanno G, et al. Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2014. doi:10.1186/1479-5876-12-28
105. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004. doi:10.1016/j.exphem.2004.02.004
106. Carrancio S, López-Holgado N, Sánchez-Guijo FM, et al. Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol*. 2008;36(8):1014-1021. doi:10.1016/j.exphem.2008.03.012
107. Fazzina Iudicone A Mariotti D Fioravanti A Procoli E Cicchetti G Scambia G Bonanno L Pierelli RP, Iudicone Á Fioravanti Á E Cicchetti Á L Pierelli PD, Iudicone P, et al. Culture of human cell lines by a pathogen-inactivated human platelet lysate. *Cytotechnology*. 2016;68:1185-1195. doi:10.1007/s10616-015-9878-5
108. Christensen C, Jonsdottir-Buch SM, Sigurjonsson OE. Effects of amotosalen treatment on human platelet lysate bioactivity: A proof-of-concept study. *PLoS One*. 2020. doi:10.1371/journal.pone.0220163
109. Flemming A, Schallmoser K, Strunk D, Stolk M, Volk HD, Seifert M. Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *J Clin Immunol*. 2011. doi:10.1007/s10875-011-9581-z
110. Abdelrazik H, Spaggiari GM, Chiossone L, Moretta L. Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. *Eur J Immunol*. 2011. doi:10.1002/eji.201141542
111. Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol*. 2007. doi:10.1002/jcp.20911
112. Oikonomopoulos A, Van Deen WK, Manansala AR, et al. Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: The effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep*. 2015. doi:10.1038/srep16570
113. Castegnaro S, Chiericato K, Maddalena M, et al. Effect of Platelet Lysate on the Functional and Molecular Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose Tissue. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2011. doi:10.2174/157488811795495440
114. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. doi:10.1080/14653240600855905
115. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: Progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. ; 2000. doi:10.1007/978-3-642-57276-0_1
116. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science (80-)*. 1997. doi:10.1126/science.276.5309.71
117. Juhl M, Tratwal J, Follin B, et al. Comparison of clinical grade human platelet lysates for

- cultivation of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue. *Scand J Clin Lab Invest*. 2016. doi:10.3109/00365513.2015.1099723
118. Boraldi F, Burns JS, Bartolomeo A, Dominici M, Quaglino D. Mineralization by mesenchymal stromal cells is variously modulated depending on commercial platelet lysate preparations. *Cytotherapy*. 2018. doi:10.1016/j.jcyt.2017.11.011
 119. Manferdini C, Gabusi E, Sartore L, et al. Chitosan-based scaffold counteracts hypertrophic and fibrotic markers in chondrogenic differentiated mesenchymal stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019. doi:10.1002/term.2941
 120. Gong Z, Calkins G, Cheng EC, Krause D, Niklason LE. Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng - Part A*. 2009. doi:10.1089/ten.tea.2008.0161
 121. Haynesworth SE, Barer MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992. doi:10.1016/8756-3282(92)90363-2
 122. Fekete N, Rojewski MT, Fürst D, et al. GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. *PLoS One*. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0043255
 123. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: Occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010. doi:10.1182/blood-2009-05-219907
 124. Grau-Vorster M, Laitinen A, Nystedt J, Vives J. HLA-DR expression in clinical-grade bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells: A two-site study. *Stem Cell Res Ther*. 2019. doi:10.1186/s13287-019-1279-9
 125. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant*. 2011. doi:10.3727/096368910X543376
 126. Dahl JA, Duggal S, Coulston N, et al. Genetic and epigenetic instability of human bone marrow mesenchymal stem cells expanded in autologous serum or fetal bovine serum. *Int J Dev Biol*. 2008. doi:10.1387/ijdb.082663jd
 127. Bihm DJ, Ettinger A, Buytaert-Hoefen KA, et al. Characterization of plasma protein activity in riboflavin and UV light-treated fresh frozen plasma during 2 years of storage at -30°C. *Vox Sang*. 2010. doi:10.1111/j.1423-0410.2009.01238.x
 128. Shih DTB, Chen JC, Chen WY, Kuo YP, Su CY, Burnouf T. Expansion of adipose tissue mesenchymal stromal progenitors in serum-free medium supplemented with virally inactivated allogeneic human platelet lysate. *Transfusion*. 2011. doi:10.1111/j.1537-2995.2010.02915.x
 129. Castiglia S, Mareschi K, Labanca L, et al. Inactivated human platelet lysate with psoralen: A new perspective for mesenchymal stromal cell production in good manufacturing practice conditions. *Cytotherapy*. 2014. doi:10.1016/j.jcyt.2013.12.008
 130. Mareschi K, Castiglia S, Adamini A, et al. Inactivated platelet lysate supports the proliferation and immunomodulant characteristics of mesenchymal stromal cells in GMP culture conditions. *Biomedicines*. 2020. doi:10.3390/BIOMEDICINES8070220
 131. Pierce J, Benedetti E, Preslar A, et al. Comparative analyses of industrial-scale human platelet lysate preparations. *Transfusion*. 2017. doi:10.1111/trf.14324

8) ANEXOS

8.1) Anexo 1. Grupo sanguíneo para plasma y plaquetas en la fabricación del hPL

Centro fabricante de hPL	Grupo sanguíneo plasma/plaquetas
Unidad GMP del Departamento de Medicina Transfusional en la Universidad Paracelso de Salzburgo, Austria	Plaquetas del grupo 0 (mayor porcentaje) Y todos los grupos
Laboratorio de Terapia Celular en el Centro de Transfusión de Helsinki, Finlandia	Para las plaquetas y para el plasma grupo AB
Centro de donaciones de la Cruz Roja en Sidney, Australia	Plaquetas grupo 0 (mayoría) y A Todos los grupos
Unidad del Banco de Sangre del Hospital Landspítali en Reikiavik, Islandia	Plaquetas grupos A o 0 sin mezclar
Centro de Terapia Celular G. Lanzani (Bergamo, Italia)	No tienen en cuenta los grupos
Hematología del Hospital Universitario de Salamanca	No tienen en cuenta los grupos
Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah, EEUU	No tienen en cuenta los grupos

8.2) Anexo 2. Métodos utilizados para producir la liberación de los factores en centros fabricantes de hPL.

Centro fabricante de hPL	Liberación Factores de Crecimiento
Centro de donaciones de la Cruz Roja en Sidney, Australia	Ciclos congelación/descongelación
Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria	Ciclos congelación/descongelación
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunogenética de Ulm, Alemania	Ciclos congelación/descongelación
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunología de Mannheim, Alemania	Activación con trombina antes de lisar con ciclos congelación/descongelación
Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga, Alemania	Ciclos congelación/descongelación
Unidad del Banco de Sangre del Hospital Landspítali en Reikiavik, Islandia	Ciclos congelación/descongelación
Hospital San Camillo Forlanini, Roma, Italia	3 ciclos de congelación/descongelación (-80°C/37°C)
Centro de Terapia Celular G. Lanzani Bergamo, Italia	Un ciclo congelación/descongelación (-80°C/37°C)
Hematología del Hospital Universitario de Salamanca	Un ciclo de congelación/descongelación (-80°C, 37°C)
Instituto de Ingeniería Tisular de Taipei Taiwán	Ciclos congelación/descongelación Activación por cloruro cálcico
Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah, EEUU	Ciclo congelación/descongelación

8.3) Anexo 3. Valores de los parámetros bioquímicos del lisado plaquetario en distintos centros fabricantes.

Centro	Parámetro	Límite
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunogenética de Ulm, Alemania	Albúmina	55% a 69% de Pt
	Osmolaridad	297 – 314 mOsm/kg
	pH	6,7 a 7,2
Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga, Alemania	Albúmina	>25 g/l
	Fibrinógeno	<25 mg/dl
	LDH	>1800 U/ml
	Hemoglobina	<20 mg/dl
	Triglicéridos	<200 mg/dl
	colesterol	<250 mg/dl
	Sodio	125-175 mM
	Potasio	3,0-6,5 mM
	calcio	<15 mM
	Magnesio	0,8-1,7 mM
	Cloro	60-100 mM
	Fosfato	0,8-1,7 mM
	Osmolaridad	275-325 mOsm/kg
Unidad del Banco de Sangre del Hospital Landspítali en Reikiavik, Islandia	pH	7,5 ± 0,8
Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah, EEUU	pH	6,4 a 8,0
	Osmolalidad	260 –340 mOsm/kg

8.4) Anexo 4. Concentraciones de proteínas y factores plaquetarios en diferentes centros fabricantes de hPL.

Centro	Proteínas en hPL (g/dL)	Factor plaquetario medido
Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria	<1 (lavan plaquetas)	factores de crecimiento entre 10 y 20 veces superiores que en el suero variaciones entre lote y lote están dentro de límites aceptables
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunogenética de Ulm, Alemania	Entre 1,5 y 4	PDGF FGF TGF-beta
Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga, Alemania	>4,5	PDGF-AB >20ng/ml
Unidad del Banco de Sangre del Hospital Landspítali en Reikiavik, Islandia	2,0 ± 0,5	TGF-β1, PDGF-BB, VEGF, bFGF, EGF
Hospital San Camillo Forlanini, Roma, Italia	No especificado	TGF-β1, VEGF, PDGF-AB, basic-FGF (en al menos tres lotes)
Instituto de Ingeniería Tisular de Taipei, Taiwán	No especificado	PDGF-AB, TGF-β, VEGF, BDNF, EGF, FGF-1, HGF
Oeller ¹⁶	No especificado	Aleatoria para verificar lisis
Rauch ⁵³	10	PDGF-AB, VEGF, EGF, bFGF y TGF-β1 (valores altos) IGF-1 (valores bajos)

8.5) Anexo 5. Análisis funcionales realizados por diversos centros fabricantes de lisado.

Centro fabricante de hPL	Análisis funcionales del hPL
Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria	Diferenciación a osteocitos, adipocitos y condrocitos
Unidad GMP del Departamento de Medicina Transfusional en la Universidad Paracelso de Salzburgo, Austria	Límite $\leq 10\%$ de disminución en la promoción de crecimiento celular respecto a lisado control
Laboratorio de Terapia Celular en el Centro de Transfusiones de Helsinki, Finlandia	Al menos 3 duplicaciones celulares en 7 días
Centro de Transfusión de la Cruz Roja Australiana, Sídney	Fenotipo
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunología Mannheim, Alemania	Promoción crecimiento Comparan con 1 -2 lotes de lisado previos
Hospital San Camillo Forlanini, Roma, Italia	Tiene que haber un pase con DT < 50h (se realizan dos pases mínimos)
Mill Creek (PLTGold Clinical Grade)	DT < 32h y al menos el día 5 (75% confluencia) para hAT-MSc
AventaCell (UltraGRO-Advanced GMP Grade)	No tienen especificación. El resultado obtenido en la proliferación aparece en el certificado
PL Bioscience (ELAREM Ultimate-FDi)	Promoción crecimiento MSC ≥ 3 pases

8.6) Anexo 6. Efecto de aplicar un método de reducción de patógenos en la proliferación celular.

Estudio	Método de inactivación	Control	Células	Nº de muestras	Proliferación
Viau ¹⁰³	Theraflex	FBS	hBM-MSC	6	Aumentada
Viau ¹⁰³	Theraflex	hPL sin inactivar	hBM-MSC	6	No diferencia significativa
Viau ²⁷	Irradiación gama	hPL sin inactivar	hBM-MSC	2	No diferencia significativa
Iudicone ¹⁰⁴	Intercept	hPL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Fazzina ¹⁰⁷	Intercept	FBS	Tumorales epiteliales y hematológicas	9	Disminuida en algunas líneas
Christensen ¹⁰⁸	Intercept	hPL inactivado después de fabricado	hBM-MSC	6	Aumentada
Jonsdottir-Buch ⁷²	Intercept	hPL sin inactivar	hBM-MSC	2	No diferencia significativa
Shih ¹²⁸	Tritón X-45	FBS	hAT-MSC	3	Aumentada
Castiglia ¹²⁹	Intercept	FBS	hBM-MSC	16	Aumentada
Castiglia ¹²⁹	Intercept	hPL sin inactivar	hBM-MSC	16	No diferencia significativa

8.7) Anexo 7. Efecto de emplear hPL inactivado sobre la capacidad inmunosupresora de MSC.

Estudio	Método de inactivación	Control	Células	Nº de muestras	Capacidad inmunosupresora
Iudicone ¹⁰⁴	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Jonsdottir-Buch ⁷²	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	2	Aumentada
Mareschi ¹³⁰	Intercept	FBS	hBM-MSC	5	No diferencia significativa
Viau ²⁷	Irradiación gama	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa

8.8) Anexo 8. Efecto del uso de hPL inactivados sobre la capacidad de diferenciación en MSC.

Estudio	Método de inactivación	Control	Células	Nº de muestras	Capacidad de diferenciación
Iudicone ¹⁰⁴	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Shih ¹²⁸	Tritón X-45	FBS	hAT-MSC	3	No diferencia significativa
Viau ¹⁰³	Theraflex	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Viau ²⁷	Irradiación gama	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Jonsdottir-Buch ⁷²	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	2	Aumentada condrogénesis y osteogénesis
Castiglia ¹²⁹	Intercept	FBS	hBM-MSC	19	No diferencia significativa
Castiglia ¹²⁹	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	19	No diferencia significativa
Christensen ¹⁰⁸	Intercept	PL inactivado después de fabricado	hBM-MSC	6	No diferencia significativa

8.9) Anexo 9. Efecto del uso de hPL inactivados sobre el inmunofenotipo.

Estudio	Método de inactivación	Control	Células	Nº de muestras	Inmunofenotipo
Iudicone ¹⁰⁴	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Shih ¹²⁸	Tritón-X45	FBS	hAT-MSC	3	No diferencia significativa
Viau ¹⁰³	Theraflex	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Viau ²⁷	Irradiación gama	PL sin inactivar	hBM-MSC	3	No diferencia significativa
Jonsdottir-Buch ⁷²	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	2	No diferencia significativa
Castiglia ¹²⁹	Intercept	FBS	hBM-MSC	16	No diferencia significativa
Castiglia ¹²⁹	Intercept	PL sin inactivar	hBM-MSC	16	No diferencia significativa
Mareschi ¹³⁰	Intercept	FBS	hBM-MSC	5	No diferencia significativa
Fazzina ¹⁰⁷	Intercept	FBS	Tumorales epiteliales y hematológicas	9	No diferencia significativa

8.10) Anexo 10. Ejemplos de estudios de estabilidad sobre lisados plaquetarios.

Centro	Parámetro analizado	Estabilidad hPL
Australian Red Cross Blood Service (Sydney, Australia) ⁴⁸	No especificado	12 meses entre -80°C y -30°C
Centro de Transfusión del Hospital de Innsbruck, Austria ⁴⁸	EGF	5 meses a -20°C
Unidad GMP del Departamento de Medicina Transfusional en la Universidad Paracelso de Salzburgo, Austria ⁴⁸	Proliferación Factores y citoquinas	24 meses a ≤ -30°C Las plaquetas 3m a -30°C
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunogenética de Ulm, Alemania ⁴⁸	No especificado	24m a ≤ -30°C Las plaquetas 24m a ≤ -30°C
Instituto de Medicina Transfusional e Inmunología de Mannheim, Alemania ⁴⁸	Proliferación	24 meses a -30°C
Instituto de Medicina Transfusional de Tubinga, Alemania ⁴⁸	PDGF-AB	24m -20°C y -80°C
The Blood Bank Landspítali University Hospital Reykjavik Iceland ⁴⁸	Albúmina	24m -20°C
Unidad del Banco de Sangre del Hospital Landspítali en Reikiavik, Islandia ⁴⁸	Proteínas totales Albúmina metabolitos, Factores crecimiento, Cultivo mesenquimales	Estudio en marcha -20°C a 37°C Entre 3d y 6m, puntos muestreo
Hospital San Camillo Forlanini, Roma, Italia ⁴⁸	Proliferación	6m a -20°C 12m a -80°C
Centro de Terapia Celular G. Lanzani Bergamo, Italia ⁴⁸	No especificado	-30°C Las alícuotas 12m a -30°C
Terapia Celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de Utah, EEUU ⁴⁸	PDGF-BB, VEGF, EGF, bFGF Proliferación	-80°C, 5 años
Bianchetti ⁶³	Proliferación celular	24m a -80°C
Pierce ¹³¹	Proliferación y factores plaquetarios	24m a -80°C

8.11) Anexo 11: Artículos relacionados con la tesis

1. Bermejo González M, Campos Cuerva R, Fernández Muñoz B, Rosell-Valle C, Martín López M, Arribas Arribas B, Montiel Aguilera MA, Carmona Sánchez G and Santos González M. **Optimization of human platelet lysate production and pathogen reduction in a public blood transfusion center.** Nº identidad manuscrito: Trans-2022-0275.R1 (aceptado para publicación en Transfusion).
2. Fernández Muñoz B, Lopez-Navas L, Gonzalez Bermejo M, Lomas Romero IM, Montiel Aguilera MA, Campos Cuerva R, Arribas Arribas B, Nogueras S, Carmona Sánchez G, and Santos González M, **A Proprietary Gmp Human Platelet Lysate for the Expansion of Dermal Fibroblasts for Clinical Applications.** Platelets. 2021;00(00):1-12. doi:10.1080/09537104.2020.1856356