



TESIS DOCTORAL

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA
DEL EMPLEO DE COLIRIO DE SUERO
AUTÓLOGO V_s HETERÓLOGO
EN SÍNDROME DE OJO SECO

DOCTORANDA: LUISA GUIJARRO HERNÁNDEZ

2015

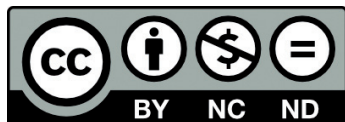


UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Luisa Guijarro Hernández

 <http://orcid.org/0000-0003-0828-7539>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA
DEL EMPLEO DE COLIRIO DE SUERO
AUTÓLOGO Vs HETERÓLOGO
EN SÍNDROME DE OJO SECO**

Doctoranda: Luisa Guijarro Hernández

Málaga, 2015

Directores:

Dr. José Manuel García Campos

Catedrático de Oftalmología de la Universidad de Málaga

Dr. Javier Benítez del Castillo Sánchez

Profesor asociado de Oftalmología de la Universidad de Cádiz



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

A mi madre y Doctora

AGRADECIMIENTOS

A los directores por su esfuerzo en la dirección de este trabajo

Al Servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario de Málaga, por su gran labor en el estudio en especial al Dr Ildefonso Fernández-Baca y a la Dra. Marina Rodríguez Calvo de Mora por su buen hacer en la recogida de datos

Al personal del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Málaga (CRTS) por la elaboración y control de calidad de los colirios.

A mi familia, por su paciencia.

A mi hermana por su trabajo y apoyo.

A todos los que han colaborado en el cuidado de mis niños mientras estaba dedicada a la realización de la tesis.

A la Dra. Hernández por su constancia y por su perseverante ánimo.

ABREVIATURAS

AAII: Anticuerpos Irregulares

AEMPS: Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios

AV: Agudeza visual

BPL: Buenas prácticas de laboratorio

BSS: Suero salino balanceado

BUT: Break-up time (tiempo de ruptura lagrimal)

CALT: conjuntiva-associated lymphoide tissue (tejido linfoide asociado a conjuntiva)

CCLRU: Cornea and Contact Lens Research Unit (Unidad de investigación de córnea y lentes de contacto)

CIC: Citología por impresión conjuntival

CMV: Citomegalovirus

CRTS: Centro Regional de Transfusión Sanguínea

DEWS: Dry Eye WorkShop (taller de ojo seco))

EGF: Epidermal Growth Factor (factor de crecimiento epidérmico)

FGF: Fibroblast Growth Factor (factor de crecimiento fibroblástico)

HGF: Hepatocyte Growth Factor (factor de crecimiento hepático)

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta eficacia)

HTLV-1: Human T-Lymphotropic virus (Virus linfotrófico-Thumanos-1)

IFL: Índice de función lagrimal

LASIK: Laser assisted in situ keratomileusis

LIPCOF: lid-parallel conjunctival folds (Pliegues conjuntivales paralelos)

LWE: Lid Wiper Epitheliopathy (Epiteliopatía del párpado en efecto parabrisas)

MAVC: Mejor agudeza visual corregida

NAT: Nucleid Acid Amplification Technology (tecnología de amplificación de ácidos nucleicos)

NEI: National Eye Institute (Instituto ocular nacional)

NGF: Nerve Growth Factor (factor de crecimiento nervioso)

NIBUT: Non-invasived Break- up time (Tiempo de ruptura lagrimal no invasivo)

OCT: Optical coherence tomography (Tomografía de coherencia óptica)

OPI: Ocular Protection Index (Índice de protección ocular)

PA: Principio Activo

PDGF: Platelet Derived Growth Factor (factor de crecimiento asociado a plaquetas)

RB: Rosa de Bengala

RPR: Reagina plasmática rápida

SOS: Síndrome de Ojo Seco

TEL: Técnico especialista de laboratorio

TGF- α , β : Transforming Growth Factor α , β (factor de crecimiento transformante α , β)

TNF: Tumoral Necrosis Factor (factor de necrosis tumoral)

TSAS: Tear stability analysis system (Sistema de análisis de la estabilidad lagrimal)

VEB: Virus de Epstein Barr

VHB: Virus Hepatitis B

VHC: Virus Hepatitis C

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	1
I.I.- ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR	2
I.II.- PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR.....	3
I.III.- MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	8
IV.- TRATAMIENTO	19
I.IV a) Colirio de suero autólogo y heterólogo	23
I.V.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL	27
II. MATERIAL Y MÉTODO	29
II.I. PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO	30
II.I.a)- ESTUDIO REALIZADO	30
II.I.b)- HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	30
II.I.c) OBJETIVO DEL ESTUDIO.....	30
II.I.d) POBLACIÓN A ESTUDIAR.....	31
II.I.d.1) CRITERIOS DE INCLUSIÓN	31
II.I.d.2) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	31
II.I.e) PROCEDIMIENTO DEL TRABAJO	31
II.II.- PREPARACIÓN DE LOS COLIRIOS.....	38
II.II.a) PRINCIPIO ACTIVO (PA).....	38
II.II.a.1) Información general	38
II.II.a.2) Fabricación.....	38
II.II.a.3) Caracterización	46
II.II.a.4) Control del principio activo	47
II.II.a.5) Estándares o materiales de referencia	49
II.II.a.6) Sistema de cierre y envasado	49
II.II.a.7) Estabilidad	49
II.II.b) PRODUCTO TERMINADO.....	49
II.II.b.1) Descripción y composición del Producto Terminado	49

II.II.b.2) Desarrollo farmacéutico.....	49
II.II.b.3) Fabricación	52
II.II.b.4) Control de excipientes	52
II.II.b.5) Control del producto terminado.....	53
II.III DETECCIÓN DE AGENTES TRANSMISIBLES	55
II.IV. OTRAS DETERMINACIONES	56
-Factores de crecimiento: EGF y TGF- β 1:.....	56
-Vitaminas.....	56
-Proteínas:	56
-Test de inmunohematología: Grupo ABO/ RH y AAI (anticuerpos irregulares)	56
II.V. INSTALACIONES Y EQUIPOS	57
II.VI. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES Y ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	57
II.VI.a) ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA: VARIABLES NUMÉRICAS Y CUALITATIVAS.	57
II.VI.b) INFERENCIA ESTADÍSTICA: VARIABLES CUANTITATIVAS.....	58
II.VI.b.1.Pruebas oftalmológicas realizadas al paciente.....	58
II.VI.b.2. Cuantificaciones analíticas realizadas en los sueros.....	58
II.VII. TRATAMIENTO BIBLIOGRÁFICO	59
III.RESULTADOS	60
III.I. VARIABLES CUALITATIVAS Y EDAD	61
III.I.a) Análisis descriptivo.....	61
III.I.b) Inferencia estadística	62
III.II) VARIABLES CUANTITATIVAS	62
III.II.a) PRUEBAS OFTALMOLÓGICAS REALIZADAS AL PACIENTE.....	62
III.II.a.1) Análisis descriptivo	62
III.II.a.2) Inferencia estadística	65
III.II.b) CUANTIFICACIONES ANALÍTICAS DE LOS SUEROS	78
III.II.b.1) Análisis descriptivo	78
III.II.b.2) Inferencia estadística	80
IV. DISCUSIÓN	85

IV.I EFICACIA DEL TRATAMIENTO	88
IV.II PRUEBAS OBJETIVAS Y SUBJETIVAS.....	88
IV.III DETERMINACIONES ANALÍTICAS.....	89
V.CONCLUSIONES.....	93
VI. ANEXOS	95
VII.BIBLIOGRAFÍA.....	100

I. INTRODUCCIÓN

I.I.- ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR

La superficie ocular comprende la superficie epitelial corneal, el limbo y la conjuntiva. Se trata físicamente de una estructura contigua con los párpados y anejos adyacentes y comparte relaciones importantes con la zona externa del ojo.

La estructura y función normales de un ojo sano se basan en la homeostasis corporal para protegerlo del medio ambiente adverso. La genética y la nutrición determinan la embriogénesis y el crecimiento del ojo y, los sistemas vascular y nervioso intactos garantizan el metabolismo estable, siendo el sistema inmunitario el encargado de mantener la vigilancia.

Los anejos oculares son imprescindibles para lograr un funcionamiento correcto de la superficie y una protección adecuada. Así el reborde orbitario y los párpados actúan de barrera inicial. Las cejas y pestañas recogen las pequeñas partículas, además éstas últimas actúan como sensores estimulando el reflejo de parpadeo, evitando así el contacto con la superficie ocular. La epidermis y el epitelio de los párpados, la conjuntiva y la córnea se adhieren con firmeza a sus membranas basales regulando el crecimiento y metabolismo celular, esencial para preservar una superficie intacta y una córnea transparente. La matriz extracelular subyacente a la de las mucosas es rica en vasos sanguíneos y tejido linfoide asociado a conjuntiva (CALT)

De suma importancia es mantener la calidad de la película lagrimal para conseguir así una adecuada función. En la práctica clínica habitual se solapan alteraciones de los anejos oculares que afectan directamente a la composición de la lágrima, limitando su funcionalidad, como ocurre en la meibomitis, blefaritis anterior, alergia cutánea así como en alteraciones relacionadas con el empleo de lentes de contacto. La patología de la función lagrimal engloba a un grupo de alteraciones que originan la producción de mediadores inflamatorios provocando una alteración central. Para mantener la calidad necesaria de la lágrima y así optimizar sus funciones ópticas y de confort, se considera importante la correcta y mantenida higiene del borde palpebral asociado a masajes. Para ello existen múltiples preparados llegando a ser de utilidad incluso el champú infantil con pH neutro, siempre y cuando se realice de forma constante (Benítez del Castillo JM, 2012)

La película lagrimal diluye las toxinas y alérgenos, contando con proteínas que mantienen la flora normal.

Tseng (Tseng, SC, 1997) en su trabajo de revisión bibliográfica establece cinco postulados esenciales respecto a la superficie ocular:

- 1.-La salud de la superficie ocular está asegurada por una estrecha relación entre la superficie ocular y la película lagrimal.
- 2.-Una película lagrimal estable depende de los anejos externos.
- 3.-El mecanismo de protección de estos anejos es controlado por una integración neuroanatómica eficaz.

4.-Las células madre epiteliales se localizan en el limbo corneal.

5.-Las células epiteliales necesitan el apoyo de los fibroblastos del estroma y de la matriz.

La ausencia de la lágrima tiene un impacto muy elevado en la calidad óptica del ojo humano (Sharma A, 2014) Cualquier cambio local en el espesor y regularidad de la película lagrimal provocará aberraciones en el sistema óptico. Sin embargo, la fuente que las produciría tiene un origen multifactorial, ya que puede provenir de la superficie irregular del epitelio, de uniformidades en el índice de refracción de la lágrima, de la superficie irregular de la misma así como de la deshidratación corneal o bien, una combinación de todos estos efectos.

Las principales funciones de la película lagrimal son proporcionar una superficie óptima lisa en la interfase aire-ojo, actuar como medio para la eliminación de material de desecho, proteger la superficie ocular y aportar al epitelio corneal oxígeno, factores de crecimiento y otros compuestos. Contiene una gran cantidad de agentes antimicrobianos, lubrica la interfase entre la córnea y los párpados y evita la desecación de la superficie ocular.

La lágrima se distribuye entre la banda lagrimal marginal (menisco lagrimal), la película preocular que recubre la conjuntiva bulbar y la córnea (película pre-corneal) y el saco conjuntival. La película lagrimal pre-corneal es una estructura trilaminar formada por una capa lipídica anterior, intermedia acuosa y posterior mucosa, con un espesor total de 5 a 30 micras.

I.II.- PATOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR

La enfermedad de la superficie ocular incluye a un grupo de patologías con diversas etiologías, síntomas y hallazgos clínicos que comparten la producción de reacción inflamatoria y daño de esta superficie. Dentro de ellas, el ojo seco es la patología con mayor prevalencia (datos variables de entre un 10 y hasta un 30%, aunque en estudios con poblaciones controladas se estiman valores de 7,8% en mujeres y 4,3% en hombres, mayores de 50 años (Schaumberg DA, 2009). Otros grupos de trabajo la cifran entre un 10 y un 20% de la población, con mayor porcentaje en mujeres a cualquier edad (90-95%) (Merayo LLores J, 2008) Desde abril de 2007 el grupo de trabajo internacional de ojo seco (DEWS, dry eye workshop) lo define de la siguiente manera: “El ojo seco es una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que provoca síntomas de incomodidad o molestias, alteración de la agudeza visual, e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial a la superficie ocular. Se acompaña de incremento de osmolaridad de la lágrima e inflamación de la superficie ocular”.

Es producido por un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen como punto en común el déficit funcional de la lágrima, ya sea por una disminución de su producción o por una excesiva evaporación, unido a sintomatología de disconfort que

según el grado puede conllevar la limitación de las actividades cotidianas de los pacientes que la padecen (Rodríguez Torres, 2010) (Diagrama 1)

La incidencia de ojo seco se ha incrementado debido al aumento de enfermedades autoinmunes, mujeres postmenopáusicas (por el aumento de la esperanza de vida), el uso de lentes de contacto así como el empleo de antidepressivos (Mrugacs M, 2013). También, puede haber influido en el grado de afectación, los cambios ambientales (Alves M. 2014), (Tesón M, 2015)

El origen multifactorial de la enfermedad, la dificultad del diagnóstico por la mala correlación entre los distintos test y la falta de una definición establecida y aceptada llevó, en 1995, a la creación del “Dry Eye Workshop” DEWS; grupo de expertos que han creado una guía para intentar unificar criterios diagnósticos y terapéuticos respecto al ojo seco.

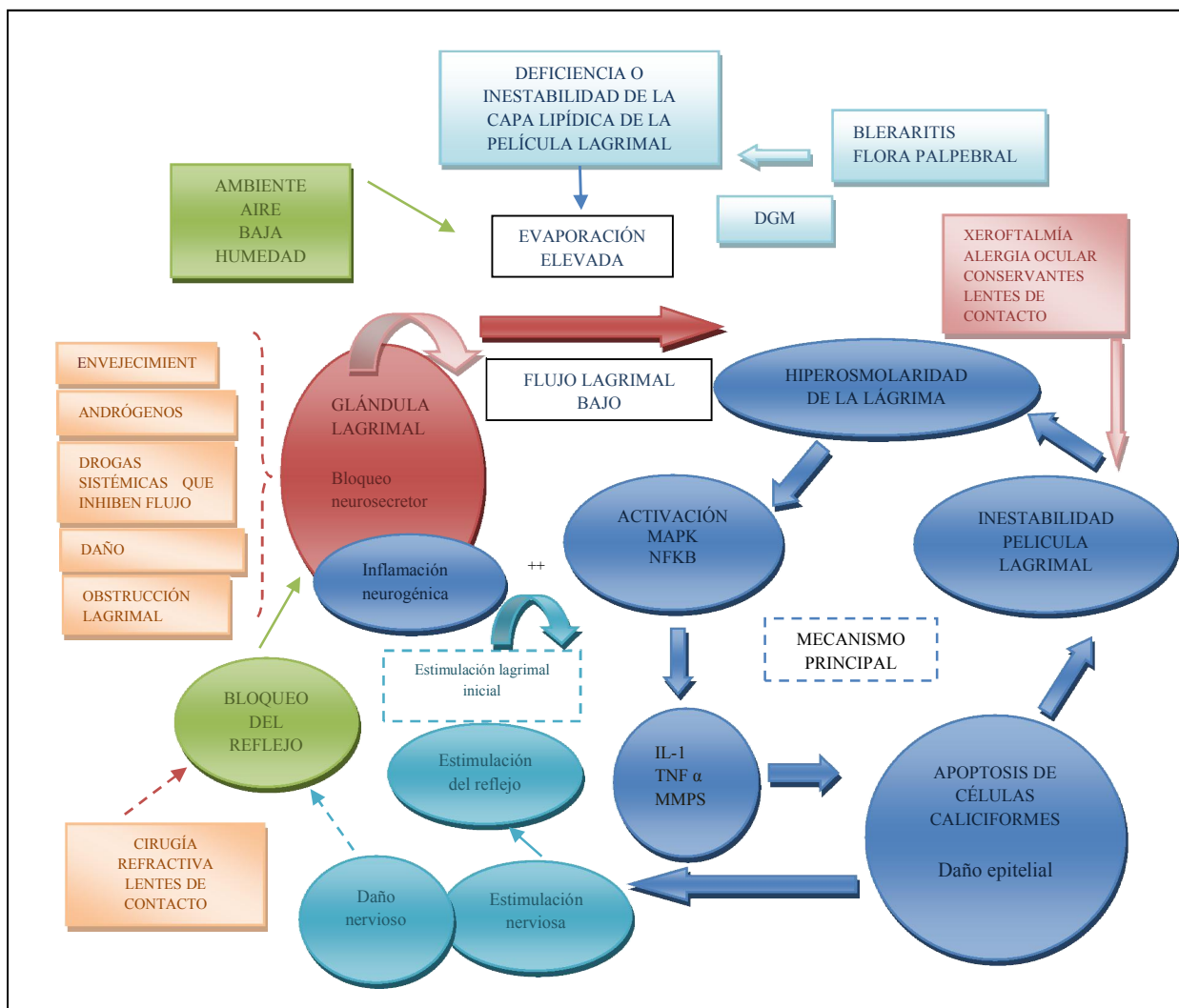


Diagrama 1.- Fisiopatología del ojo seco. Fuente: (DEWS, 2007)

DGM: disfunción de las glándulas de Meibomio

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

NFkB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Los factores de riesgo de ojo seco, según grado de evidencia científica se exponen en la tabla 1.

Consistente	Sugestiva	Incierta
Edad Sexo femenino Antihistamínicos Terapia postmenopáusica Dieta pobre en omega 3 Patología de tejido conectivo LASIK Trasplante células madre hematopoyéticas Radioterapia Déficit vitamina A Deficiencia androgénica VHC	Etnia asiática Fármacos: <ul style="list-style-type: none"> • Antidepresivos, • Beta bloqueantes, • Inhibidores selectivos de serotonina, • Diuréticos • Isotretinoína Diabetes VIH, HTLV-1 Quimioterapia sistémica Extracción extracapsular de catarata Queratoplastia penetrante Ambientes con baja humedad Sarcoidosis Disfunción ovárica	Hábito tabáquico Etnia hispánica Fármacos: <ul style="list-style-type: none"> • Anticolinérgicos • Ansiolíticos • Antipsicóticos • Anticonceptivos orales Alcohol Menopausia Inyección de toxina botulínica Gota Embarazo

Tabla 1.- Factores de riesgo del ojo seco (DEWS, 2007)

Evidencia *consistente*: al menos un estudio bien dirigido o con potencia estadística publicado en una revista de expertos con la existencia de racionalidad biológica plausible o investigación básica corroborada. *Sugestiva*: al menos uno: información no concluyente de publicaciones en revistas de expertos o información no concluyente que apoya la asociación pero no publicada o no en revista de expertos. *Incierta*: cualquier información aportada por expertos o información o concluyente pero con racionalidad biológica

La sintomatología puede verse exacerbada por fármacos sistémicos descritos en la tabla anterior (tabla 1) así como tópicos de instilación crónica (al menos 4 veces al día), condicionantes ambientales tales como baja humedad, viento, aire acondicionado y enfermedades como la rosácea y la obstrucción de las glándulas de Meibomio.

Los pacientes con ojo seco severo padecen un riesgo aumentado de intolerancia a lentes de contacto asociado a complicaciones de las mismas. Deben ser advertidos de que la cirugía refractiva, especialmente LASIK (Laser assisted in Situ Keratomileusis) puede empeorar su condición de ojo seco (Azuma M, 2014), (Shtein RM, 2011), (Muñoz Hernández AM, 2008)

El síndrome del ojo seco presenta varias formas de clasificación. Se exponen a continuación las usadas con mayor frecuencia por los grupos de expertos en el tema:

1.- Atendiendo a la fisiopatología:

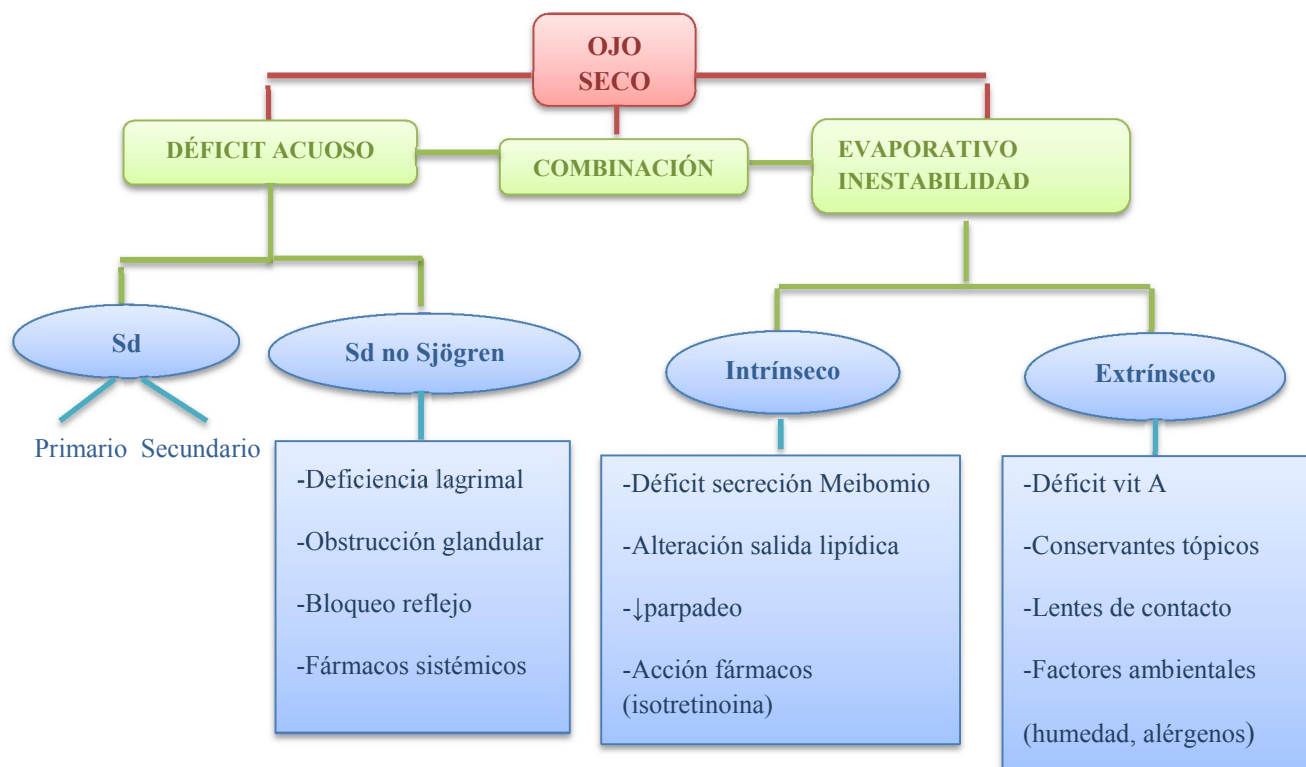


Diagrama 2. Clasificación del ojo seco. Fuente: (DEWS, 2007)

El *Síndrome de Sjögren* se define como el ojo seco y la sequedad de boca asociado con disfunción inmune sistémica. El 10% de los pacientes con ojo seco clínicamente significativa tiene un síndrome Sjögren subyacente. Se produce una infiltración de las glándulas lagrimales y salivales por linfocitos con compromiso secundario de la función lagrimal. Los pacientes con síndrome de Sjögren primario no presentan una enfermedad sistémica definida, aunque se ha descrito su asociación con disfunción de tiroides o tiroiditis autoinmune (Sierra L, 2001)

Los pacientes con síndrome de Sjögren secundario tienen una enfermedad autoinmune distinta, como la artritis reumatoide, esclerodermia o lupus eritematoso sistémico. Más común en mujeres. Se debe sospechar si se detecta una deficiencia intrínseca en la producción de la lágrima en mujeres de mediana edad especialmente si es de aparición brusca y/o severos trastornos linfoproliferativos y/o vasculitis. Los estudios han demostrado que los pacientes con disminución de los niveles en el C4 en el momento del diagnóstico tienen un mayor riesgo de desarrollar linfoma.

Para su diagnóstico se requieren al menos 2 de los 3 criterios siguientes (DEWS, 2007):

La evidencia objetiva de ojos secos (puntuación de tinción de la superficie ocular de 4 o más utilizando verde lisamina para conjuntiva bulbar y, la córnea con fluoresceína

y/o

Suero positivo anti-SSA y / o anti-SSB o positivo factor reumatoide o anticuerpos antinucleares (título > 1: 320)

y/o

Presencia de sialoadenitis linfocítica focales en muestras de biopsia de glándula salival labial

2.- Atendiendo a la combinación de signos y síntomas

Debido a la naturaleza de la enfermedad del ojo seco, se trata de una clasificación imprecisa porque las características de cada nivel pueden solaparse (tabla 2)

NIVEL DE SEVERIDAD DE OJO SECO	1	2	3	4 *
Malestar, severidad y frecuencia	Leve y/o episódico: bajo condicionantes de estrés ambientales	Episódico moderado y/o crónico: con o sin condicionantes de estrés	Grave frecuente o constante sin condicionantes de estrés	Grave y/o incapacitante y constante
Síntomas visuales	Ausentes o episodios leve (cansancio)	Molestia y/o limitación de actividad episódica	Molestia crónica y/o constante con limitación de actividad	Constante y/o probablemente incapacitante
Inyección conjuntival	Ausente o leve	Ausente o leve	+/-	+ / ++
Tinción conjuntival	Ausente o leve	Variable	Moderada/marcada	Marcada
Tinción corneal (Gravedad/ localización)	Ausente o leve	Variable	Marcada/ central	Erosiones puntiformes graves
Signos corneales/lagrimales	Ausente o leve	Suciedad lagrimal leve ↓ menisco	Queratitis filamentosa Acúmulo de mucoso ↑ suciedad lagrimal	Queratitis filamentosa Acúmulo mucoso ↑ suciedad lagrimal Úlceras corneales
Glándulas Meibomio/palpebrales	Presencia variable de disfunción	Presencia variable de disfunción	Frecuente	Triquiasis Queratinización Simbléfaron
BUT (segundos)	Variable	≤ 10	≤ 5	Inmediato
Test de Schirmer (mm/5min)	Variable	≤ 10	≤ 5	≤ 2

Tabla 2 .- Nivel de Severidad del ojo seco

Report of the Definition and Classification of Subcommittee of the International DryEye Workshop. Ocul Surf 2007; 5: 88.

*Requiere signos y síntomas

3.- Atendiendo al nivel de severidad del síndrome de disfunción lagrimal en ausencia de patología del borde libre del párpado (tabla 3)

NIVEL DE SEVERIDAD*	PERFIL DEL PACIENTE
Nivel 1	Ausencia de signos y síntomas leves/ moderados Signos conjuntivales leves/moderados
Nivel 2	Síntomas moderados/graves Signos de alteración de película lagrimal Tinción corneal punctata leve Tinción conjuntival Síntomas visuales
Nivel 3	Síntomas graves Tinción corneal punctata marcada Tinción corneal central Queratitis filamentosa
Nivel 4	Síntomas graves Tinción corneal severa/erosiones Cicatrización conjuntival

Tabla 3.- Nivel de severidad de la disfunción lagrimal

Behrens A, Doyle JJ, Sterm L, et al. Dysfunctional Tear Syndrome Study Group. Dysfunctional Tear Syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea* 2006; 25(8):900-7

*Al menos un signo y un síntoma de cada categoría deben estar presentes para la asignación en el nivel correspondiente

I.III.- MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico clínico es variable y depende del grado de afectación. No existe un test único para el correcto diagnóstico. Una combinación de todos ellos nos permite comprender la clínica de los pacientes. Los estudios conjuntivales son útiles aunque están aún infrautilizados.

a) Test de Schirmer:

Fue un perfeccionamiento de la prueba de Köster (1900) que consistía en colocar una tira de papel de 10x10-20 mm en el saco conjuntival y, a continuación irritar la mucosa nasal de ambos lados con un pincel y medir el número de cuadrados o rectángulos del papel humedecidos. Schirmer (1903) la modificó, utilizando tiras de papel de filtro N°41 de 40mm de longitud y 5mm de ancho. Los últimos 5 mm se pliegan sobre el resto de la tira y las dos esquinas distales de este doblez se cortan a bisel para evitar que irriten la conjuntiva. Esta parte doblada de la tira se coloca dentro de la cuenca lacrimal, entre la mitad externa del párpado inferior y la conjuntiva bulbar, mientras que el resto de la tira queda colgando hacia abajo por delante del párpado. De esta forma se establecieron tres métodos para cuantificar la secreción lagrimal. Se trata de una prueba con resultados variables y no se considera como único test diagnóstico (DryEye Workshop, 2013)

- *Test de Schirmer I*: permite estudiar la secreción lagrimal total, es decir que valora la suma de la secreción basal más la secreción refleja. Se debe indicar al paciente:

- La forma de realizar la prueba para que permanezca tranquilo durante la aplicación del test, no se debe instilar ningún colirio antes del examen, evitar iluminaciones excesivas antes y durante la prueba y debe estar cómodamente sentado.
- Se hace mirar al paciente hacia arriba y se colocan en el párpado inferior externo de ambos ojos, con los ojos cerrados y se mide tras 5 minutos.
- Se consideran valores normales cuando la zona húmeda supera los 10 mm de longitud. Menos de 5 mm indica hiposecreción lagrimal.
- Los resultados de la prueba se expresan en el número graduaciones que tiene el papel filtro en el tiempo. (Adler, M. 1988)

- *Test de Schirmer basal*: Mide la secreción basal producida por las glándulas lagrimales accesorias de Krause y Wolfring situadas en la conjuntiva. Se realiza después de unos minutos tras la instilación de anestésico tópico para inhibir la secreción refleja producida por la glándula lagrimal principal. El método y los materiales son iguales que en el Schirmer I. Se consideran valores normales cuando la zona húmeda supera los 10 mm de longitud. Menos de 5mm indica hiposecreción lagrimal. Entre 5 y 10 mm no es diagnóstico.

- *Test de Schirmer II*: Mide la secreción refleja permitiendo diferenciar entre entidades no-Sjögren del síndrome de Sjögren. Se realiza tras la instilación de anestésico tópico ocular y la estimulación nasal. La medición de la tira de papel colocada en el ojo se deberá realizar a los 2 minutos. Este se evalúa después de retirar la prueba de Schirmer realizada 30 minutos después de realizar la prueba basal. La mucosa nasal es estimulada con un bastoncillo de algodón seco durante 10 a 15 segundos, del mismo lado del ojo con el valor de la prueba de Schirmer más bajo. Luego se coloca una tira de Schirmer durante un minuto. Un valor mayor a 1 mm que la prueba realizada a los 30 minutos, es considerado positivo para la prueba de secreción refleja. Este reflejo es significativamente menor en pacientes con deficiencia acuosa de la lágrima asociada a síndrome de Sjögren.

b) Tiempo de ruptura lagrimal (break-up time: BUT):

Consiste en instilar fluoresceína en la superficie ocular para visualizar la película lagrimal y medir el tiempo que tarda en evidenciarse áreas secas tras el último parpadeo (Norm MS, 1969). Si la ruptura se produce de forma repetida en una misma área puede indicar la existencia de alguna anomalía corneal sectorial. El estudio se realiza con la lámpara de hendidura y empleando el filtro azul cobalto. El gran inconveniente es que la propia instilación de la fluoresceína provoca inestabilidad de la película lagrimal; lo que ha llevado a algunos autores a determinar una cantidad concreta de la misma para obtener valores reproducibles (Elliot M, 1998). No deben ser empleados colirios anestésicos ya que pueden alterar los resultados (DryEye Workshop, 2013). Se consideran

valores normales de BUT los superiores a 10 segundos consiguiéndose una sensibilidad de 77,8% pero una baja especificidad (38,9%) (Vitali C, 1994).

El parpadeo ayuda a regular la integridad de la película lagrimal. A partir de los valores de BUT y la frecuencia de parpadeo se define el Índice de Protección Ocular (OPI) que, relaciona el BUT con el intervalo de parpadeo. La superficie ocular se encuentra protegida cuando el BUT es mayor que el intervalo de parpadeo, pudiendo haber problemas si el BUT es menor.

El Tiempo de Ruptura Lagrimal No Invasiva (NIBUT) para evitar los problemas derivados de la instilación de fluoresceína consiste en proyectar una imagen en la superficie de la córnea y medir el tiempo que tarda ésta en deformarse desde el último parpadeo, utilizando diferentes instrumentos o miras proyectadas (Mengher LS, 1985). Los valores de corte oscilan entre 10 y 15 segundos, alcanzando una sensibilidad del 82% y una especificidad del 86% para el diagnóstico de ojo seco cuando se emplea el corte en 10 segundos. Algunos autores (Wang HF et al, 2005) describen aumento de la sensibilidad y especificidad del 95,9 y 90,8 % respectivamente, cuando el corte se establece en 5 segundos. Aunque se considera más fiable al NIBUT, el BUT es el único método diagnóstico propuesto para determinar si un problema visual está relacionado o no con la película lagrimal.

Para el estudio de la estabilidad de la película lagrimal existe un software aplicado a la topografía corneal denominado TSAS (Tear Stability Analysis System); en el que se adquieren imágenes videoqueratoscópicas secuenciales durante 10 segundos y posteriormente se analizan para determinar el NIBUT. Se consigue una sensibilidad del 97,5 con una especificidad similar al BUT (Pinto Fraga FJ, 2011)

c) Tinciones:

-La *fluoresceína sódica* es el colorante de primera elección. Es un colorante hidrosoluble que tiñe los espacios intercelulares y permite detectar defectos epiteliales. La tinción se realiza instilando 2 o 3µL de fluoresceína al 1 o 2% en el saco conjuntival, o con tiras impregnadas del colorante que se aplican en la conjuntiva bulbar para mejorar la visibilidad y maximizar la absorción de fluoresceína. La exploración se debe realizar 2 minutos después de la instilación, con la lámpara de hendidura y el filtro de luz azul cobalto (más intensa con filtro amarillo). La ausencia de tinción indica la integridad del epitelio corneal. La tinción leve puede ser observada en ojos normales y, más prominente por la mañana. Una zona de exposición puntiforme o tinción en parches son observadas en síndrome de ojo seco; visualizándose de forma más clara en córnea que en conjuntiva (Dry Eye Workshop, 2013)

-El *Rosa de Bengala (RB)* es un derivado de la fluoresceína que tiñe filamentos mucosos y células muertas y degeneradas de conjuntiva y córnea. Se utiliza con una concentración del 1 % o menor, ya que es citotóxica y produce irritación. La técnica consiste en la aplicación de 2 a 5 µL de RB (se puede instilar anestésico para evitar la irritación ocular), manteniendo el contacto al menos un minuto para lograr la concentración adecuada. A continuación se examina con lámpara de hendidura

mediante la ayuda del filtro verde. Según el criterio de Van Bijsterveld, la zona expuesta de la superficie ocular se divide en tres sectores (conjuntiva nasal, conjuntiva temporal y córnea), graduando la tinción de cada uno de ellos de 0 a 3. Sumando estos tres valores obtenemos una puntuación que, de ser superior a 3, determinaría la presencia de síndrome de ojo seco. La tinción es más intensa en conjuntiva que en córnea) La sensibilidad del RB es baja, tan solo de un 25%, debido al enmascaramiento de la tinción por parte de la pigmentación e inyección conjuntival que provoca. La especificidad de este test es de un 90%.

- *El Verde de Lisamina* es otro colorante vital. Se utiliza al 1% y tiñe la mucina y las células epiteliales degeneradas. El patrón de tinción es similar al RB pero tiene como ventaja que no produce molestias ni irritación tras su instilación, permitiendo un mayor contraste. No se recomienda para la evaluación de la enfermedad del epitelio corneal.

Existen diferentes formas de graduar las tinciones. Las más utilizadas en clínica son la escala de Van Bijsterveld (Van Bijsterveld, 1969), el sistema Oxford (Bron A.J., 2003), la versión estandarizada del NEI (National Institute) /Industry Workshop (Lemp MA, 1995) y las escalas del CCLRU (Cornea and Contact Lens Research Unit) (Terry RL, 1993) y de Efron (Efron N, 2004). En la práctica clínica, es conveniente conservar una única escala de graduación para el seguimiento clínico del paciente, puesto que no pueden utilizarse de forma intercambiable (Wolffsohn JS, 2004) Una tinción difusa corneoconjuntival se observa en la queratoconjuntivitis viral y medicamentosa. Cuando la tinción afecta a la córnea y conjuntiva bulbar inferior suele asociarse a blefaritis estafilocócica, disfunción de glándulas de Meibomio, lagofthalmos y la exposición; mientras que en conjuntiva bulbar superior es frecuente en queratoconjuntivitis límbica superior. Un patrón de exposición corneal y conjuntival bulbar (interpálpebral) se observa en el déficit del componente acuoso de la lágrima (DryEye Workshop, 2013)

d) Osmolaridad:

Cantidad de solutos disueltos por volumen de muestra. Es un indicador indirecto de la dinámica de la lágrima. Si se produce una elevada evaporación de la lágrima o una baja secreción de ésta, se encontrarán valores de osmolaridad elevados, puesto que al haber menos disolvente la concentración de solutos aumentará. Por otro lado, la osmolaridad disminuirá si hay una elevada secreción de lágrima o una disminución en el drenaje de la misma. De esta manera, se puede ver que la osmolaridad de la película lagrimal está en función de la secreción, drenaje, absorción y evaporación lagrimal. Las técnicas iniciales requerían tomar grandes volúmenes de lágrima, estableciendo un largo contacto con el globo ocular y estimulando la secreción lagrimal. Además, el equipamiento era caro y acarrea problemas de calibración, mantenimiento y consumo de tiempo. Sin embargo, se han desarrollado técnicas que reducen el volumen de muestra necesario al orden de los nanolitros y el tiempo de procesado de la muestra. La osmolaridad lagrimal puede ser determinada mediante:

- Osmometría por presión de vapor: se coloca un disco de acetato de celulosa en la superficie ocular dejando que se impregne de lágrima. Posteriormente es insertado en

una cámara que enfría la muestra, condensando el vapor hasta que la temperatura se estabiliza en el punto de rocío, valor relacionado con la osmolaridad de la lágrima.

- Determinación del punto de congelación: se recoge una muestra de lágrima con un microcapilar enfriándola para determinar su punto de congelación, propiedad también relacionada con el valor de la osmolaridad lagrimal.

- Medida de la conductividad de la lágrima: sistema utilizado por el osmómetro TearLab[®], el cual recoge automáticamente una pequeña muestra de lágrima del menisco inferior con un microcapilar que va unido a un chip y analiza la osmolaridad directamente mediante la medida de la impedancia de la muestra. El valor normal de la osmolaridad lagrimal está comprendido entre 300 y 310 mOsm/L. Valores superiores a 312 mOsm/L son compatibles con el diagnóstico de síndrome de ojo seco, aunque un meta-análisis realizado en 2008 establece como punto de corte entre sujetos sanos y sujetos con SOS una osmolaridad de 315,6 mOsm/L, valor que coincide con otro estudio realizado (Tomlinson A, 2006). Utilizando 312 mOsm/L como valor de corte, varios autores obtienen sensibilidades y especificidades diferentes, debido a que las características de los distintos grupos estudiados no son las mismas (Gilbard JP, 1978), (Farris RL, 1994), (Tomlinson A, 2006)

Una revisión actual de la literatura demuestra resultados contradictorios. Existen una serie de estudios publicados por investigadores independientes que sugieren que la osmolaridad muestra una intensa correlación con la gravedad de la enfermedad en una sola medida y es útil para predecir la respuesta a las intervenciones terapéuticas (Tomlinson A, 2006), (Versura P, 2010), (Lemp MA, 2011), (Jacobi C, 2011), (Sce CW, 2013); mientras que otros cuestionan su utilidad por su falta de correlación con los síntomas y signos objetivos de ojo seco (Messmer EM, 2010), (Bunya VY, 2013)

e) *Test de Ferning*

Se basa en la capacidad que tiene la fracción mucínica de la película lagrimal para cristalizar con aspecto arborizado o de helecho cuando se deja secar al aire. Algunos autores asociaron la falta de cristalización a enfermedades de la superficie ocular que cursaban con una disminución del número de células caliciformes (Tabbara KF, 1982). Sin embargo, fue Rolando quien identificó y catalogó los distintos patrones en cuatro categorías, dependiendo del tipo de arborización observada (tipos I-IV). (Figura 1) Los patrones tipo I y II se consideran normales y los tipo III y IV son indicativos de síndrome de ojo seco (Rolando M, 1984). La técnica consiste en recoger 1 μ L de lágrima del menisco inferior con un microcapilar, dejándolo secar al aire en un portaobjetos durante 10 minutos. La observación de la muestra se realiza con un microscopio óptico de entre 100 y 400 aumentos. Realizando la clasificación de los patrones según el criterio de Rolando, este test muestra un 82,2% de sensibilidad y un 92,5% de especificidad, aunque hay publicaciones que le otorgan valores diferentes (sensibilidad 94%, especificidad 75%) (Norm M, 1994) Además, sus niveles de reproducibilidad son altos, por lo que es un buen método de clasificación.

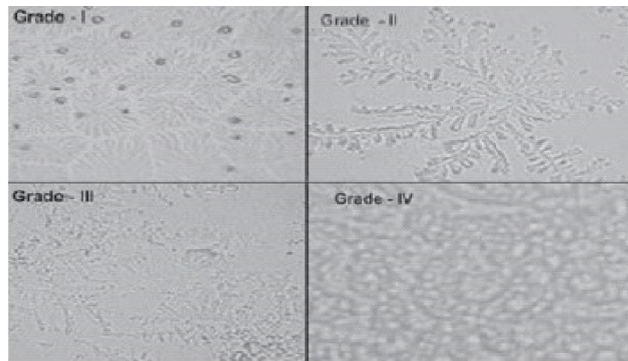


Fig. 1. Ferning patterns according to Rolando's classification scheme (light microscopy x 40).

f) Hilo de rojo de fenol

Consiste en un hilo de algodón de 70 mm de longitud impregnado con rojo de fenol. Se deposita en el tercio externo del párpado inferior, dejando que el hilo absorba la lágrima, y se retira a los 15 segundos (Kurihashi K, 1975), (Hamano H, 1983). El rojo de fenol, al ser un indicador de pH, vira de color amarillo a rojo al contacto con la lágrima, de forma que la longitud del hilo impregnado de lágrima se puede medir fácilmente. Es un método poco invasivo y se cree que estimula mínimamente la secreción refleja (Tomlinson, 2001). Esta prueba presenta un 56% de sensibilidad y un 69% de especificidad como método diagnóstico de Síndrome de Ojo Seco (SOS), con un punto de corte de 12 mm a los 15 segundos (Labetoulle M, 2002). Cuando este test se utiliza para discriminar SOS acuodeficientes de los que no lo son, su sensibilidad y especificidad aumentan hasta un 86 y un 83%, respectivamente, tomando como punto de corte 20 mm a los 120 segundos (Patel S, 1998)

g) Fluorofotometría

Es una técnica que permite determinar la tasa de eliminación de la lágrima. Consiste en instilar 1 μ L de fluoresceína sódica al 2% en la conjuntiva bulbar inferior y realizar medidas de la fluorescencia en esta zona cada 2 minutos, durante 30 minutos. (Maurice DM, 1963), (Mishima S, 1966). Dicha medida se puede realizar con una lámpara de hendidura modificada y, a través de la gráfica resultante de los datos obtenidos, se puede calcular fácilmente el porcentaje de eliminación de la lágrima y el flujo lagrimal (Fahim MM, 2006) Sin embargo, actualmente existen equipos comerciales que han ayudado a la estandarización de esta prueba. (Fahim MM, 2006) El valor medio para sujetos sanos es de $15,24 \pm 5,66\%/min$, mientras que el valor de corte es $<12\%/min$. Con este valor de corte, la prueba presenta el 72% de especificidad y el 80% de sensibilidad (Khanal S, 2008)

h) Test de aclaramiento lagrimal

Es una variante clínica de la fluorofotometría. Fue descrito por Xu y Tsubota en 1995 y consiste en instilar en el saco conjuntival 10 μ L de fluoresceína sódica al 0,5% y oxibuprocaina (colirio anestésico) al 0,4%. El sujeto permanece durante 5 minutos con los ojos abiertos, parpadeando con normalidad, tras los cuales se coloca una tira del test de Schirmer durante otros 5 minutos con los ojos cerrados. Se mide la longitud de la

porción humedecida de la tira y la intensidad del color, y se compara ésta con una escala de color estandarizada con diferentes diluciones de fluoresceína (Vico E, 2004) Cada grado de color indica un 3,6%/min de variación en el porcentaje de eliminación lagrimal y un cambio en el flujo lagrimal de 0,38 $\mu\text{L}/\text{min}$ (Xu KP, 1995) Utilizando esta técnica con un punto de corte entre 1/16 y 1/32 en las diluciones de las tiras, se logra un 83% de sensibilidad y un 40% de especificidad (Vico E, 2004) Además, este test ha demostrado una buena correlación con los valores obtenidos mediante fluorofotometría (Xu KP, 1995) Otra variante del test de aclaramiento lagrimal consiste en la instilación de 5 μL de fluoresceína sódica al 2% (Alfonso AA, 1999). Pasados 15 minutos, se recoge una muestra de lágrima del menisco inferior y se analiza posteriormente con un fluorofotómetro. Un trabajo posterior describe un sistema similar de evaluación comparando visualmente la intensidad de fluorescencia del menisco lagrimal con una escala estandarizada (Macri A, 2000) Según este trabajo, el test de aclaramiento tiene un 67% de sensibilidad para el diagnóstico de disfunciones de las glándulas de Meibomio y de un 97% para el SOS acuodeficiente, con un 97% de especificidad. La elevada sensibilidad y especificidad del test de aclaramiento lagrimal, independientemente del método utilizado para su realización, sugiere que es una técnica importante en el diagnóstico del SOS, aunque no es un test que se realice habitualmente en la clínica.

Una aplicación indirecta del test de aclaramiento lagrimal es su utilización para el cálculo del Índice de Función Lagrimal (IFL), cuyo objetivo es mejorar la sensibilidad y especificidad que presentan el test de Schirmer y el test de aclaramiento lagrimal por separado para el diagnóstico de SOS. Se calcula como el cociente de los resultados obtenidos con estas dos pruebas diagnósticas por separado.

$$\text{IFL} = \text{Schirmer (mm)} / \text{Aclaramiento (\%/min)}$$

Se ha establecido un valor de 74 ($\text{mm} \cdot \text{min}/\%$) como punto de corte discriminativo de SOS, obteniéndose un 74% de sensibilidad (Vico E, 2004)

i) Determinación de la concentración de proteínas lagrimales:

Las proteínas son uno de los componentes principales de la película lagrimal, habiéndose detectado cerca de 400 tipos diferentes, aunque sólo algunas de ellas se encuentran en cantidades elevadas. Las proteínas más abundantes en la película lagrimal son la lisozima, la lactoferrina, la lipocalina y la IgA secretora. Algunas de ellas se utilizan como biomarcadores y, observando sus niveles de concentración, pueden ser usadas como método diagnóstico de síndrome de ojo seco.

La lisozima es una de las principales proteínas de la película lagrimal con propiedades antibacterianas, y representa entre el 20 y el 40% del total de las proteínas en lágrima. Los niveles normales de lisozima están comprendidos entre 0,6 y 2,6 mg/mL. Estos niveles disminuyen con la edad y en pacientes con la patología. La cuantificación de lisozima en lágrima se puede realizar mediante diversas técnicas de laboratorio como Western Blot, espectrofotometría o inmunodifusión radial. Pero, por su simplicidad y rapidez, la más común en el diagnóstico clínico es por inhibición de cultivos de *Micrococcus Lysodeikticus* en placa agar. La técnica consiste en colocar un disco de papel absorbente en el fondo de saco del ojo para que se impregne de lágrima. Se deposita posteriormente en una placa de agar con cultivo de *Micrococcus*

Lysodeikticus. El halo de lisis a las 24 h mide la actividad de la lisozima. Según el criterio de Van Bijsterveld (Van Bijsterveeld, 1973), valores del halo por debajo de 21,5 mm se corresponden con síndrome de ojo seco. Utilizando como punto de corte una concentración de lisozima de 1,5 mg/mL, este método diagnóstico tiene una especificidad del 85% y un 83% de sensibilidad.

La lactoferrina (Masson PL, 1966) tiene propiedades antibacterianas y anti-inflamatorias. Constituye en promedio el 25% del total de las proteínas en lágrima, siendo su concentración media de 2,2 mg/mL. La disminución de los niveles de lactoferrina se asocia a una disminución de la producción de la glándula lagrimal principal. La cuantificación de la lactoferrina se puede hacer por inmunoensayo ELISA o electroforesis, aunque la más utilizada es la inmunodifusión radial. Para realizar esta técnica se coloca un disco de papel de 4 mm en el fórnix inferior del paciente, dejándolo humedecer con lágrima. Al retirarlo, se deposita sobre un Lactoplate de gel de agarosa con anticuerpos anti-lactoferrina. El diámetro de precipitación antígeno-anticuerpo indica la cantidad de lactoferrina. En pacientes con sequedad, el diámetro de precipitación es la mitad del valor obtenido en pacientes sanos. Según la clasificación de Murube y Cortés, valores hasta 1,5 mg/mL están relacionados con estadios leves de la enfermedad, valores hasta 1 mg/mL indican medios y valores inferiores a 0,5 mg/mL se corresponden con una patología severa (Murube del Castillo J, 1989)

j) *Determinación de citoquinas en la película lagrimal:*

Las citoquinas son un grupo de proteínas que actúan mediando interacciones complejas entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas, por lo que su acción resulta esencial en la respuesta inmune, en la hematopoyesis de distintos tipos celulares y en la inflamación. En la película lagrimal existe una concentración basal de estos mediadores pro-inflamatorios secretados por los epitelios corneal y conjuntival. (Nakamura, 1998) Sin embargo, estos niveles basales aparecen alterados en diversas patologías de la superficie ocular. En particular, en pacientes con Síndrome de ojo seco se ha constatado un aumento en la concentración de 8 citoquinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1beta) tanto en el epitelio conjuntival como en la película lagrimal. (Massingale ML, 2009) Este aumento del nivel de citoquinas está relacionado con la severidad del cuadro clínico, encontrándose alteraciones no sólo en casos severos sino también en manifestaciones más moderadas de la patología (Enriquez de Samanca, 2010) La determinación de citoquinas se realiza mediante el análisis de una muestra lagrimal, cuyo tamaño puede variar entre 7 y 30 µL, recogida del menisco inferior del sujeto con un microcapilar. Esta muestra se analiza mediante inmunoensayo con ELISA clásico o “immunobeads” en plataforma múltiple Luminex que permite realizar hasta 100 combinaciones de antígenos en una sola suspensión y en el mismo ensayo de forma semiautomática (Fulton, 1997)

k) *La citología por impresión conjuntival (CIC):*

Escrita simultáneamente por dos grupos investigadores en 1977.(Egbert PR), (Thatcher RW) Es una técnica mínimamente invasiva que permite la recolección de las capas más superficiales del epitelio de la superficie ocular y su análisis mediante

distintas técnicas, como pueden ser análisis histológicos o inmunohistológicos, así como análisis moleculares. La CIC se puede aplicar tanto en la conjuntiva bulbar o palpebral, como en córnea y limbo. Durante la pasada década ha sido utilizada para la comprensión y mejora del conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades de la superficie ocular, así como para suministrar valores de biomarcadores que posteriormente sean utilizados como criterios de corte en la práctica clínica, encontrándose su mayor campo de aplicación en la patología del SOS. Las técnicas de recogida de muestras son variadas, con filtros sintéticos o de acetato de celulosa, que se sitúan sobre la conjuntiva o la córnea presionando ligeramente entre 3 y 5 segundos. Posteriormente, estas muestras son teñidas mediante técnicas inmunohistoquímica y se observan mediante microscopía óptica; aunque existen otros métodos de procesado y observación, como son la microscopía electrónica de barrido o de transmisión, o la inmunocitoquímica. En pacientes con SOS uno de los hallazgos más importantes que se puede encontrar es la metaplasia escamosa, que es un proceso continuo de cambios en el que se observa un decrecimiento súbito y posterior desaparición de las células caliciformes, así como un incremento de la estratificación y queratinización de las células no caliciformes. Además, las células epiteliales pasan de tener una relación núcleo/citoplasma de 1:1 a ovalarse más, pasando esta relación a ratios 1:8. Actualmente, una prioridad es la mejora del sistema de recogida de muestras y la combinación con otras técnicas, como la microscopía confocal, para el diagnóstico y monitorización de enfermedades de la superficie ocular.

l) Meibometría (Chew CK, 1993):

Es una técnica cuantitativa y no invasiva que determina la cantidad de lípidos presentes en el borde palpebral. La técnica consiste en una tira de plástico en forma de lazo que se presiona sobre el margen del párpado inferior. Posteriormente, los lípidos impregnados en la tira son analizados en un fotómetro. El valor medio en sujetos normales es de $0,04 \pm 0,015 \mu\text{L}$ (Versura P, 2010). Se usa para el diagnóstico tanto de problemas asociados al Síndrome de ojo seco evaporativo (el volumen de la capa lipídica obtenido por meibometría está aumentado), como para acuodeficiente (el volumen de la capa lipídica estará disminuido por la disfunción de las glándulas de Meibomio).

m) Meibografía (Tapie R, 1977)

Es una prueba que permite el estudio in vivo de la estructura de las glándulas de Meibomio. Se evierte el párpado y, con la ayuda de un transiluminador, se puede ver la estructura de las glándulas a través de la piel. Posteriormente (Mathers WD, 1994), con un sistema de captura de imágenes (cámara fotográfica o de vídeo), se evalúa la estructura de las glándulas, haciendo una clasificación en grado 0 (glándulas intactas), grado 1 (destrucción de las glándulas de Meibomio en menos de la mitad del tarso inferior) o grado 2 (destrucción en más de la mitad del tarso inferior). Las disfunciones o daños en estas glándulas están asociadas a síndrome Sjögren.

Recientemente se ha descrito una técnica que permite la meibografía sin contacto, no siendo necesario el uso del transiluminador (Arita R, 2008)

n) Epiteliopatía del párpado en efecto parabrasas (Lid Wiper Epitheliopathy)

Los sujetos con SOS tienen una película lagrimal más delgada de lo habitual. Este adelgazamiento hace que el borde palpebral y la superficie corneal puedan entrar en contacto durante el parpadeo. Por este motivo se produce fricción entre estas dos zonas, lo cual provoca un defecto epitelial en el margen palpebral superior. Esta alteración es clínicamente observable y puede ser utilizada como método diagnóstico. Su graduación se realiza conforme a los criterios expuestos en la tabla 4 (Korb DR, 2005)

Longitud horizontal (mm)	Anchura sagital (% respecto al párpado)	Grado LWE
<2	<25% de la anchura de la lesión	0
2-4	25% - 50%	1
5-9	50% - 75%	2
>9	>75%	3

Tabla 4.-Graduación LWE (Lid Wiper Epitheliopathy) (Korb DR, 2005)

o) Microscopía confocal:

Técnica desarrollada en la década de los 50 y publicada en los 80's (Minsky M, 1988) llevándose a la práctica en 1990 (Cavanagh HD, 1990) con la obtención de imágenes in vivo de la córnea humana. La técnica confocal en microscopía permite la eliminación de la luz que se encuentra fuera de foco con dos agujeros estenopeicos conjugados. Esta conjugación hace que no se pueda tomar una única imagen completa de la córnea, sino que se realizan movimientos del sistema iluminador y del detector, que van captando imágenes coroneales para obtener una imagen final a tiempo real. La microscopía confocal tiene diversas aplicaciones clínicas, utilizándose también en el estudio y diagnóstico del SOS. Esta técnica permite la determinación de la densidad de células epiteliales superficiales e intermedias, determinación de alteraciones de la inervación corneal (Benítez del Castillo J, 2004), así como la densidad de células caliciformes conjuntivales (Hong J, 2010) y el estudio de las glándulas de Meibomio (Ibrahim OM, 2010)

p) Pliegues conjuntivales paralelos (LIPCOF):

En 1942, Hughes describe por primera vez la conjuntivochalasis, haciendo referencia a la aparición de pliegues en la conjuntiva debidos a la relajación de la misma por un cambio senil en las fibras elásticas subconjuntivales. La relación entre conjuntivochalasis y el SOS fue postulada por primera vez en 1990 por Rieger, y estudiada con más profundidad en 1995 por Hüh. Clínicamente, esta patología se manifiesta como la aparición de unos pliegues en el cuadrante inferior, tanto nasal como temporal, de la conjuntiva bulbar. Estos pliegues serán paralelos al borde palpebral inferior y son fácilmente visibles durante un examen ocular con lámpara de hendidura. Además, su posición puede ser indicativa del grado de severidad del SOS. Actualmente, se está utilizando la tecnología del OCT (tomografía por coherencia óptica) para la evaluación y clasificación del LIPCOF, obteniéndose mayor resolución en las imágenes, así como una buena correlación con las medidas realizadas con lámpara de hendidura.

La escala utilizada sumando los pliegues presentes en la zona nasal y en la zona temporal (de 0 a 3 en cada una), se obtiene el valor total de LIPCOF. En un estudio realizado, el porcentaje de sujetos sintomáticos que presentaron una suma de LIPCOF mayor o igual a 2 fue de 79,8%, mientras que aquellos sujetos que no presentaron sintomatología y la suma de LIPCOF estaba por debajo de 2 representaban el 86.5%. (Pult H, 2000) (tabla 5)

Observación clínica	Grado LIPCOF
Ausencia de pliegues en la conjuntiva.	0
Presencia de micropliegues discontinuos en una línea.	
Presencia de un pliegue claro y permanente.	1
Presencia de un pliegue claro por debajo de 1 micropliegues discontinuos.	
Presencia de dos pliegues claros y permanentes hasta una altura de 0,2 mm	2
Presencia de dos pliegues por debajo de micropliegues discontinuos hasta una altura de 0,2 mm.	
Presencia de más de dos pliegues con una altura mayor de 0,2 mm.	3

Tabla 5.-Grado LIPCOF (Pult H, 2000)

IV.- TRATAMIENTO

Atendiendo a los grados de severidad se proponen unas directrices de tratamiento que se resumen en la tabla 6 todas ellas recomendaciones del grupo “International Eye Dry Workshop”

Severidad del Síndrome de ojo seco	Recomendaciones terapéuticas
LEVE	<ul style="list-style-type: none"> •Educación y modificaciones ambientales •Eliminación de medicación tópica o sistémica agravantes •Mejora acuosa utilizando sustitutos lagrimales, geles / ungüentos artificiales •Terapia de párpados (compresas calientes y limpieza palpebral) •Tratamiento factores desencadenantes/agravantes oculares, como la blefaritis o meibomitis. •Corrección quirúrgica de anomalías del párpado
MODERADO	<p><i>Además de los tratamientos anteriores:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Agentes anti-inflamatorios (corticoesteroides/ ciclosporina (0,05%) tópicos) •Suplementos orales de ácidos grasos omega-3 •Tapones lagrimales •Dispositivos de protección lateral de gafas y cámaras de humedad
GRAVE	<p><i>Además de los tratamientos anteriores:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> •Agonistas colinérgicos sistémicos •Agentes anti-inflamatorios sistémicos •Agentes mucolíticos (acetilcisteína al 10%) •Colirio de Suero autólogo •Lentes de contacto •Oclusión punto lagrimal permanente •Tarsorrafia

Tabla 6.- Directrices de tratamiento

Al ser el ojo seco un problema crónico y multifactorial, se debe preparar un plan de manejo a largo plazo múltiple y prolongado que abarque estrategias medioambientales para eliminar los agravantes, apoyar la unidad funcional lagrimal evitando los factores intrínsecos, estabilizar, hidratar y lubricar la superficie ocular, estimulación con secretagogos, el tratamiento antiinflamatorio, los substitutos biológicos, ácidos grasos esenciales, el tratamiento quirúrgico, las lentes de contacto esclerales y las gafas especiales que hacen de cámara de hidratación. Todos los factores que incrementan la evaporación como la exposición al viento sin gafas de sol, ambientes con humedad baja por la acción de los aires acondicionados deben ser evitados para poder evitar que la patología de superficie ocular sea sintomática. Los factores de riesgo y fármacos influyentes deben ser tenidos en cuenta (tabla 1). Cabe destacar la prevención de la inflamación y alergia ocular, ya que los alérgenos y agentes tóxicos llegan a la superficie epitelial al no ser arrastrados hacia el exterior debido a la ausencia de lágrima. Es importante un buen diagnóstico etiológico y tratamiento especializado personalizado. En resumen, las bases del tratamiento comienzan con la educación al paciente haciendo especial énfasis en tener un ambiente con una humedad relativa adecuada, ausencia de tóxicos (humo del tabaco, disolventes o motores) y que recuerde la acción de parpadear.

La pilocarpina oral, que está indicada para el tratamiento de los síntomas de la sequedad ocular y de la boca en los pacientes con el síndrome de Sjögren y en los pacientes con xerostomía post radiación, incrementa la capa de mucina y la acuosa, estimulando la producción de lágrima.

Con el objetivo de estabilizar la película lagrimal, hidratar y lubricar contamos con el amplio grupo denominado *lágrimas artificiales*, que distan mucho de ser la lágrima ideal pero pueden mejorar los síntomas y signos de ojo seco, siendo a veces suficiente. Las diferencias de las lágrimas vienen dadas por varios factores como son la composición en electrolitos, osmolaridad (debida a la presencia de sales), Osmolalidad (debida la presencia de macromoléculas que generan presión oncótica), y viscosidad (similar al moco) que van a dar las diferencias en cuanto al tiempo de permanencia, interferencia con la visión y la eficacia, medida esta última como que el paciente necesita menos las gotas cada vez. La pauta de uso de lágrimas debe de estar definida de forma individualizada así como el tipo de lágrima a utilizar en función de las necesidades y actividades del paciente (las que no interfieren con la visión durante el trabajo, las que más permanecen por la noche).

La tolerancia de las lágrimas viene dada también por la presencia de conservantes. La industria cada vez los hace menos tóxicos y cuenta con sistemas de liberación donde el conservante no llega al ojo. No se recomiendan lágrimas con conservantes cuando tienen que ser indicadas para su empleo en más de 4 veces al día (DEWS 2007) Otros parámetros a tener en cuenta son la osmolaridad del preparado y los posibles efectos terapéuticos de sus componentes.

La *azitromicina tópica* una vez al día ha demostrado ser eficaz en la mejora del tiempo de tolerancia de lente de contacto en pacientes con el ojo seco leve en un estudio piloto abierto. La FDA advierte con respecto a los riesgos de la vía oral el uso

de azitromicina en pacientes con problemas cardiovasculares este agente se debe utilizar con precaución para tratar el ojo seco en tales individuos.

Como se ha expuesto anteriormente la inflamación de la superficie ocular está en el centro de la patogénesis del ojo seco. Ésta puede ser debida a cambios en la composición de la lágrima (hiperosmolaridad), por inflamación (enfermedades autoinmunes), por irritación crónica (lentes de contacto) u otros factores por lo que el tratamiento con *fármacos antiinflamatorios* toma cada vez mayor protagonismo.

-Esteroides: tipo medroxiprogesterona o esteroides como la rimexolona o flurametolona, recordando que el uso de esteroides debe realizarse por tiempo limitado, bajo control oftalmológico, descartando otras enfermedades asociadas y a ser posible con pruebas objetivas de inflamación ocular (citología de impresión, osmolaridad). Para ojos secos más graves se puede utilizar la metilprednisolona diluída en solución salina al 1% o al 0.5% en formulación magistral.

-Ciclosporina A: La aplicación tópica de ciclosporina A reduce la expresión de marcadores de inflamación en la conjuntiva (Expresión de HLA-DR), incrementa el número de células caliciformes, disminuye los patrones de tinción de la superficie ocular y mejora los síntomas. Los resultados más consistentes se han obtenido con concentraciones del 1%.

Se ha visto beneficioso en determinados pacientes a corto plazo, aunque no existe evidencia suficiente para su empleo a largo plazo ni en todas las subpoblaciones de pacientes con ojo seco, además del coste económico que supone. Se están ensayando otras moléculas como el tacrólimus y pimecrólimus con mecanismos de acción similar a la ciclosporina.

-Tetraciclinas: A parte del efecto clásico antibiótico, las tetraciclinas y sus derivados presentan propiedades antiinflamatorias y antiangiogéncias por lo que se usan en la rosácea ocular, acné rosácea y la blefaritis posterior crónica (disfunción de glándulas de Meibomio). La dosis es de 50 a 100 mg/día de doxiciclina o minociclina durante tiempo prolongado y hay publicaciones donde recomiendan un mantenimiento a largo plazo de doxiciclina 2 veces al día a dosis bajas de 20 mg. También se están ensayando de forma tópica sin resultados concluyentes hasta la actualidad. Se debe recordar que estos pacientes con Meibomitis deben realizar los protocolos de higiene palpebral (calor, masaje y limpieza del borde del párpado) como complemento al tratamiento con tetraciclinas.

Los *ácidos grasos esenciales* son compuestos que tienen que ser administrados en la dieta ya que no pueden ser sintetizados por los vertebrados. Los ácidos grasos omega 6 son precursores del ácido araquidónico y por lo tanto de la inflamación, mientras que alguno de los omega 3 como el ácido linoleico y gamma linoleico (presentes en el pescado) inhibe la síntesis de mediadores de inflamación. Estos últimos se han ensayado con buenos resultados en el ojo seco asociado a la artritis reumatoide. Los ácidos grasos omega 3 sin ésteres etílicos pueden ser beneficiosos aunque aún no hay evidencia científica suficiente acerca de la efectividad de una fórmula concreta y,

además puede aumentar el riesgo de cáncer de próstata, aunque con resultados heterogéneos en los estudios actuales (Fu YQ, 2015)

El **suero autólogo** forma parte del grupo de alternativas terapéuticas biológicas para el tratamiento de trastornos de superficie ocular siendo las indicaciones más claras aquéllas con metaplasia, las úlceras neurotróficas y las erosiones recidivantes de córnea. (capítulo más detallado más adelante) Otro sustituto biológico usado en patología más grave de la superficie ocular es el **plasma rico en factores de crecimiento** recientemente incorporado al arsenal terapéutico (Alio JL, 2015)

En estadios avanzados, con limitación de las actividades diarias de los pacientes en los que nada de lo anterior ha sido totalmente eficaz se plantea la cirugía. Se exponen a continuación las diferentes técnicas:

-Autotrasplante de glándula salivar: Es una cirugía que puede estar indicada en los últimos estadios del ojo seco (Schirmer menor de 1mm) y consiste en trasplantar un área de la glándula submaxilar con su penacho vascular (supervivencia 80%) para lograr que se generen de nuevo mucinas y otros mediadores de la secreción que al ser distinta de la de la lágrima puede provocar reacciones inflamatorias. Se ha visto que los pacientes mejoran los indicadores de sequedad ocular (BUT, Schirmer) los síntomas de ojo seco y la agudeza visual (Soares EJ, 2005)

-Tapones lagrimales: Cuando la lágrima no está inflamada y no hay problemas de la dinámica de la misma se puede considerar el uso de tapones lagrimales. Si hay evidencia de inflamación se debe tratar la misma antes de considerar los tapones lagrimales. Estos pueden estar fabricados con material reabsorbible (duración de 3 días a seis meses) o permanentes. Se indican en el ojo seco moderado y grave y aunque su eficacia está considerada en un nivel medio, hay numerosos estudios que avalan la mejoría de osmolaridad, tiempo de ruptura y tinciones. Se trata de estudios con grado de evidencia II-III. Hasta la fecha no se dispone de evidencia grado I (Marcet MM, 2015)

-Tarsorrafia o sutura de párpados reduce la superficie ocular expuesta al exterior y por lo tanto reduce la evaporación de la lágrima. Puede ser una buena alternativa para conservar la superficie ocular en patología grave como las conjuntivitis cicatrizantes crónicas secundarias a enfermedades inflamatorias o (eritema multiforme mayor, penfigoide, etc) o causticaciones.

Otras alternativas quirúrgicas como el tratamiento quirúrgico de la conjuntivalochalasis, los trasplantes de membrana amniótica, trasplante de limbo deben enmarcarse en las patologías concretas asociadas al ojo seco. Por último hay que recordar que en enfermedades sistémicas como el penfigoide ocular cicatricial los posibles tratamientos quirúrgicos deben ser considerados muy cautelosamente hasta que la enfermedad sistémica esté controlada.

En ojos secos muy graves se plantea el uso de **lentes de contacto** esclerales duras y gafas con el cierre apropiado para que formen una cámara en contacto con el ojo, y mantener así la superficie ocular húmeda y evitar el ojo seco evaporativo.

Las lentes de contacto blandas también pueden ser empleadas como parches en casos de epitelopatía o defectos epiteliales persistentes.

I.IV a) Colirio de suero autólogo y heterólogo

Los efectos terapéuticos de la aplicación de suero autólogo en pacientes se conoce desde el año 1984 gracias a los trabajos de Fox, donde se describe la experiencia en enfermos con *queratoconjuntivitis lacrima* (Fox et al, 1984). En 1993 se pone de manifiesto el efecto trófico sobre el epitelio córneo-conjuntival de muchos de los componentes del suero, gracias a la modelación en la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales de córnea y limbo (Kruse FE, Tseng SC, 1993)

A pesar de ello, el pobre conocimiento de su mecanismo de acción a nivel de la superficie ocular, hizo que su utilización fuese mínima hasta finales de los años 90, gracias a los trabajos de Tsubota (Tsubota K, 1999 a,b). En los mismos, se establece la estabilidad de la vitamina A, así como de los factores de crecimiento EGF y TGF-beta en el suero autólogo por espacio de un mes si se almacena a 4°C y de tres meses si es a -20°C (Tsubota K, 1999 a,b) Estudios más recientes siguen corroborando la utilidad y la superioridad del suero autólogo frente a los preparados de lágrimas artificiales (Celebi ARC, 2014) (Qing Pan, 2013) (Gordana Stankovic, 2012)

El mecanismo de acción del suero autólogo se basa principalmente en su acción lubricante, pero lo que lo hace especialmente interesante para el tratamiento de alteraciones de la superficie ocular es su mayor concentración en vitaminas A y E, factores de crecimiento (EFG, TGF-b, FGF, HGF) y fibronectina (Nelson JD, Gordon JF, 1992; Bosch-Valero J.,2008), nutrientes que promueven el trofismo celular del epitelio corneal interviniendo en su regeneración (López-García, 2007) (Yoshino K, 1996; Tsubota K, 1999).

El suero autólogo cuenta con componentes presentes en la lágrima encontrándose en éste a una concentración mayor (tabla 7). No son concluyentes los estudios hasta el momento acerca de cuál o cuáles de ellos son los responsables del efecto beneficioso del colirio. Merecen mención destacada:

- El Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) que acelera el proceso de migración de las células epiteliales contando con efectos antiapoptóticos. Se encuentra en lágrima tanto basal como refleja a concentraciones algo inferiores a las que presenta el suero autólogo.
- El Factor β Transformante del Crecimiento de Fibroblastos (TGF- β), implicado en los procesos de reparación epitelial y estromal.

- El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), su isoforma AB, es activado intracelularmente mientras es secretado por los gránulos alfa de las plaquetas y, favorece la mitosis y la cicatrización.
- La vitamina A parece prevenir los procesos de metaplasia escamosa epitelial, hallándose en concentraciones mayores en el suero autólogo.
- Proteínas como la albúmina, con actividad antiapoptótica y la α 2-macroglobulina, con actividad anticlagenasa.
- La fibronectina es uno de los factores de mayor importancia en la migración celular, siendo su concentración en suero autólogo mucho mayor a la encontrada en la lágrima
- Factores neuronales: sustancia P y el Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 (IGF1), implicados en la migración y adhesión del epitelio corneal.
- IgG, lisozima y factores del complemento, los cuales aportan efecto bacteriostático y bactericida.

	LÁGRIMA	SUERO AUTÓLOGO
EGF (ng/ml)	0,2-0,3	0,5
TGF- β (ng/ml)	2-10	6-33
Vitamina A(mg/ml)	0,02	46
Lisozima(mg/ml)	1,4	6
Fibronectina(mg/ml)	21	205

Tabla 7.- Componentes en la lágrima y en el suero autólogo (López-García, 2007)

El suero y la lágrima presentan pH y osmolaridad similares (300-310 mOsm/l) Gracias a las propiedades previamente descritas podemos afirmar que el suero autólogo no sólo actúa humidificando la superficie sino que, además aporta factores nutricionales y de crecimiento, necesarios para mantener la viabilidad celular en los procesos de reparación epitelial y, componentes bactericidas, disminuyendo así el riesgo de contaminación e infección.

Aunque algunos autores no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con suero autólogo y otras terapias convencionales con lágrimas artificiales o BSS (Tananuvat N, 2001), (Malavazzi GR, 2005), la aplicación de suero autólogo supera ampliamente a la terapia sustitutiva con lágrimas artificiales (Noble BA, 2004).

Se ha demostrado mediante estudios comparativos que, el suero autólogo preserva la integridad de las membranas celulares y aumenta los niveles de ATP intracelular en mayor medida que las lágrimas artificiales. Inhibe la apoptosis de las células conjuntivales y del epitelio corneal (Takashi Kojima, MD et al 2008) Además ha mostrado un mayor efecto sobre la proliferación celular e incremento de la transcripción de RNA para el Factor de Crecimiento Neuronal y receptores del TGF- β (Poon , 2001; Geerting, 2001; You L, 2001)

El efecto producido por el suero autólogo es transitorio, apareciendo de forma objetiva en la exploración a las 2 semanas y de forma subjetiva por los pacientes desde el 2º día, desapareciendo tras la suspensión (Noble BA, 2004), (Poon AC, 2001)

En los últimos años, el empleo del colirio autólogo se ha ido extendiendo debido al aumento de patologías susceptibles de su indicación, así como la disponibilidad de bancos de tejidos dotados de la infraestructura necesaria para su preparación dentro de un sistema de calidad implantado.

La elaboración del colirio de suero autólogo no es especialmente compleja y no supone un alto coste sanitario. Se lleva a cabo en el Banco de Tejidos bajo condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar (grado A) y en entorno D de tratamiento de aire; bajo previa indicación facultativa y tras descartar patología infecciosa mediante control serológico. Habitualmente es preparado al 20% salvo excepciones justificadas. Los viales deben ser almacenados en nevera a 4°C, siendo su caducidad de 21 días. Se le entrega al paciente protegido con papel de aluminio y las normas de empleo.

El procedimiento de preparación es similar en la mayoría de los grupos de trabajo, siendo variables en el proceso, la concentración de la preparación, la utilización de filtros, el tiempo de almacenamiento en fresco así como el medio para realizar la concentración exigida. Actualmente no existe consenso sobre la concentración a la que preparar el suero autólogo para la administración en colirio ocular, ya que hay grupos que lo están administrando al 10, 20, 40, 50, 80 y hasta 100% en una solución normalmente fisiológica.

La concentración al 20% parece suficiente y evita las molestias derivadas de la mayor viscosidad de preparados más concentrados y disminuye considerablemente el número de extracciones de sangre (Geerling G, et al 2004) Un tiempo largo de coagulación (≥ 120 min), una fuerte centrifugación (3,000xg 15 minutos) y dilución con BSS (suero salino balanceado) mejora la capacidad de proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales corneales (Liu L et al 2005)

Estudios recientes han valorado colirio de suero autólogo al 20% diluido en hialuronato sódico comparado con cloruro sódico no hallándose diferencias en cuanto a factor de crecimiento, osmolaridad, pH y densidad del preparado. Respecto a la

estabilidad de la película lagrimal, tinciones con fluoresceína y rosa de bengala, BUT, metaplasia escamosa y percepción subjetiva de los pacientes ha resultado mejor la dilución con hialuronato sódico. También se observa una mayor duración y efecto sobre la superficie corneal del suero autólogo, mejorando la tolerancia y disminuyendo el número de instilaciones diarias (López García JS et al, 2014)

La legislación que le compete al colirio autólogo no es uniforme a nivel mundial. En EEUU está regulado por la Food and Drug Administration (FDA) al considerarlo como un producto farmacéutico mientras que, en Inglaterra y País de Gales el protocolo estandarizado de preparación sigue las directrices del Servicio Nacional de la Sangre y la Agencia de Control de Medicamentos de Gran Bretaña de acuerdo con la guía de autotransfusión del British Comité for Standard in Haematology (Voak Det al,1994) En otros países como Alemania, el protocolo estándar de preparación sigue las directrices de la guía del Bundesärztekammer (colegio de médicos) y del Instituto Paul Ehrlich para donación y uso de productos hemáticos. (Geerling G, 2007) En estos protocolos, se aplican los mismos criterios que para la extracción de sangre destinada a donación, es decir, a los pacientes se les realiza un despistaje de enfermedades infecciosas de transmisión parenteral. Un grupo coreano (Hye Ryun Lee et al 2014) presenta una propuesta de guía para la estandarización de la producción y control de calidad de las preparaciones de colirio de suero autólogo en su país.

En España, el colirio de suero autólogo no tiene una legislación específica que lo contemple, si bien, a lo largo de la literatura se establecen algunas referencias legales que amparan esta terapia clínica.

Son cuatro los reales decretos que los autores manejan como referentes a esta modalidad terapéutica:

1- Real Decreto 175/2001 de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparados oficinales.

2- Real Decreto 1015/2009, de 19 de junio, por el que se regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales.

3- 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.

4.-Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.

El tratamiento con suero autólogo es un método eficaz para estimular la viabilidad de las células epiteliales corneo-conjuntivales gracias al aporte de los factores de crecimiento comentados anteriormente, deficitarios en la sequedad ocular asociado a la mayoría de las patologías con afectación epitelial expuestas.

Entre los inconvenientes se encuentran la frecuencia en el número de extracciones de sangre; pacientes con toma de anticoagulantes implican múltiples hematomas post extracción; el peligro que supone para el ámbito familiar el hecho de que el paciente padezca una enfermedad infecciosa, ya que el suero es un hemoderivado y cabe la posibilidad de contagio.

Las características del *suero heterólogo* no difieren de las del autólogo y, puede ser beneficioso su uso en algunos pacientes que presenten ciertas limitaciones en la extracción de su propio suero para realizar el colirio. Entre éstas podrían encontrarse la edad y limitaciones del paciente, la falta de medios para desplazarse periódicamente a realizarlo, el padecimiento de enfermedades autoinmunes que puedan poner en tela de juicio la calidad y eficacia del suero, enfermedades infecciosas transmisibles mediante hemoderivados suponiendo un riesgo para los familiares y convivientes en contacto. También sería interesante en caso de niños pequeños en los que la colaboración no acompañe. Un estudio reciente sugiere que el uso de colirio de suero autólogo en pacientes con Síndrome de Sjögren secundario no es eficaz debido al alto nivel de citoquinas proinflamatorias que se obtienen (Hwang J et al, 2014)

Se seleccionan donantes de sangre habituales del grupo AB para evitar problemas de rechazo antigénico, firmando un consentimiento informado sobre los fines de esa donación (Anexo 1).

I.V.- JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Como trabajo para lograr el grado de suficiencia investigadora se realizó en 2011 un estudio sobre 61 pacientes diagnosticados de Síndrome de Sjögren y Queratopatía neurotrófica con indicación de colirio procedente de suero humano. Los pacientes se reagruparon en 2 grupos, uno formado por 28 pacientes para suministrar colirio heterólogo distribuidos por diagnóstico en Síndrome de Sjögren 16 y Queratopatía neurotrófica 12 y, 33 pacientes con pauta de colirio autólogo, 23 correspondiente a Síndrome de Sjögren y 10 a Queratopatía neurotrófica. La selección de uno u otro grupo se basó en la posibilidad técnica o no de preparación de colirio del propio paciente, pasando al grupo de heterólogos aquellos que por motivos técnicos fue imposible su realización (mal acceso venoso, serologías positivas, anticoagulación oral ,etc).

El estudio fue observacional descriptivo retrospectivo en el que se analizaron las variables de edad, sexo, diagnóstico, número de viales administrados e indicación de colirio autólogo o heterólogo. Además se realizó un cuestionario de autoevaluación (Donate J, 2002), donde se contemplaron las siguientes variables: enrojecimiento ocular, borde de párpados inflamados, escamas o costras en párpados, ojos pegados al levantarse, secreciones, sequedad de ojo, sensación de arenilla, sensación de cuerpo extraño, ardor/quemazón, picor, malestar de ojos, dolor agudo (pinchazos), lagrimeo, ojos llorosos, sensibilidad a la luz, visión borrosa transitoria que mejora con el

parpadeo, cansancio de ojos o párpados, sensación de pesadez ocular o palpebral. Diseñado con una escala de autoevaluación de 0 a 4 en función de la frecuencia y limitación de la sintomatología.

Se obtuvieron como resultados la no inferioridad de ambos colirios al ser valorados los criterios subjetivos de mejoría de los pacientes mediante el cuestionario mencionado. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre subgrupos de enfermedad (Síndrome de Sjögren Vs Queratopatía neurotrófica) así como en subgrupos de tratamiento para cada patología (autólogo Vs heterólogo)

Con la aparición de esta modalidad terapéutica como es el colirio heterólogo, gracias a la donación altruista de los donantes de sangre, se ha podido proporcionar a todos esos pacientes una opción al colirio de suero autólogo; resultando ser, según nuestros resultados igualmente beneficioso en cuanto a la mejoría sintomática que experimentan los pacientes tras su instilación. Se ha valorado el empleo de este colirio en defectos epiteliales persistentes objetivándose como una alternativa eficaz al autólogo (Chiang C, 2009), (Kyung-Sun Na, 2012)

Otros preparados empleados recientemente y que aún se encuentran en estudio por diferentes grupos son colirio de suero de sangre de cordón umbilical, plasma rico en plaquetas, plasma rico en factores de crecimiento (Freire V et al 2014), (Versura P 2013). El colirio autólogo de plasma rico en plaquetas se ha visto eficaz en el tratamiento de las úlceras corneales latentes (Alio J.L 2007)

Las conclusiones del trabajo de investigación expuesto anteriormente fueron las siguientes:

- 1.-Las limitaciones que presenta al tratarse de un estudio retrospectivo.
- 2.-Durante la recogida de datos han aparecido pérdidas de pacientes, por lo que el análisis está realizado exclusivamente sobre los pacientes cumplidores.
- 3.-Aunque el método empleado para la evaluación haya sido un cuestionario previamente validado para tal efecto, se trata de criterios subjetivos expresados por los pacientes, refiriéndose a la sintomatología ocular previa y posterior al tratamiento (6 meses) en cada grupo.
- 4.-A pesar de sus limitaciones, consideramos que es un primer paso importante para discernir si es relevante un posterior estudio más exhaustivo sobre este tema y si resultará rentable y útil para la práctica clínica diaria.
- 5.-Partiendo de los resultados obtenidos en los que no se aprecian diferencias significativas entre el tratamiento con suero autólogo y heterólogo y que, para ambos se ha encontrado mejoría en los pacientes, resulta interesante plantear un nuevo proyecto.

De estas conclusiones se parte para un estudio que comprende el trabajo de tesis doctoral, para optar al grado de doctor, ya realizado y presentado en este texto.

II. MATERIAL Y MÉTODO

II.I. PLANTEAMIENTO METODOLÓGICO

II.I.a)- ESTUDIO REALIZADO

Estudio prospectivo observacional, comparativo de eficacia terapéutica, entre dos grupos de pacientes con síndrome de ojo seco a los que se le asignó de forma aleatorizada a doble ciego colirio de suero autólogo o heterólogo, con un tiempo de seguimiento de 3 meses. Contamos con un total de 60 ojos distribuidos de la siguiente forma:

- a) Grupo con suero autólogo: 32 ojos (16 pacientes)
- b) Grupo con suero heterólogo: 28 ojos (14 pacientes)

Los pacientes fueron reclutados y estudiados durante el periodo 2011-2015. Se han valorado parámetros objetivos de evolución, tales como la determinación de mejor agudeza visual corregida (MAVC), el tiempo de ruptura de la película lagrimal (BUT), Test de Schirmer tipo I, Tinciones con Fluoresceína y verde de lisamina; así como la realización de un cuestionario de autoevaluación subjetiva de los síntomas. Asimismo se ha realizado un estudio de posible sensibilización frente a colirio heterólogo, mediante analíticas sanguíneas seriadas con la detección de Anticuerpos irregulares (AAII) antes y después del tratamiento.

II.I.b)- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Plantearémos dos hipótesis de trabajo:

- Hipótesis nula (H_0): no existen diferencias significativas en las pruebas realizadas a los pacientes objeto de nuestro estudio en ambos grupos, suero autólogo y heterólogo.
- Hipótesis alternativa: sí existen diferencias significativas en las pruebas realizadas a los pacientes objeto de nuestro estudio en ambos grupos, suero autólogo y heterólogo y, éstas poseen una significación estadística con $p < 0.05$.

II.I.c) OBJETIVO DEL ESTUDIO

Valorar la eficacia del colirio de suero heterólogo respecto al autólogo en síndrome de ojo seco mediante el estudio de variables objetivas, como son la agudeza visual, el tiempo de ruptura lagrimal, las tinciones de fluoresceína y verde de lisamina; así como mediante la cumplimentación de un cuestionario de autoevaluación de sintomatología.

II.I.d) POBLACIÓN A ESTUDIAR

II.I.d.1) CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Diagnóstico de ojo seco (según la tabla 2) de más de tres meses de evolución
2. Test de Schirmer tipo I < 5 mm.
3. Tiempo de rotura lagrimal $< a 10$ segundos.
4. Firma del consentimiento informado.

II.I.d.2) CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Menores de 18 años.
2. Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o que no empleen medidas de anticoncepción adecuadas.
3. Usuarios de lentes de contacto.
4. Historia de alergia ocular en los últimos 3 meses.
5. Alteraciones anatómicas de párpado y pestañas.
6. Enfermedades infecto-contagiosas (VIH, VHC, VHB) en los que no es pertinente la elaboración de colirio de suero autólogo.

II.I.e) PROCEDIMIENTO DEL TRABAJO

Se incluyeron en el estudio 60 ojos (de 30 pacientes) con diagnóstico de ojo seco moderado-severo de cualquier etiología, que recibieron como tratamiento a su enfermedad la alternativa de colirio de suero autólogo o heterólogo según el grupo asignado. Grupo 1: suero autólogo (32 ojos de 16 pacientes). Grupo 2: suero heterólogo (28 ojos de 14 pacientes) en el período comprendido entre septiembre de 2011 a mayo de 2015.

No se consideró necesario un grupo control ya que, se trata de comparar 2 tratamientos en pacientes con un estado moderado- severo de la enfermedad. Además, no habría sido ético asignar a un posible grupo control una alternativa terapéutica demostrada inferior como son los lubricantes comerciales

El diagnóstico de ojo seco severo, fue considerado como aquellos casos de la enfermedad en los que no se produce una mejoría objetiva y subjetiva con el tratamiento con humectantes comerciales convencionales, siguiendo la clasificación propuesta por el grupo de trabajo internacional Dry Eye Workshop que se detallan a continuación en la tabla 2 (DEWS, 2007)

NIVEL DE SEVERIDAD DE OJO SECO	1	2	3	4 *
Malestar, severidad y frecuencia	Leve y/o episódico: bajo condicionantes de estrés ambientales	Episódico moderado y/o crónico: con o sin condicionantes de estrés	Grave frecuente o constante sin condicionantes de estrés	Grave y/o incapacitante y constante
Síntomas visuales	Ausentes o episodios leve (cansancio)	Molestia y/o limitación de actividad episódica	Molestia crónica y/o constante con limitación de actividad	Constante y/o probablemente incapacitante
Inyección conjuntival	Ausente o leve	Ausente o leve	+/-	+ / ++
Tinción conjuntival	Ausente o leve	Variable	Moderada/marcada	Marcada
Tinción corneal (Gravedad/ localización)	Ausente o leve	Variable	Marcada/ central	Erosiones puntiformes graves
Signos corneales/lagrimal	Ausente o leve	Suciedad lagrimal leve ↓ menisco	Queratitis filamentosa Acúmulo de mucoso ↑ suciedad lagrimal	Queratitis filamentosa Acúmulo mucoso ↑ suciedad lagrimal Úlceras corneales
Glándulas Meibomio/palpebrales	Presencia variable de disfunción	Presencia variable de disfunción	Frecuente	Triquiasis Queratinización Simbléfaron
BUT (seg)	Variable	≤ 10	≤ 5	Inmediato
Test de Schirmer (mm/5min)	Variable	≤ 10	≤ 5	≤ 2

Tabla 2.- Nivel de severidad del ojo seco

Report of the Definition and Classification of Subcommittee of the International DryEye Workshop. Ocul Surf 2007; 5: 88) *Requiere síntomas y signos

A todos ellos se les realizó la visita inicial con inclusión en el estudio y 2 visitas posteriores al mes y 3 meses del inicio del tratamiento en el servicio de oftalmología del Hospital Regional de Málaga junto a las visitas al CRTS de Málaga, como se detallan en la tabla 8.

La agudeza visual ha sido medida mediante el optotipo de E Snellen a la distancia establecida de 6 metros, con condiciones de iluminación comparables y por personal correctamente entrenado para tal fin, siendo refraccionado por el oftalmólogo para obtener la mejor agudeza visual corregida en cada una de las visitas (Bujger et al 2010)

Las pruebas objetivas realizadas se detallan a continuación, siguiendo las recomendaciones del comité para el diseño de estudios sobre ojo seco del International Dry Eye Workshop (DEWS, 2007):

- 1.-Determinación del volumen y la producción lagrimal basal y refleja mediante el test de Schirmer tipo I sin anestesia empleando las tiras Alcon Tear Test Schirmer® 35x5mm Strip 250/Bx, Laboratorios Alcon, Forth Worth, Texas
- 2.-Determinación del estado del epitelio córneo-conjuntival mediante las tiras de verde de lisamina Dina Strip Lissaver-Plus V®, laboratorios Gecis, Villemorant, Neung-sur-Beuvron, Francia.
- 3.- Determinación de la estabilidad lagrimal mediante test de la ruptura lagrimal con fluoresceína, empleando el colirio Colircusí fluoresceína®, solución oftálmica, Laboratorios Alcon, Forth Worth, Texas.
- 4.- Determinación de la integridad de la superficie ocular mediante la realización de la tinción con fluoresceína, empleando el colirio Colircusí fluoresceína®, solución oftálmica, Laboratorios Alcon, Forth Worth, Texas
- 5.-Evaluación de los síntomas subjetivos del paciente mediante cuestionario validado para ojo seco (Donate, 2002)

En el test de Schirmer se consideró hiposecreción lagrimal a valores inferiores a 5 mm de la tira tras colocación de la misma durante 5 minutos con parpadeo espontáneo del paciente y medido en habitación sin corrientes de aire ni luz intensa.

Para la cuantificación y valoración de la tinción con verde de lisamina se empleó el esquema de graduación de Van Bitjsterveld con una puntuación de 0 a 3, que evalúa las siguientes áreas: conjuntiva bulbar temporal, córnea y conjuntiva bulbar nasal; considerando valor 0: la ausencia de puntos impregnados, 1: presencia de algunos puntos impregnados, 2: zonas impregnadas bien definidas y 3: impregnación total. La puntuación global corresponde a la suma de las 3 áreas. Una puntuación mayor o igual a 3 se considera patológica (Franck C, 1991)

En la valoración de la tinción con fluoresceína se utilizó el esquema de Oxford, en el que se divide en grados de severidad de 0 a 5 según el área teñida, como se muestra en la figura 2.

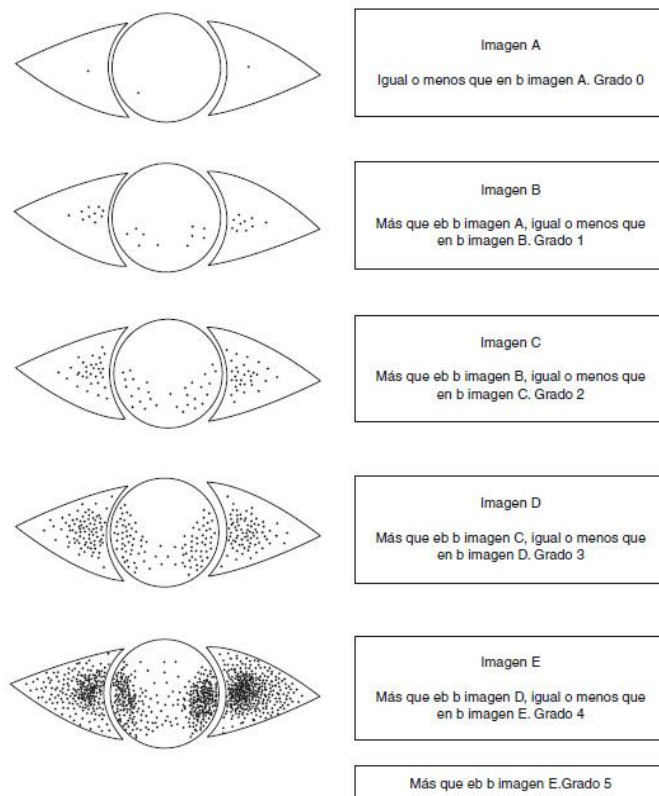


Figura 2.-Esquema de Oxford

El tiempo de ruptura de la película lagrimal (BUT) se realizó del siguiente modo: instilación del colirio de fluoresceína y tras varios parpadeos para una mejor distribución por toda la superficie ocular se le solicitó al paciente que mantuviera los ojos abiertos y contamos el tiempo (en segundos) hasta la aparición de áreas de desecación del colorante sobre la córnea. Medido 3 veces y obteniendo la media; teniendo en cuenta que las localizaciones de la ruptura fueran heterogéneas (descartando así alguna patología local corneal) y considerándose patológico inferior a 10 segundos.

Como complemento a las pruebas objetivas se ha rellenado un cuestionario validado de autoevaluación (Donate ,2002) en el que se valoran 18 variables de síntomas asociados al ojo seco (Figura 3) Cada uno de estos síntomas se clasifica en función de la gravedad que tuvo durante la última semana según la siguiente escala:

- 0: No tiene ese síntoma.
- 1: Pocas veces tiene ese síntoma.
- 2: A veces tiene ese síntoma pero no le molesta.
- 3: Frecuentemente tiene ese síntoma, le molesta, pero no interfiere en sus actividades.
- 4: Frecuentemente tiene ese síntoma, le molesta e interfiere en sus actividades.

Realizándose el sumatorio final, útil para valorar mejoría subjetiva en las distintas visitas

Enrojecimiento ocular.....
Borde de párpados inflamados.....
Escamas o costras en párpados.....
Ojos pegados al levantarse.....
Secreciones (legañas).....
Sequedad de ojo.....
Sensación de arenilla.....
Sensación de cuerpo extraño.....
Ardor/quemazón.....
Picor.....
Malestar.....
Dolor agudo (pinchazos en los ojos).....
Lagrimo.....
Ojos llorosos.....
Sensibilidad a la luz (fotofobia).....
Visión borrosa transitoria que mejora con el parpadeo.....
Cansancio de ojos o párpados.....
Sensación de pesadez ocular o palpebral.....

Figura 3. Cuestionario de autoevaluación

(Donate, 2002)

Se le realizó a todos los pacientes incluidos en el estudio determinación sérica de albúmina, IgA, IgG, IgM, vitamina A, vitamina E, EGF (Factor de crecimiento epidérmico), TGF (Factor de crecimiento transformante) y fibronectina. Se estudiaron para conocer a priori la concentración basal de las mismas en ambos sueros. También se llevó a cabo una analítica completa para despistaje de enfermedades infecciosas que se detalla más adelante en la preparación de los colirios.

	Screening visita 1	Aleatorización visita 2 (+7 días)	Tratamiento visita 3 (+14 días)	1ª Evaluación visita 4 (+44 días)	2ª Evaluación visita 5 (+104 días)
Historia clínica	X	X			
Cuestionario	X			X	X
Consentimiento informado	X				
Tests oftalmológicos	X			X	X
Hematología		X			
Tratamiento			X		

Tabla 8.- Cronograma de seguimiento del estudio

A continuación se detallan las visitas realizadas al servicio de oftalmología (aparecerán con numeración 1ª, 2ª y 3ª en el texto restante, aunque en el cronograma anterior de la tabla 8 aparecen como 1ª, 4ª y 5ª ya que se han tenido en cuenta en la misma las visitas realizadas al Centro Regional de Transfusión Sanguínea)

VISITA 1

Reclutamiento de los pacientes

Realización de las pruebas objetivas:

-Agudeza visual

-Test de Schirmer

-Tinción fluoresceína

-Tinción con verde de lisamina

-Tiempo de ruptura lagrimal- Break up time (BUT)

-Cuestionario de autoevaluación

Propuesta y aceptación de participación en el estudio

Firma de consentimiento informado

Asignación aleatoria del colirio

Derivación al CRTS para extracción de sangre, despistaje, elaboración del colirio y entrega.

VISITA 2	1 mes
----------	-------

Realización de las pruebas objetivas

Cuestionario de autoevaluación

Valoración de posibles causas de abandono

VISITA 3	3 meses
----------	---------

Realización de las pruebas objetivas

Cuestionario de autoevaluación

Valoración de posibles causas de abandono

Cierre del estudio

Pauta de tratamiento

Una vez seleccionado el paciente según los criterios de inclusión fue derivado al Centro Regional de Transfusión Sanguínea (CRTS) donde se realizó la extracción sanguínea y las pruebas de despistaje de enfermedades infecto-contagiosas. Si no presentó ninguna enfermedad de transmisión hemática se aleatorizó al paciente, comunicándolo al resto del personal investigador. En caso de que el paciente presentara enfermedades infecto-contagiosas (VIH, VHC, VHB), fue excluido del estudio y se comunicó a los investigadores colaboradores y al investigador principal.

El procedimiento para asignar los sobres cerrados con numeración correspondiente a los envases en orden aleatorio se realizó mediante el correspondiente procedimiento de minimización por bloques. El hematólogo poseía la hoja de cálculo *Excel* en que se especificaron qué colirio se dispensó a cada paciente. Posteriormente se realizó de nuevo la extracción sanguínea con objeto de preparar los colirios, independientemente del tipo de suero que se fuera a administrar al paciente, para evitar

sesgos. La elaboración de los colirios, así como de las pruebas de despistaje, fueron realizadas por el técnico de laboratorio. A pesar de que sólo se preveía que se fuesen a emplear tres botes de colirio, se prepararon cinco unidades, para tener cubierta cualquier incidencia. A cada paciente se le administró un colirio de suero convenientemente identificado cuyo contenido tanto el paciente como el oftalmólogo desconocían, previa pruebas serológicas. Se insistió en la importancia del correcto uso y manejo de los preparados, sobre todo en lo referente a las medidas de conservación e higiene al aplicar las instilaciones, así como en la manipulación de estos preparados por otras personal, ya que se trata de fluidos parenterales. Se especificó que el colirio debía estar en nevera a 4°C.

Se dio una vida media de 21 días en nevera a 4°C, basado en la caducidad de algunos autores (Tsubota K, 1999) que establecen 30 días y en nuestra experiencia (618 pacientes desde 1999 con esta caducidad). La estabilidad es de 3 meses a -20°C (Tsubota K, 1999) y recientemente se ha demostrado que es hasta de seis meses a la misma temperatura (Fischer et al, 2012).

El resto de los colirios que emplearía el paciente en el estudio se almacenaron en el Centro Regional de Transfusión Sanguínea en congelador a -80°C. La recogida de cada uno de los siguientes botes de colirio se efectuó dos días antes de terminar su periodo de caducidad (21 días) es decir los días 1, 19, 38 y 57, coincidiendo con días laborables. Si el paciente precisó el colirio antes de esa fecha, se puso en contacto con el centro. Se procedió a dejar en reserva un 5º vial ante posibles eventos (pérdida de fluido eléctrico, pérdida del vial, indicios de contaminación etc.).

Entrega	Día	Caducidad
1	1	21
2	19	40
3	38	59
4	57	78
5	*Cuando se produzca el evento	+21 día

Tabla 9.- Dispensación de colirios

El paciente aplicó el suero cada tres horas durante 15 horas de vigilia (por ejemplo, en una jornada estándar se aplicaría el colirio de 8 de la mañana a 11 de la noche), es decir, un total de 5 veces al día. La cantidad fue una gota, instilada en el fondo de saco inferior. El paciente debió comprimir la zona del canto interno del ojo para evitar la absorción sistémica del colirio por vía naso-lagrimal.

Al paciente se le entregaron las normas de administración contempladas en el Anexo I de BTCa-P-07 (Anexo 2)

II.II.- PREPARACIÓN DE LOS COLIRIOS

Para la preparación de los colirios se siguió la sistemática de trabajo de preparación de un medicamento, según las recomendaciones de la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios)

El medicamento fabricado consistió en una dilución al 20% de suero autólogo de pacientes o heterólogo de donantes de sangre, en una solución de *Sterile Irrigating Solution*, BSS®. Frasco Drop-Tainer® de 15 mL, para el tratamiento del Síndrome de Ojo Seco. La preparación de la dilución se realizó en forma de colirio para su administración vía tópica.

II.II.a) PRINCIPIO ACTIVO (PA)

II.II.a.1) Información general

Consideraremos principio activo a los componentes del suero y plasma procedente de un paciente (autólogo) o de un donante de sangre periférica (heterólogo) para la preparación de colirios.

-Nomenclatura:

Colirio autólogo, heterólogo de banco de sangre periférica

-Estructura

No aplica.

-Propiedades generales

El mecanismo de acción del colirio se basa principalmente en su acción lubricante, pero lo que lo hace especialmente interesante es su concentración en vitaminas A y E, factores de crecimiento como EFG (factor de crecimiento epidérmico), TGF- β (factor de crecimiento transformante beta), PDGF (factor de crecimiento asociado a plaquetas), NGF (factor de crecimiento nervioso) y fibronectina (Nelson JD, Gordon JF, 1992),(Bosch-Valero J. 2008), nutrientes que promueven el trofismo celular del epitelio corneal interviniendo en su regeneración (Yoshino K, 1996),(Tsubota K, 1999a).

II.II.a.2) Fabricación

-Fabricante(s)

Banco Sectorial de Tejidos

Centro Regional de Transfusión Sanguínea, Málaga

Diagrama 3.- Descripción del proceso de fabricación y control

El proceso de fabricación del PA se realiza conforme a los procedimientos operativos de trabajo establecidos, acorde a un sistema de calidad implantado, según normativa vigente de Establecimientos de Tejidos, RDL 9/2014, en las instalaciones clasificadas, campana de flujo laminar Clase A, que forman parte del área de procesamiento del Banco Sectorial de Tejidos

Como norma general y con el objetivo de garantizar la ausencia de contaminaciones cruzadas, las producciones de colirios realizadas en el área de procesamiento, se han organizado de forma que no coincidieran las etapas de manipulación de diferentes lotes. Además, se empleó un estricto sistema de identificación y separación espacial de los distintos lotes durante sus respectivas etapas de centrifugación y separación.

Los valores de aceptación/rechazo que condicionaron el flujo del proceso productivo se han establecido a partir de los resultados obtenidos en la etapa de desarrollo y puesta a punto de la técnica. A continuación se describen en detalle los diferentes pasos del proceso de producción del PA.

Obtención de las distintas modalidades de material de partida:

La obtención de suero de pacientes y de donantes de banco de sangre, se realiza en el área de extracciones del CRTS .

De forma previa a la extracción /obtención, se rellenó el formulario de consentimiento informado con la firma del paciente/donante específico para cada circunstancia. Se habrá realizado despistaje de enfermedades transmisibles.

a) Autólogo: Se extrajo una muestra de 40 mL de sangre mediante venopunción con jeringa de 50 mL estéril con marcado CE según procedimiento operativo de trabajo establecido en el área de extracciones del CRTS. Esta jeringa identificada mediante código de barras se consideró el envase primario que es embolsado en uno secundario igualmente identificado. Este envase secundario se consideró envase de transporte, en el que se adjuntó una hoja de recogida de datos (BTCa-F-07) que sería cumplimentado por el técnico especialista del laboratorio (TEL). De forma inmediata se envió al Banco de Tejidos, transportado por un TEL que habría acompañado al DUE (diplomado universitario en enfermería) que realizó la extracción. Este tiempo es mínimo de unos 60 segundos, suficiente para evitar que el producto se coagule en la jeringa.

b) Heterólogo: Se seleccionó un donante de sangre AB preferentemente (-) para el factor Rh. Se informó al donante que la donación que iba a realizar sería utilizada para una indicación clínica dirigida (preparación de colirios) y firmó un consentimiento informado específico. Se utilizó un equipo de donación Bolsa Leucoflex Sextuple de

Macopharma® ref. DXE 6500LS. Con la selladora estéril, se unió el tubular de extracción de sangre a la bolsa de transferencia sin anticoagulante.

Recepción en el área de Banco de Tejidos

Cuando llegó una muestra biológica se comprobó:

- La serología pertinente del paciente/donante para su aceptación en el estudio. A cada modalidad de colirio fue testada según normativa de Tejidos RDL.9/2014 para los siguientes parámetros:

Ac-VIH +Ag p24-VIH (COMBO)

Ac-VHC

HBsAg

Anti-Core HB

Prueba Sífilis (RPR)

NAT (Nucleic Acid Amplification Technology para VIH, VHB, VHC) para acortar periodo ventana.

- Control de etiquetas: comprobación del correcto cumplimiento de los datos necesarios en cada envase.
- Control de envases: que el envase de transporte y el primario fueran los correctos y estuvieran en buen estado.
- Control sobre la hoja de recogida: que existiera y estuvieran todos los datos como se indica en los formularios correspondientes
- Control de las condiciones de recepción: envases adecuados a temperatura adecuada.
- La caducidad de la muestra: corroborar la hora de extracción (<8 minutos suero autólogo y de donante).
- Cumplimentación de un registro de entrada que garantizara la trazabilidad: Identificación del paciente/ donante, hospital, fecha y hora de la extracción, tiempo transcurrido en su transporte, condiciones de recepción. Codificación de identidades Paciente/donante/Muestra

Procesamiento

El TEL que custodiaba la muestra se la entregó de inmediato a otro TEL que se encontraba correctamente equipado (bata, patucos, gorro, desechables, ausencia de joyas y maquillaje) según la normativa establecida en el Banco para trabajar en Campana de Flujo Laminar (Grado A)

En todo momento, la jeringa y la bolsa que contiene la muestra fue manipulada exclusivamente por personal cualificado y autorizado, y se abrió únicamente en el interior de la sala limpia (zona de producción) del laboratorio dentro de una cabina de seguridad biológica (Grado A). A partir de este momento y hasta el envasado del colirio terminado, todas las manipulaciones del material biológico se realizaron en condiciones asépticas.

Este segundo TEL realizó las siguientes operaciones:

Autólogo

-En campana de flujo laminar, se prepararon cinco tubos de cristal graduados estériles.

-Se depositó en cada uno de ellos 8 ml de sangre. Se taparon y se esperó que coagulara la sangre y se produjera la retracción del coágulo (nunca menos de dos horas) a 22°C.

-Cada tubo fue identificado con el número correspondiente del código de barras además de las iniciales del paciente/donante.

-Se centrifugaron los tubos a 2800 g 20°C durante 20 minutos. En tubos estériles se decantó el suero (Identificados previamente con el código de barras).

-Se realizaron alícuotas de 3,5 mL de suero tantos como fueron posibles a partir de los 40 mL de sangre, variable según el hematocrito del donante/paciente. Las alícuotas procedentes de cada muestra constituyeron un lote de colirio. El principio activo del medicamento en estudio estaba contenido en estas alícuotas

Heterólogo

-La bolsa de donación debidamente identificada de mantuvo en reposo en la plancha desplasmatizadora a 4°C y se dejó toda la noche hasta que se formara la retracción del coágulo.

-Se centrifugó la bolsa de donación 2800 g, 20 minutos a 20°C

-En campana de flujo laminar, se decantó el suero en tubos estériles de 50 ml debidamente identificados.

En este punto en ambos orígenes, se realizó un control visual apreciando la separación celular y observando una fracción líquida que debió ser amarillenta, trasparente y sin hemólisis. Se decantó muestra para cuantificación de parámetros analíticos (-80°C)

Los colirios se realizaron de uno en uno, de forma individualizada evitando la contaminación cruzada.

-Descripción de los controles en proceso

- Historia clínica y antecedentes del donante paciente
- Extracción: dieta libre de grasa para autólogo y periférica
- Venopunción: limpia, rápida de 40 mL de sangre (autólogo) 450 mL(heterólogo)
- Controles serológicos
- Cuantificación de los siguientes parámetros (tabla 10) (alícuota congelada para determinación conjunta)
 - Factor de Crecimiento Epitelial (EGF).
 - Factor β Transformante del Crecimiento de Fibroblastos (TGF- β).
 - Vitaminas A y E.
 - Fibronectina.
 - Albúmina
 - IgA, IgG, IgM
- Inspección visual: ausencia de hemólisis, transparencia.
- Controles microbiológicos: torunda de toma de muestra.

<i>Ensayo control Potencia</i>	Determinaciones	Valor Medio Autólogo*	Valor de referencia Heterólogo	Método
Identificación y Cuantificación	EGF(ng/ml)	0,7	-	Citometría
	TGF- β (ng/ml)	6-33	-	Citometría
	Vitamina A(μ g/dl)	88,3	20-80	HPLC**
	Vitamina E(μ g/dl)	-	800.0-1900.0	HPLC
	Fibronectina(μ g/ml)	205	12-124	ELISA
	Albúmina (g/dl)	3,5-5,5	3,40-5,00	Espectrofotometría
	IgG(mg/dl)	800-1800	700.00-1600.00	Inmunonefelometría
	IgA (mg/dl)	90-450	69.00-380.00	Inmunonefelometría
	IgM(mg/dl)	37-280	52.00-322.00	Inmunonefelometría

Tabla 10.- Determinaciones analíticas en sueros autólogo y heterólogo

*Garzón Parra, SJ.2012

**HPLC: High Performance Liquid Chromatography

-Control de Materiales y Reactivos

Material de partida

La fuente a partir de la cual se obtuvieron los colirios es la sangre total mediante venopunción de un donante /paciente.

De forma previa a la obtención de las muestras destinadas a la fabricación del colirio, se realizaron los estudios serológicos indicados a continuación que permitieron detectar la posible transmisión de agentes infecciosos en el medicamento:

- VIH 1 y 2: Anti-VIH-1,2 + Ag-p24 (COMBO)
- Hepatitis B: HBsAg, anti-HBc
- Hepatitis C: Anti-VHC-Ab
- Sífilis (RPR)
- NAT(VIH+VHC+VHB) para evitar una segunda determinación a los 180 días RD-L9/2014

Concepto de calidad de la muestra para la determinación de test de seguridad viral:

- Autólogo: la extraída con anterioridad no más de 30 días.
- Heterólogo: la muestra que acompaña al acto de la donación RD. 1088/2005

Dependiendo de la historia clínica del paciente se realizaron test adicionales que pudieron incluir: *Treponema Pallidum*, *Trypanosoma cruzi*, toxoplasma, VEB, CMV, malaria u otros. RDL.9/2014

Dichos análisis se realizaron en el laboratorio de detección de enfermedades transmisibles del CRTS de Málaga. La obtención de un positivo en cualquiera de los test anteriormente citados, implicó la exclusión del donante/paciente.

La cantidad de suero obtenido dependiendo del valor hematocrito nos sirvió para monitorizar el rendimiento del proceso de producción e intentar estandarizar los requisitos mínimos para obtener un número de viales por lote adecuado.

El control microbiológico: torunda final se realizó para, en caso de detectar muestras contaminadas al final del proceso de producción, desechar el colirio

Reactivos de origen biológico: No aplica.

Para la obtención del principio activo no se asoció ningún reactivo de origen biológico, sólo intervinieron métodos físicos de formación y retracción del coágulo y centrifugación.

-Control de etapas críticas y productos intermedios

Para evaluar y asegurar la consistencia y la reproducibilidad lote a lote del proceso de fabricación se establecieron una serie de controles en proceso. En base a los resultados obtenidos en estos controles durante el desarrollo del proceso de producción

se determinaron las etapas críticas que se describen a continuación. Para dichas etapas, se tuvieron en cuenta los criterios de aceptación basados en la experiencia adquirida durante el desarrollo del proceso (tabla 11)

La entrada de material biológico (sangre total), en la sala de producción fue un punto crítico en el que debían establecer controles en proceso definidos inicialmente (serología) del paciente/donante.

Control	Criterio de Aceptación	Método
Enfermedades transmisibles Donante/paciente	VIH 1 y 2: Anti-VIH-1,2+ Ag p24 Hepatitis B: HBsAg, anti-HBc Hepatitis C: Anti-VHC-Ab Sífilis (RPR) NAT(VIH,VHC,VHB) <i>Realizados y Negativos</i>	Métodos comerciales validados. Laboratorios CRTS

Tabla 11.- Criterios y métodos para control de etapas críticas

(NAT: nucleotids acid amplifications technology)

Control sobre la centrifugación: las condiciones de centrifugación estaban validadas para que el proceso fuera reproducible, advirtiendo en el sobrenadante aspectos de visualización objetivos y otros de cuantificación.

Control	Criterio de Aceptación	Método
Sobrenadante	Transparente Amarillo Sin hemolisis	Observación directa

Tabla 11.-Criterios y métodos para control de etapas críticas (continuación)

El proceso de producción se realizó de forma continua y por tanto, no se acumularon productos intermedios, en caso de colirio autólogo. En heterólogo una vez aislado el principio activo se alicuotó y almacenó a -80°C, hasta la elaboración para un determinado paciente.

Establecimiento de una seroteca: de cada fuente se almacenó una seroteca según RD. 1088/2005, sobre hemodonación.

-Validación y/o evaluación del proceso de producción

El proceso de producción se validó de forma concurrente en una muestra inicial (n=20) al comienzo del proceso de fabricación (Año 1999). Se han ido realizando validaciones concurrentes anuales hasta este momento.

-Desarrollo del proceso de fabricación

Hasta ahora, se han ido modificando algunos parámetros, como por ejemplo el volumen de sangre a extraer en principio establecido en 60 mL y actualmente en 40mL, para garantizar la utilización del colirio en los tres meses fijados para la estabilización del producto como veremos más adelante. Otra medida de mejora ha sido el aislamiento de los viales para mantener los niveles de vitamina A y el etiquetado.

II.II.a.3) Caracterización

-Estructura

Debemos pensar que cualquier pequeña modificación en la composición de un principio activo o de sus propiedades físico-químicas (cristalización, tamaño de partícula, estructura tridimensional, estereoisomería, etc.) podría dar lugar a diferencias importantes en actividad farmacológica, seguridad y eficacia. Por lo tanto, se debe poder garantizar la homogeneidad de la sustancia a lo largo de todo el desarrollo en los diferentes lotes (tabla 12)

Ensayo control	Especificaciones	Límite de aceptación	Método
Impurezas Celulares	No leucocitos, ni hematíes, ni plaquetas	0%	Contaje celular automatizado
Restos fibrina macroscópicos	2%	< 2%	Inspección visual
Hemoglobina libre	Ausencia de hemólisis	Sobrenadante amarillo, transparente	Inspección visual
Partículas grasas	Transparencia	Ligeramente turbio	Inspección visual

Tabla 12.- Caracterización de las muestras

En el caso de los principios activos de *origen biológico* o biotecnológico es a veces muy difícil definir una composición o una estructura química exacta o incluso una estructura tridimensional (estructura terciaria). Por eso, el esfuerzo que se debe hacer en los inicios con este tipo de productos para definir la estructura específica responsable de la actividad farmacológica, es quizá mayor. Muchas veces, estas sustancias complejas no se pueden definir bien únicamente desde un punto de vista químico y se debe recurrir también a ensayos biológicos para medir su potencia o

actividad biológica. Los valores cuantificables de suero/plasma dentro de unos valores de referencia establecidos es lo que van a definir la caracterización de los colirios.

-Impurezas

Impurezas celulares

Este preparado es acelular y por tanto no debe contener ninguna célula de la serie blanca roja o plaquetar tras la centrifugación.

Impurezas del proceso

Puede ocurrir la presencia de hemoglobina libre como consecuencia de una extracción dificultosa, esta presencia macroscópica al ojo humano de hemoglobina libre, sería signo de una impureza no tolerable que descartaría la utilización del principio activo. La presencia de pequeñas partículas de fibrina podría ser una impureza ocurrida en el proceso, secundaria a tiempos de retracción del coágulo insuficientes. Con la media de dos horas de reposo hemos logrado que esta presencia de impureza no aparezca en el 98% de los lotes.

La dieta libre de grasa en las doce horas anteriores favorece la no presencia macroscópica de grasa en el sobrenadante. Pero la no observancia de esta indicación puede ocasionar una impureza en el PA (principio activo)

II.II.a.4) Control del principio activo

-Especificaciones (Tabla 13)

Parámetro	Método	Valores de Aceptación
Acelular	Contador celular	0%
Factores crecimiento	Citometría	EGF(ng/ml) TGF-β(ng/ml)
Albúmina Igs Fibronectina	Espectrofotometría Inmunonefelometría ELISA	Albúmina Igs (A,G,M) Fibronectina
Vitamina A, E	HPLC	Vitamina A,E (µg/dl)
Esterilidad	Cultivo estándar aerobios, anaerobios hongos	Negativo
Riesgo de transmisión	Detección enfermedades transmisibles	Negativo

Tabla 13.- Especificaciones del principio activo



-Procedimientos analíticos

Los procedimientos analíticos se realizaron en las dependencias del CRTS referidos al conteo celular, citometría de flujo y los análisis cuantitativos de otros componentes del colirio como vitamina A, E y fibronectina. Se llevaron a cabo en las dependencias del Laboratorio de Análisis Clínicos del H. Carlos Haya, donde están implantadas las normas BPL así como, los controles de esterilidad. La albúmina sérica e Inmunoglobulinas se cuantificaron en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.

-Validación de los procedimientos analíticos

Los procedimientos de conteo celular y condiciones de centrifugación, están validados desde el año 1999. El procedimiento de citometría en cuanto a factores de crecimiento se está validando de forma concurrente en este momento. Los de laboratorios externos están validados al tener implantados las BPL.

-Análisis de lotes (tabla 14)

Lotes	Fecha producción	Uso
01-Autólogo 02-Autólogo	1999	Puesta a punto método de producción Caracterización/estudios preclínicos
03-Heterólogo 04-Heterólogo	2000	Puesta a punto método de producción Caracterización/estudios preclínicos
600-lotes Autólogo	1999-2012	Clínico asistencial
56-lotes Heterólogo	2000-2012	Clínico asistencial

Tabla 14.- Lotes

-Justificación de las especificaciones

Potencia. Se determina para medir la consistencia entre lotes y para intentar correlacionar su valor en los diferentes lotes con la actividad clínica. Cuando se tenga suficiente experiencia de producción se establecerá un valor o rango de valores de aceptación de lotes más preciso. En este momento el cálculo está establecido de forma empírica basada en la bibliografía.

Esterilidad. El producto aunque es vía tópica tiene que ser estéril, controlado en todas las etapas del proceso

Test de enfermedades transmisibles: Minimizar el riesgo residual de transmisión de agentes infecciosos

II.II.a.5) Estándares o materiales de referencia

No aplica

II.II.a.6) Sistema de cierre y envasado

En colirios autólogos no es aplicable, se prepara el producto terminado a continuación de la obtención del principio activo.

En colirios heterólogos, el principio activo se congela a -80°C en la fuente heteróloga de donante de sangre periférica. Para ello se utilizan criotubos de 4mL de polipropileno Nunc®, estériles, con cierre de rosca con el dispositivo externo, identificados con el número de lote y la fecha.

II.II.a.7) Estabilidad

Para la congelación a -80°C del principio activo se ha establecido un plan de estabilización basado en los tiempos teóricos según distintos autores sobre la actividad del colirio en periodos de almacenamiento. Este rango ha sido de un año a -80°C (Denese C, 2015)

En nuestro estudio hemos realizado determinación de factores EGF y TGF- β 1, vitaminas A y E, albúmina, IgG, IgM, IgA y fibronectina, al inicio y tras largo período de almacenamiento (7º mes)

II.II.b) PRODUCTO TERMINADO

II.II.b.1) Descripción y composición del Producto Terminado

El producto terapéutico es una dilución al 20% de suero sobre una solución salina fisiológica estéril (BSS®). Cada vial contiene 15 mL de colirio al 20% elaborado de forma aséptica

II.II.b.2) Desarrollo farmacéutico

-Componentes del medicamento

Principio activo

Sustancias activas que se encuentran en los colirios suero autólogo, heterólogo de donante de sangre periférica

- El Factor de Crecimiento Epitelial (EGF) que acelera el proceso de migración de las células epiteliales contando con efectos antiapoptóticos.
 - El Factor β Transformante del Crecimiento de Fibroblastos (TGF- β), implicado en los procesos de reparación epitelial y estromal.
 - El Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), su isoforma AB, es activado intracelularmente mientras que es secretado por los gránulos alfa de las plaquetas y, favorece la mitosis y la cicatrización.
 - La vitamina A parece prevenir los procesos de metaplasia escamosa epitelial.
 - Proteínas como la albúmina, con actividad antiapoptótica y la α 2-macroglobulina, con actividad anticlagenasa.
 - La fibronectina es uno de los factores de mayor importancia en la migración celular.
 - Factores neuronales: sustancia P y el Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 (IGF1), implicados en la migración y adhesión del epitelio corneal.
 - IgG, lisozima y factores del complemento, los cuales aportan efecto bacteriostático y bactericida.
- (No todos han sido determinados en las muestras del estudio)

Excipientes

Solución estéril de irrigación BSS®. Cada mL contiene: cloruro sódico (NaCl) 0,64%, cloruro potásico (KCl) 0,075%, cloruro cálcico dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,048%, cloruro magnésico hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,03%, acetato sódico trihidratado ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0,39%, citrato sódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,17% hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH, y agua para inyectables. El BSS es una solución esencialmente sin tamponar. Capacidad tamponada acida=0,0014 M/L/pH. Capacidad tamponante básica= 1.9×10^{-5} M/L/pH.

-Desarrollo de la formulación

Si bien la solución salina tiene múltiples presentaciones con variables de volumen y dosificadores, se ha elegido ésta por ser por sí misma sin incluir el principio activo una presentación especialmente indicada para oftalmología, por el excipiente en sí y por el formato del envase que va a servir para darle forma al producto terminado.

-Sobredosificación: No se utiliza sobredosificación.

-Propiedades físico-químicas y biológicas: Irrigación de los tejidos del ojo

-Desarrollo del proceso de fabricación

El proceso de producción del producto terminado consiste en la preparación al 20% del suero sobre un vial de BSS® de 15 mL al que se le habrá extraído 3 mL de la solución y se ha sustituido por 3 mL del suero.

-Sistema de envasado

Para el envasado de los colirios se utilizan envases dosificadores, acondicionados para uso oftálmico, con las siguientes propiedades:

- Aíslan el contenido
- Impermeables al oxígeno y otros gases como vapor de agua para evitar contaminación
- No deben interactuar con el contenido sin fenómenos de adsorción o retención de moléculas.
- Adaptados en cuanto a resistencia mecánica, que permitan instilar gotas con un volumen máximo de 30-50µl.
- La última característica que debe tener el envase es que sea opaco, para evitar la degradación de la vitamina A. Ésto se suple envolviendo el frasco en papel de aluminio.
- Frasco Drop-Tainer® de 15 mL Lab Alcon, con adaptador para cánulas de irrigación con conector Luer-Lok® Becton, Dickinson.
- Se utiliza este envase por ser el continente de la propia solución de solución salina estéril y así evitar más manipulación, con el consiguiente riesgo de contaminación

-Características microbiológicas

El envase junto al contenido de solución salina es estéril mediante técnica por vapor. Se entiende que permanece así desde su fabricación si se observan antes de su uso las siguientes advertencias:

- No utilizar si el producto no es transparente, el cierre no está intacto o el envase está deteriorado
- No utilizar si se ha roto el precinto de esterilidad.
- No utilizar si se ha alterado el color del producto o si contiene precipitado.
- Utilizar para un solo paciente

-Compatibilidad

El colirio es estable en estos envases 21 días en condiciones de frío a 4°C, según demuestra nuestra experiencia previa realizada en un histórico asistencial de 618 pacientes desde el año 1999. El proceso ha sido validado de forma concurrente, estableciendo esta media. Si bien en la literatura este periodo es variable según los autores: 1 mes (Tsubota K, 1999), 10 días (Geerling G, 2004), 7 días (García Lozano I, 2011). Hay autores que proponen el uso de monodosis diarias tras medir la degradación de la sustancia P (factor de crecimiento) a las 24 horas (Bradley JC, 2009), (Maclennan S, 2008)

II.II.b.3) Fabricación

-Fabricante

Banco Sectorial de Tejidos

Centro Regional de Transfusión Sanguínea, Málaga

-Definición de Lote

Se consideró un lote de producto terminado, al colirio elaborado a partir de 40 mL de sangre de paciente/ donante, diluidas al 20% en solución salina estéril. De un lote de principio se obtuvo una media de 5 viales del mismo lote de producto terminado, correspondiente a 40 mL. Para los heterólogos de donantes se considera el mismo lote a los viales que se han obtenido de un mismo donante que pueden servir para varios pacientes. En este estudio se han utilizado 5 lotes distintos correspondientes a cinco donantes altruistas de sangre.

-Descripción del proceso de fabricación y control

Una vez decantado el principio activo y de forma aséptica se preparan los colirios en campana de flujo laminar (Grado A), sobre viales de BSS® al 20%

-Control de las etapas críticas e intermediarios

El proceso de producción del producto terminado consistió en la introducción sobre la solución salina fisiológica estéril de 3mL de suero/plasma y le eliminación de la misma cantidad de solución de BSS®. En este proceso se comprobaron de nuevo las características del BSS® que nos van a certificar la esterilidad y el aspecto físico del suero/plasma. Se realizó control microbiológico del colirio preparado.

-Validación y/o evaluación del proceso de producción

El proceso de producción se validó de forma concurrente en una muestra inicial al comienzo del proceso de fabricación (Año 1999). Se han ido realizando validaciones concurrentes anuales hasta este momento.

II.II.b.4) Control de excipientes

-Especificaciones

Solución estéril de irrigación BSS®. Cada mL contiene: cloruro sódico (NaCl) 0,64%, cloruro potásico (KCl) 0,075%, cloruro cálcico dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,048%, cloruro magnésico hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,03%, acetato sódico trihidratado ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 0,39%, citrato sódico dihidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,17% hidróxido sódico y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH, y agua para inyectables. BSS es una solución esencialmente sin tamponar. Capacidad tamponada acida=0,0014 M/L/pH. Capacidad tamponante básico= 1.9×10^{-5} M/L/pH.

-Procedimientos analíticos: Realizados por Lab.Alcon

-Validación de los procedimientos analíticos: Realizados por Lab.Alcon.

-Justificación de las especificaciones: La indicada por el fabricante de BSS Alcon.

-Excipientes de origen humano o animal: No contiene excipientes de origen humano o animal, es el propio suero humano el principio activo.

-Excipientes nuevos: Ninguno.

II.II.b5) Control del producto terminado

-Especificaciones del producto terminado

Parámetro	Método	Valores de aceptación
Aspecto	Observación directa	Transparente ausencia de hemólisis, ligeramente amarillo
Aislado	Observación directa	Cubierto en su totalidad con papel aluminio
Etiquetado	Observación directa	Cumplimentada según normativa vigente
Esterilidad microbiológica	Cultivo estándar aerobios anaerobios hongos	Negativos

Tabla 15.- Especificaciones del producto terminado

-Procedimientos analíticos

Aspecto: Se mide poniendo el vial al trasluz antes de aislarlo y etiquetarlo.

Aislado y etiquetado: Visualización del vial y adherencia de la etiqueta

Esterilidad microbiológica: Consideramos el colirio como un producto biológico procedente de sangre total y tratado como un hemoderivado, la legislación que aplica es la del RD. 1088/2005, de 16 de septiembre. Este control se realiza derivando la muestra a un laboratorio de referencia con técnicas validadas para detección de aerobios, anaerobios y hongos.

-Validación de los procedimientos analíticos: Los mismos que en el principio activo.

-Análisis de lotes: Igual al principio activo.

-Caracterización de las impurezas: Igual al principio activo.

-Justificación de las especificaciones: Igual al principio activo.

-Estándares o materiales de referencia: No aplicable.

-Sistema de cierre y envasado

El envasado se realizó como ya se ha establecido anteriormente en frascos Drop-Tainer® de 15 mL Lab Alcon®, con adaptador para cánulas de irrigación con conector Luer-Lok®Becton. Dickinson El cierre se produce acoplado la cánula de irrigación estéril, presionando hasta que esté colocada en su sitio firmemente y enroscar nuevamente.

-Estabilidad

Uno de los problemas más graves del envasado, es la reacción entre el medicamento y el plástico empleado en el envase. Otro es el de adsorción, por retener sobre la superficie plástica agentes solubles del medicamento envasado. Esto adquiere mayor significado en el caso de las células con capacidad para adherirse; al no tener este preparado contenido celular, este concepto se puede obviar.

La estabilidad del producto terminado viene determinada por:

1. Materia prima. Previo a la centrifugación: dos horas mínimo para favorecer la retracción del coágulo (autólogo) y 12 (horas heterólogo) y optimizar concentración de factores:

a) EGF, TGF- β , PDGF-AB, Albúmina

- a 4°C 21 días
- a -80° C 12 meses.

A 37° se degradan con rapidez, por lo que es muy importante las normas de entrega al paciente desde la entrega a su casa:

- Rápido
- Envase isotérmico refrigerado

2. Excipientes BSS®:

- Temperatura de almacenamiento: entre 2° y 25°C.
- Tiempo Caducidad: 3 años

3. Producto terminado

- Almacenamiento de 21 días a 4°C.
- Congelado a -80°C 12 meses

Las pautas de estabilización quedan establecidas acorde a lo expuesto por Tsubota en 2008 y nuestra propia validación del proceso

II.III DETECCIÓN DE AGENTES TRANSMISIBLES

Los test para la determinación de HBsAg, anti VIH 1+2-Ag p24 y anti VHC fueron realizados en el autoanalizador PRISMA®. Abbott. Analizador de inmunología automático por quimioluminiscencia.

El anti-core de VHB se ha realizado mediante el sistema Architect®Abbott de Inmunoensayo. Este analizador tiene un diseño modular que proporciona una estación de trabajo única en la que se pueden procesar a la vez distintos tipos de ensayos mediante un único centro de control para todo el sistema. En el CRTS de Málaga se utiliza además, para la detección de anticuerpos totales en la enfermedad de Chagas, en la sífilis, así como para determinar anticuerpos totales, anti-HTLV.

La técnica utilizada para escrutinio de sífilis fue el RPR (reagina rápida en plasma), cuyo fundamento es que las reaginas plasmáticas, anticuerpos dirigidos contra antígenos no treponémicos, producen agregación con determinados antígenos (cardiolipina, lecitina y colesterol, liberados a la sangre por daño del treponema durante la infección), reacción que se puede determinar macroscópicamente en los estudios de aglutinación. Los reactivos para la determinación de RPR usados forman parte del kit RPR-CARBON Aglutinación, de Biosystems® SA, que contiene partículas de carbón que facilitan la lectura de la aglutinación en microplacas de 96 pocillos, así como control positivo y negativo.

La técnica NAT en muestra única para detección del genoma viral del VHC, VHB y del VIH es un test Ultrio® de la casa comercial Chiron-Novartis. Es un test cualitativo in vitro para detectar ácidos nucleicos de los tres virus.

Evaluación de la seguridad de agentes adventicios

En el caso de colirios autólogos, las fuentes potenciales de agentes adventicios son los reactivos y las manipulaciones. No existen reactivos en la fabricación de colirio que puedan incluir agentes adventicios, si se observan las indicaciones de manejo del laboratorio(BSS® Alcon) por tanto, sólo se podrían incorporar estos agentes en las manipulaciones del proceso.

En caso de fuente de materia prima alogénica el cálculo de riesgo de transmisión sería, aplicando protocolos para evitar riesgo de transmisión de enfermedades de:

1,004/100.000 donantes para virus hepatitis B.

0,237/100.000 donantes para virus hepatitis C.

0,578/100.000 donantes para VIH (Alonso Gil M, 2009)

II.IV. OTRAS DETERMINACIONES

-Factores de crecimiento: EGF y TGF- β 1:

Los valores de EGF y TGF- β 1 se determinaron mediante inmunoensayo de fluorescencia con citometría de flujo en un citómetro Beckman Coulter FC500, empleando el kit FlowCytomix multiplex (eBioscience) (Human TGF- β 1: ref. BMS8249FF y EGF: ref. BMS82070FF). El análisis de los datos se llevó a cabo usando el programa FlowCytomixPro, versión 3.0.

-Vitaminas

Vitaminas A y E: Se determinaron de forma simultánea, mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC (High Performance Liquid Chromatography), con reactivos de Bio-Rad®

-Proteínas:

Fibronectina: valores establecidos mediante el kit ELISA (Platinum ELISA affymetrix, eBioscience, ref.BMS2028). En todos los casos se siguieron las recomendaciones del fabricante.

Albúmina: determinada mediante estudio espectrofotométrico con verde de bromocresol

Inmunoglobulinas IgG, IgM e IgA: Se analizaron en un autoanalizador Vista® mediante Inmunonefelometría.

-Test de inmunohematología: Grupo ABO/ RH y AAI (anticuerpos irregulares)

La realización de los mismos se realizó en el autoanalizador Galileo® de Inmucor con técnica de microplaca.

Los donantes heterólogos de banco fueron seleccionados de grupo AB, pues carecen de aglutininas anti-A y Anti-B en su suero.

Se realizó una determinación de AAI en todos los casos ,para valorar una posible sensibilización en caso de uso en pacientes heterólogos.

II.V. INSTALACIONES Y EQUIPOS

ÁREA DE EXTRACCIÓN	BANCO SECTORIAL DE TEJIDOS	CONTROL DE CALIDAD
Sillón de donación	Centrífuga	Laboratorio de Serología
Balanza agitadora	Campana de flujo laminar en habitáculo de aire tratado (Grado D)	Laboratorio de Bioquímica
Jeringas estériles MCE	Pipetas con puntas estériles	Laboratorio de Microbiología
Ligadura	Tubos de cristal graduados/criogénicos estériles	Laboratorio de Inmunoematología
Códigos de barras	Solución BSS®	Laboratorio de Citometría
Aplicación informática	Contenedores individuales refrigerados	
Bolsa estéril de donación de sangre	Congelador eléctrico -80° y -20°C	

Tabla 16.- Instalaciones y equipos

II.VI. ANÁLISIS DE LAS VARIABLES Y ESTUDIO ESTADÍSTICO

Todos los datos han sido informatizados y analizados mediante el programa estadístico **R Studio versión 3.1.2.**

II.VI.a) ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA: VARIABLES NUMÉRICAS Y CUALITATIVAS.

Inicialmente, se procedió a un estudio descriptivo de los datos obtenidos para las siguientes variables cualitativas: sexo, menopausia y utilización de tratamiento previo con suero autólogo, además de para la variable cuantitativa edad.

Este análisis permitió obtener el total de ojos estudiados relativo a cada uno de los grupos que forman dichas variables no numéricas.

Mediante el test no paramétrico chi-cuadrado para igualdad de proporciones con corrección de continuidad se comprobó la homogeneidad de los grupos para las variables no numéricas edad, sexo, menopausia y empleo de suero autólogo previo; de cara a la fiabilidad de los test aplicados posteriormente.

A continuación se realizó un estudio descriptivo de los datos obtenidos como resultado de las distintas pruebas oftalmológicas realizadas, todas ellas tomadas como variables de carácter numérico o cuantitativo. El mismo procedimiento fue realizado para las variables numéricas de cuantificación de los sueros.

II.VI.b) INFERENCIA ESTADÍSTICA: VARIABLES CUANTITATIVAS

II.VI.b.1. Pruebas oftalmológicas realizadas al paciente

El conjunto de variables cuantitativas del estudio incluye la agudeza visual (AV), Test de Schirmer, Tiempo de ruptura lagrimal (BUT), Tinción con Fluoresceína, Verde Lisamina y Cuestionario. Cada una de las variables fue medida para dos tratamientos distintos y en tres momentos diferentes dentro del mismo tratamiento.

Los resultados obtenidos para dichas pruebas han sido sometidos a un estudio estadístico empleando un *test ANOVA de un factor con medidas repetidas* en el mismo. Los resultados de la variable dependiente y cuantitativa considerada fueron los tomados para cada una de las pruebas oftalmológicas realizadas a los pacientes, mientras que el factor, como variable de tipo cualitativo, fue el tiempo.

El tratamiento es un factor que varía entre sujetos, dado que a cada sujeto se le asigna un único valor para este factor, mientras que el tiempo es un factor que varía dentro de los sujetos, de modo que es medido varias veces para el mismo sujeto. Por ello, el ANOVA aplicado es de medidas repetidas en un solo factor, tiempo.

El único supuesto necesario para la aplicación de este tipo de test es el de esfericidad, suponiendo que las varianzas de las diferencias entre todos los pares de medidas repetidas sean iguales. Para evaluar la esfericidad en cada caso se empleó el *test de Mauchly*, cuya hipótesis nula afirma la esfericidad y su alternativa, la niega.

En los casos en los que los datos violaron la condición de esfericidad, se empleó la corrección de Greenhouse-Geisser y la de Huynh-Feldt, que condujeron a un factor de corrección aplicado a los grados de libertad usados para evaluar el valor de F obtenido.

Con el objetivo de comparar los sueros autólogo y heterólogo sobre los resultados de la prueba, se empleó la alternativa no paramétrica al t-test para muestras no emparejadas, el *contraste de la suma de rangos de Wilcoxon*, equivalente al test U de Mann-Whitney. El requisito más importante para emplear un t-test es que las distribuciones de las poblaciones de las cuales se muestrea sean normales. Dado que $n < 30$, no se pudo invocar al Teorema Central del Límite (TCL) y por tanto, no se asumió la normalidad, por lo que se emplearon las alternativas no paramétricas en lugar de los clásicos test paramétricos para la comparación de dos medias.

II.VI.b.2. Cuantificaciones analíticas realizadas en los sueros

El conjunto de variables cuantitativas medidas como cuantificaciones analíticas de los sueros se compone de Albúmina Sérica, IgA, IgG, IgM, Vitamina A, Vitamina E,

EGF, TGF y Fibronectina. Cada una de las variables fue medida para las muestras de suero autólogo y heterólogo al comienzo del estudio. Los resultados obtenidos para dichas pruebas han sido sometidos a un estudio estadístico empleando un test para contrastar la hipótesis nula de igualdad de medias entre dos grupos.

Las medias a comparar fueron los resultados de las cuantificaciones analíticas anteriormente descritas y los grupos a comparar, suero autólogo y heterólogo.

Conociendo que las muestras provenientes de ambos grupos son independientes, se procedió a la aplicación de una prueba t de Student para la comparación de dos medias con muestras no emparejadas. Para la aplicación de la t de Student se requiere que la distribución de la variable cuantitativa sea normal en ambos grupos de comparación. Cuando no se cumplen los criterios de normalidad, se utilizan test no paramétricos, tal como la prueba de Mann-Whitney para el caso de muestras independientes. Ante esta situación, se realizó un test de normalidad basado en un test de Shapiro-Wilk, con el objetivo de comprobar si el test a aplicar es de tipo paramétrico o no paramétrico. En general, este test está influenciado por el tamaño de la muestra. Para muestras muy pequeñas, no se detectan incluso grandes desviaciones de la normalidad, por lo que la prueba se reforzó con un gráfico Q-Q (cuantil.cuantil).

Para todas las determinaciones se concluyó con ausencia de normalidad en la distribución, por lo que se emplearon *test no paramétricos*.

II.VII. TRATAMIENTO BIBLIOGRÁFICO

Como fuentes bibliográficas se ha utilizado las bases de datos MEDLINE y COCHRANE, además de capítulos de libros de últimas ediciones y manuales vigentes.

Todas las citas bibliográficas se encuentran referenciadas según las normas de Vancouver

III.RESULTADOS

La distribución por grupos resultó de la siguiente forma:

- a) AUTÓLOGO: 16 pacientes con un total de 32 ojos. De los pacientes incluidos no finalizan el estudio 3 (6 ojos) cuyas causas de abandono son la no recogida del tratamiento en 2 casos y no presenciarse en las revisiones en 1 caso. Por tanto, para el estudio estadístico este grupo cuenta con 13 pacientes, 26 ojos.
- b) HETERÓLOGO: 14 pacientes, 28 ojos, de los cuáles un paciente (2 ojos) no acudió a recoger el colirio; por tanto llegan al final del estudio y se incluyen en el análisis estadístico 13 pacientes, 26 ojos.

La totalidad de los pacientes en ambos padecían enfermedades autoinmunes asociadas al ojo seco

En relación a la existencia o no de enfermedades autoinmunes asociadas, teniendo en cuenta aquellos pacientes que completaron el estudio, la distribución encontrada fue la siguiente: 9 pacientes (18 ojos) en grupo de suero autólogo (69,23 %) y 8 pacientes (16 ojos) en grupo de suero heterólogo (61,53 %). Las patologías autoinmunes fueron: enfermedad de Raynaud, Artritis reumatoide, tiroiditis de Hashimoto, Lupus eritematoso sistémico y Sarcoidosis.

III.I. VARIABLES CUALITATIVAS Y EDAD

III.I.a) Análisis descriptivo

La media de edad en el grupo de suero autólogo fue de 58.15 años, con desviación estándar(SD)=12.18 y rango comprendido entre 44 y 88 años. En el grupo de suero heterólogo la media de edad fue de 59.23 años, con SD=17.21 y rango de 26 a 79 años.

En relación al sexo de los pacientes fue del 100% mujeres en el grupo autólogo y 78.57% mujeres y 21.43% hombres en el grupo heterólogo. Ésta distribución era esperable previamente al estudio, ya que el ojo seco es una patología de mayor prevalencia en mujeres (Mrugacs M, 2013)

En relación a la variable menopausia, de importancia por la influencia del estado hormonal en la severidad del ojo seco (Mrugacs M, 2013) encontramos la siguiente distribución por grupos: 10 de 13 pacientes (20 ojos) en suero autólogo (76.92%) y 7 de 10 pacientes (14 ojos) en suero heterólogo, ya que se tuvo en cuenta sólo a las mujeres (70%)

En relación al empleo de suero autólogo previo al tratamiento obtuvimos que el 30.77% de los pacientes del grupo de suero autólogo y el 7.69% del grupo heterólogo lo recibieron previamente al estudio.

III.I.b) Inferencia estadística

Tras el análisis de las variables dio como resultado las homogeneidad de los grupos de estudio (suero autólogo y heterólogo) en cuanto a su distribución por edad, sexo, menopausia y utilización previa de suero autólogo (tabla 17)

Variable	X ²	p-valor	IC (95%)
Sexo (mujeres)	1,51	0,22	-0,54 a 0,07
Edad	0,15	0,69	-0,61 a 0,3
Menopausia	0	1	0,5 a 0,36
Suero autólogo previo	0,99	0,32	-0,50 a 0,3

Tabla 17.- Resumen estadístico de las características basales de la muestra

III.II) VARIABLES CUANTITATIVAS

III.II.a) PRUEBAS OFTALMOLÓGICAS REALIZADAS AL PACIENTE

III.II.a.1) Análisis descriptivo

AGUDEZA VISUAL			TEST DE SCHIRMER			BUT			FLUORESCEINA			VERDE LISAMINA			CUESTIONARIO		
V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃
0,6	0,6	0,7	0	22	15	3	4	7	3	3	1	2	3	2			
0,4	0,4	0,7	5	19	23	5	5	8	3	3	2	2	3	1	43	13	7
1	0,6	0,8	0	1	3	2	3	7	3	3	2	3	3	3	39	21	30
1	0,8	0,8	0	1	2	2	5	6	3	3	2	3	3	3			
0,4	0,4	0,4	4	15	7	4	7	5	7	1	1	3	2	0	31	21	14
0,1	0,1	0,2	4	7	6	3	8	6	7	1	1	3	2	0			
1	0,9	1	4	4	2	3	6	9	2	1	0	3	1	2	45	45	37
0,8	0,9	1	5	6	5	5	6	8	2	1	1	3	1	1			
0,8	0,8	0,8	2	8	3	5	4	5	1	2	2	5	0	1	33	56	45
0,4	0,8	0,8	3	18	4	6	3	5	1	1	2	3	2	1			
1	1	1	5	18	17	5	5	8	4	2	2	2	1	2	41	33	28
1	1	1	4	12	10	5	6	6	4	2	2	2	1	2			
0,25	0,25	0,3	2	2	2	4	3	3	3	3	5	4	3	4	27	26	20
0,8	0,8	0,8	4	2	1	4	4	3	3	3	5	6	3	5			
0,6	0,8	0,9	1	1	1	2	3	6	4	4	2	4	3	7	51	33	29
0,6	0,5	0,8	0	1	1	2	2	7	4	5	4	6	3	8			
0,9	0,9	0,9	12	12	12	2	3	3	2	1	1	2	2	2	52	17	11
1	1	1	10	18	8	1	4	3	2	1	1	3	5	3			
0,5	0,9	0,7	3	3	7	3	6	7	3	1	1	3	3	2	57	17	50
0,6	0,8	0,8	2	2	6	2	10	6	3	1	2	4	4	1			
0,3	1	1	5	25	12	5	9	10	2	1	0	2	2	1	43	42	40
0,15	1	1	10	24	16	4	8	9	2	2	1	3	0	1			
1,2	1	0,9	25	3	12	5	10	10	2	1	0	2	2	0	41	40	25
0,9	1	1,2	22	6	23	4	10	10	2	1	1	2	2	0			
0,05	0,15	0,3	0	1	1	4	3	6	3	2	2	6	3	6	37	30	7
0,8	1	1	0	3	2	3	5	3	3	1	2	6	2	6			

Tabla 18.- Descriptivo pruebas oftalmológicas grupo de suero autólogo en las diferentes visitas (V₁, V₂ y V₃)

		Media	Mediana	Desviación estándar
AGUDEZA VISUAL	V ₁	0,67	0,7	0,33
	V ₂	0,82	0,8	0,28
	V ₃	0,86	0,8	0,25
TEST SCHIRMER	V ₁	5,08	4	6,30
	V ₂	9	6	8,17
	V ₃	7,73	6	6,69
BUT	V ₁	3,58	4	1,33
	V ₂	5,46	5	2,44
	V ₃	6,38	6	2,25
FLUORESCEINA	V ₁	3	3	1,44
	V ₂	1,92	1,5	1,13
	V ₃	1,73	2	1,28
VERDE LISAMINA	V ₁	3,35	3	1,38
	V ₂	2,27	2	1,15
	V ₃	2,46	2	2,45
CUESTIONARIO	V ₁	41,54	41,54	8,55
	V ₂	30,31	30,31	12,80
	V ₃	26,38	26,38	14,17

Tabla 19.- Medidas de centralidad y dispersión en grupo suero autólogo en las diferentes visitas (V₁, V₂ y V₃)

AGUDEZA VISUAL			TEST DE SCHIRMER			BUT			FLUORESCEINA			VERDE LISAMINA			CUESTIONARIO		
V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃	V ₁	V ₂	V ₃
1	1	1	2,5	8	2	4	10	18	2	3	1	5	3	1	26	20	27
1	1	1	1	6	2	4	8	12	2	3	1	5	3	2			
1	1	1	4	4	8	5	10	10	1	1	1	3	1	0			
1	1	1	2	4	9	3	13	12	1	1	1	3	1	0	53	47	42
1	1	1	4	8	8	3	7	8	4	2	1	7	2	2			
1	0,9	1	5	7	14	4	5	6	4	3	2	5	3	2	45	38	35
0,8	0,7	0,9	4	1	1	2	7	2	4	2	4	4	2	8			
0,8	0,7	0,8	0	1	1	1	4	3	4	3	4	5	3	8	41	35	43
1	1	1	2	5	12	5	4	4	2	1	2	2	1	2	41	33	18
1	1	1	2	7	9	5	5	6	2	1	1	2	1	1			
1	0,3	0,8	5	5	9	4	6	7	4	3	1	5	5	5	44	40	21
0,8	0,3	0,8	3	3	6	2	4	4	4	2	2	5	4	5			
0,7	0,8	0,6	3	5	5	3	5	6	2	2	1	3	3	3	18	22	21
0,5	0,7	0,7	5	4	4	5	6	4	2	1	1	3	3	2			
1	1	1,2	4	9	10	4	6	10	4	1	1	1	2	1	28	22	18
1	1	1	5	9	19	5	9	7	6	2	2	1	3	3			
0,6	0,7	0,9	1	2	1	5	2	3	4	3	3	7	6	6	48	37	46
0,5	0,6	0,8	3	1	0	4	2	2	4	4	4	7	7	7			
1	1	0,8	2	2	9	5	3	3	2	2	1	2	5	4	40	34	35
1	1	0,8	3	5	9	5	3	4	3	2	1	3	5	3			
0,5	0,8	0,7	5	9	6	5	10	12	2	2	0	3	5	5	21	22	10
0,4	0,7	0,6	4	10	7	6	10	9	2	1	1	2	3	3			
0,4	0,7	0,7	30	25	25	4	7	9	2	1	1	2	0	6	45	29	28
0,4	0,4	0,5	35	35	35	3	3	8	2	2	1	2	0	2			
0,5	1	0,5	3	30	10	5	5	5	1	1	1	2	3	0	59	55	47
0,5	1	0,8	2	20	20	2	6	7	2	1	1	2	2	2			

Tabla 20.- Descriptivo pruebas oftalmológicas grupo suero heterólogo en las diferentes visitas (V₁, V₂ y V₃)



		Media	Mediana	Desviación estándar
AGUDEZA VISUAL	V ₁	0,78	0,9	0,24
	V ₂	0,82	0,95	0,23
	V ₃	0,84	0,8	0,18
TEST SCHIRMER	V ₁	5,36	3	8,13
	V ₂	8,65	5,5	8,89
	V ₃	9,27	8,5	8,06
BUT	V ₁	3,69	4	1,25
	V ₂	6,15	6	2,85
	V ₃	6,69	6,5	3,82
FLUORESCEINA	V ₁	2,77	2	1,27
	V ₂	1,92	2	0,89
	V ₃	1,54	1	1,07
VERDE LISAMINA	V ₁	3,5	3	1,82
	V ₂	2,92	3	1,79
	V ₃	3,19	2,5	2,38
CUESTIONARIO	V ₁	38,92	38,92	11,99
	V ₂	33,38	33,38	10,49
	V ₃	30,08	30,08	12,15

Tabla 21.- Medidas de centralidad y dispersión en grupo suero heterólogo en las diferentes visitas (V₁, V₂ y V₃)

III.II.a.2) Inferencia estadística

Test 1: Agudeza visual (AV)

En relación a la variación en el tiempo de la agudeza visual se pudo afirmar con una $p=6.31 \times 10^{-4}$ y confianza del 95% que existen diferencias significativas entre las medias de los resultados de la misma para las tres visitas en ambos grupos (Gráfico 1), siendo entre la primera y la segunda visita, con una $p=0.02$, así como entre la primera y la tercera visita, con una $p=7.7 \times 10^{-4}$

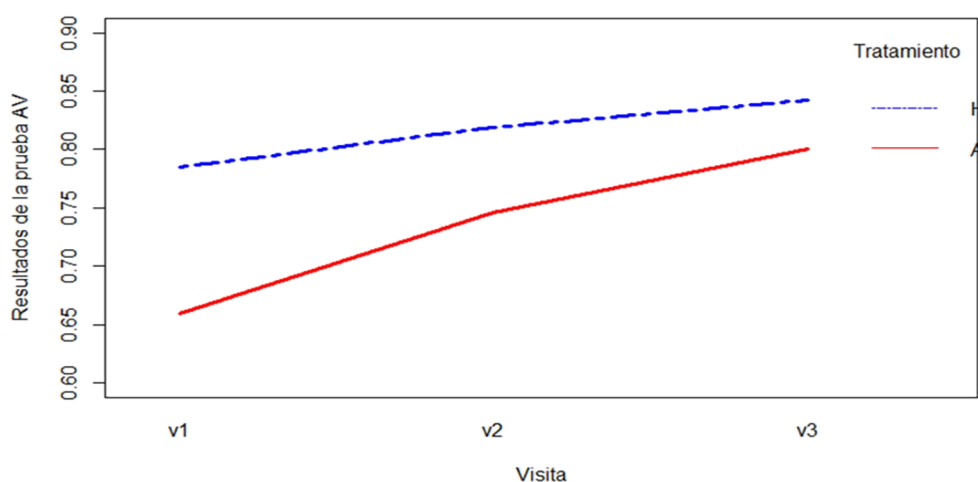


Gráfico 1.- Agudeza visual medida en las tres visitas

(A: autólogo, H: heterólogo)

Todos los valores de p obtenidos para cada visita de la AV en la comparativa entre suero autólogo y heterólogo fueron superiores a 0.05, el nivel de significación, considerándose por tanto que, no existen una diferencias significativas entre ambos tratamientos en relación al resultado de la prueba de AV. La p mostró los siguientes valores en las visitas 1, 2 y 3, respectivamente: $p=0.14$, $p=0.38$ y $p=0.81$ (Gráficos 2, 3 y 4)

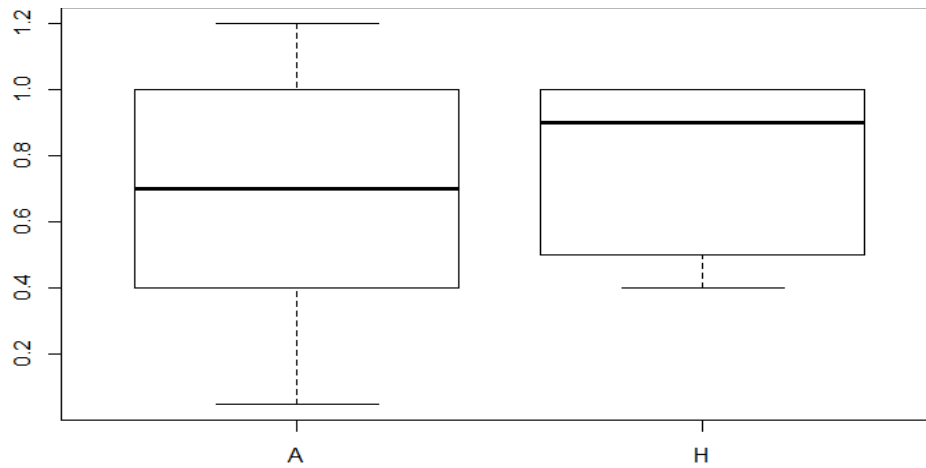


Gráfico 2.- Resultados de la comparativa de agudeza visual en la visita 1 (p=0.14)

(A: autólogo, H: heterólogo)

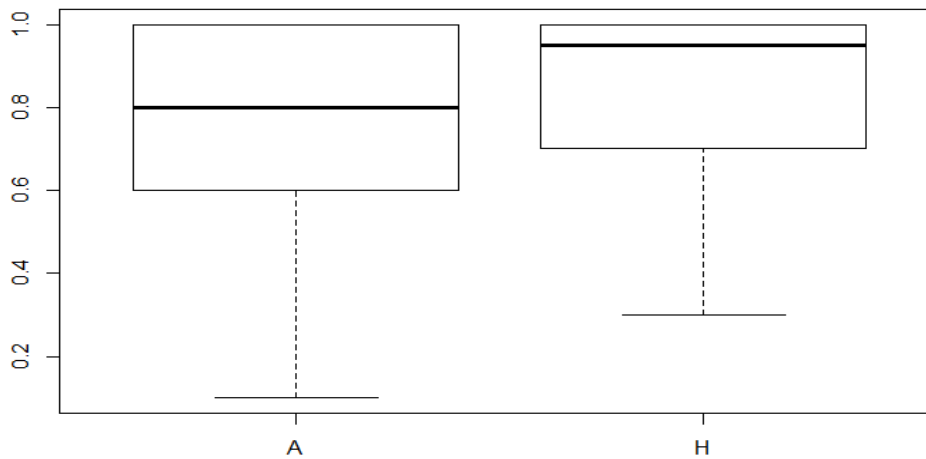


Gráfico 3.- Resultados de la comparativa de agudeza visual en la visita 2 (p=0.38)

(A: autólogo, H: heterólogo)

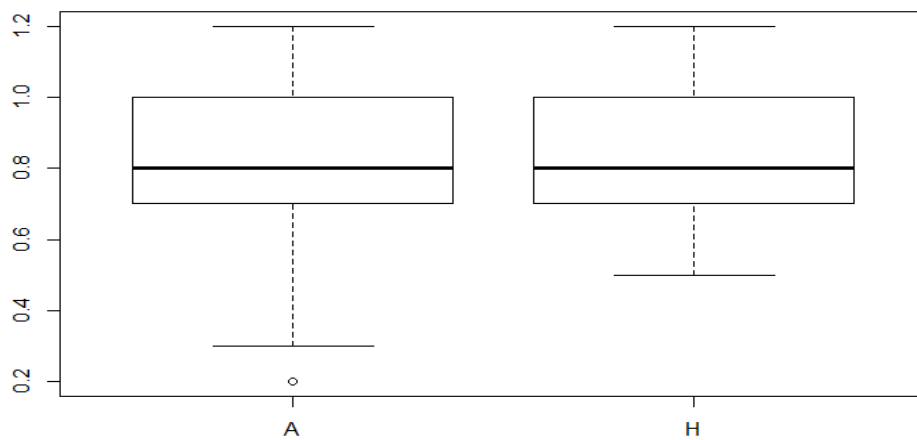


Gráfico 4.- Resultados de la comparativa de agudeza visual en la visita 3 (p=0.81)

(A: autólogo, H: heterólogo)

Test 2: Test de Schirmer

En relación a la variación en el tiempo del test de Schirmer se pudo afirmar con una $p=7.96 \times 10^{-5}$ y un intervalo de confianza del 95% que existen diferencias significativas entre las medias de los resultados del mismo para las tres visitas en ambos grupos, siendo entre la primera y la segunda visita, con $p=5.8 \times 10^{-3}$, así como entre la primera y la tercera visita, con un $p=3.2 \times 10^{-5}$ (Gráfico 5)

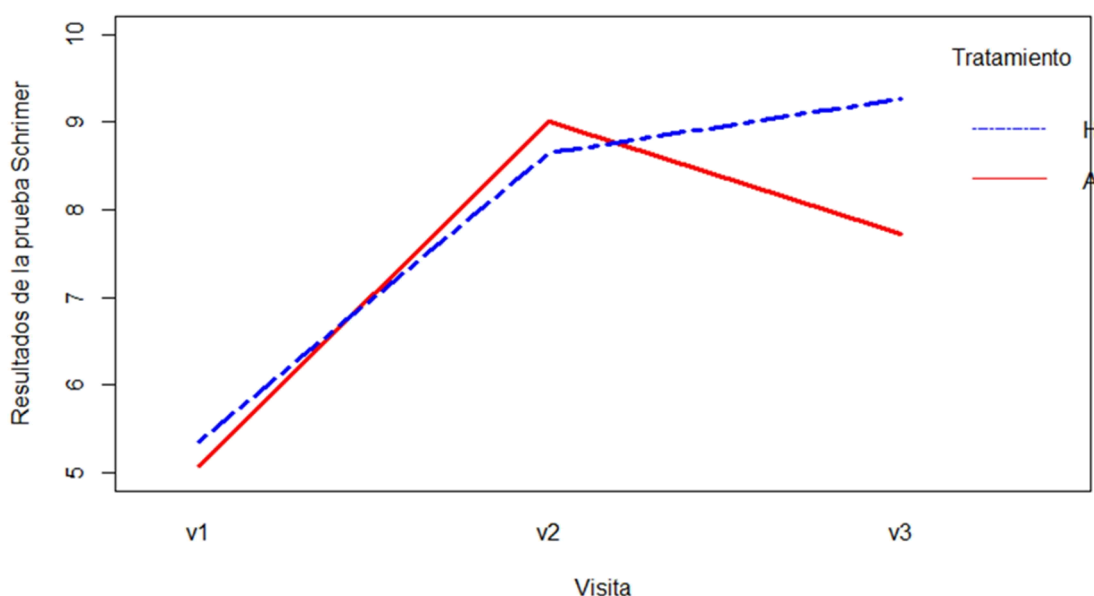


Gráfico 5.- Test de Schirmer (mm) medido en las tres visitas

(A: autólogo, H: heterólogo)

Dado que todos los valores de p obtenidos para cada visita en la comparativa entre suero autólogo y heterólogo fueron superiores a 0.05, el nivel de significación, se consideró que no existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos en relación al resultado de la prueba de Schirmer. La p mostró los siguientes valores en las visitas 1, 2 y 3, respectivamente: $p=0.4$, $p=0.83$ y $p=0.51$ (gráficos 6, 7 y 8)

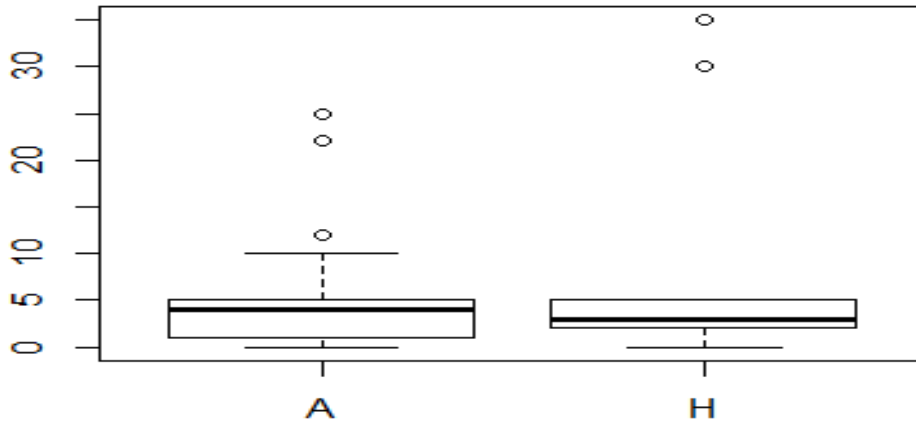


Gráfico 6.- Resultado de la comparativa del Test de Schirmer (mm) en la visita 1 (p=0.4)

(A: autólogo, H: heterólogo)

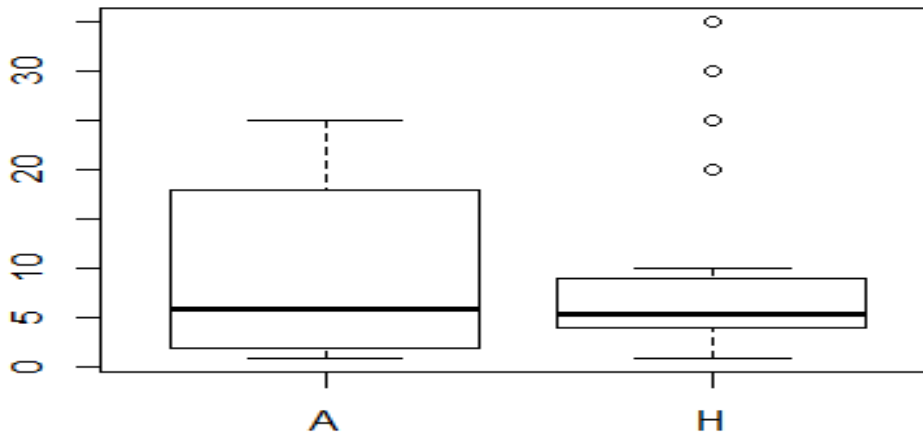


Gráfico 7.- Resultado de la comparativa del Test de Schirmer (mm) en la visita 2 (p=0.83)

(A: autólogo, H: heterólogo)

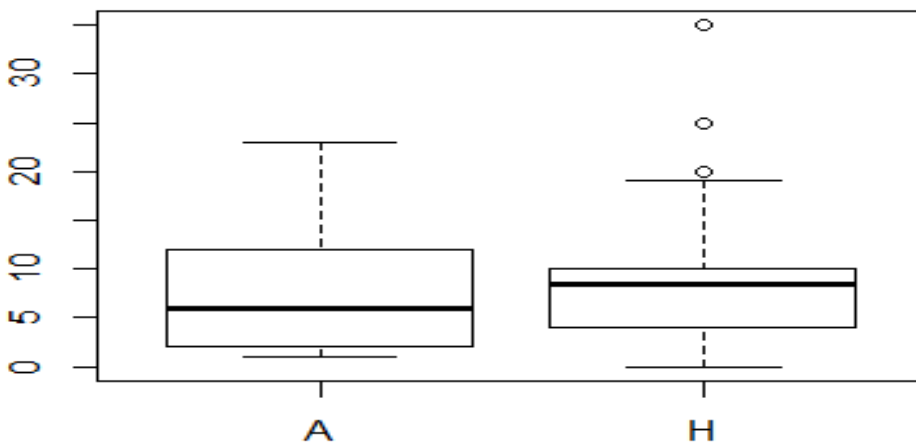


Gráfico 8.- Resultados de la comparativa del Test de Schirmer (mm) en la visita 3 (p=0.51)

(A: autólogo, H: heterólogo)

Test 3: Tiempo de ruptura lagrimal- BUT (Break-up time)

En relación a la variación en el tiempo del BUT se pudo afirmar con un $p=10^{-15}$ y un 95% de confianza, que existen diferencias significativas entre las medias de los resultados de la prueba para las tres visitas (Gráfico 9) Se encontraron diferencias entre la primera y la segunda visita con un $p=1.6 \times 10^{-10}$, así como entre la primera y la tercera visita, con un $p=5.9 \times 10^{-12}$ y entre la segunda y la tercera visita, con un $p=0.04$

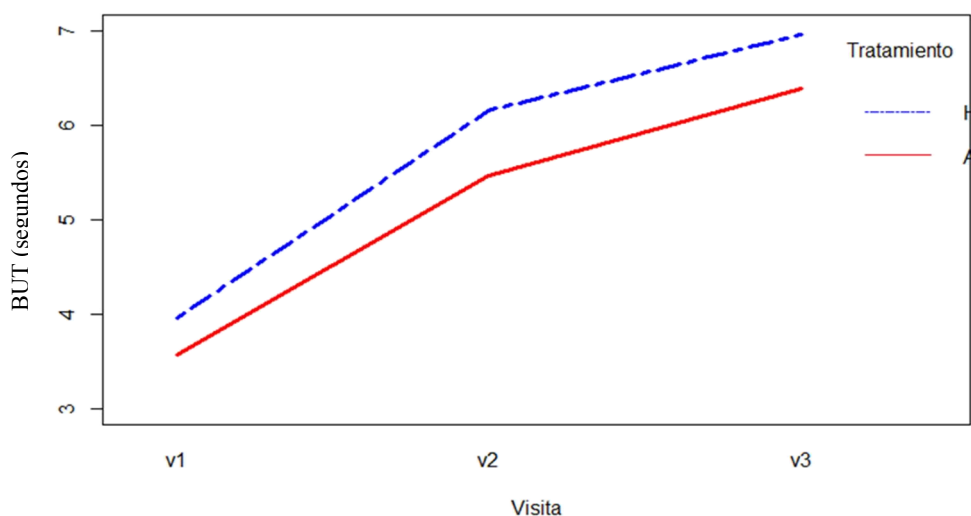


Gráfico 9.- BUT (seg) medido en las tres visitas

(A: autólogo, H: heterólogo)

En la comparativa entre suero autólogo y heterólogo no se han encontrado diferencias significativas entre ambos tratamientos respecto a la prueba de BUT con valores de $p=0.30$, $p=0.38$ y $p=0.82$ para las distintas visitas (Gráficos 10, 11 y 12)

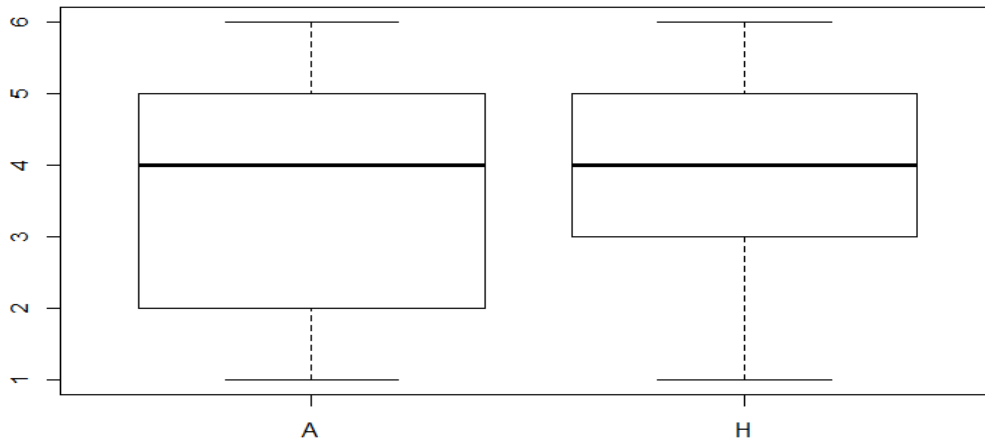


Gráfico 10.- Resultados de la comparativa de BUT (seg) en la visita 1 (p=0.30)

(A: autólogo, H: heterólogo)

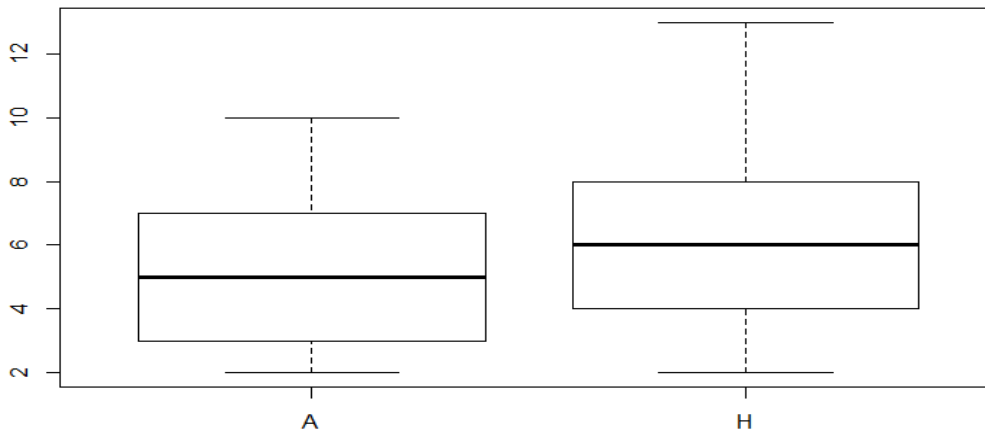


Gráfico 11.- Resultados de la comparativa de BUT (seg) en la visita 2 (p=0.38)

(A: autólogo, H: heterólogo)

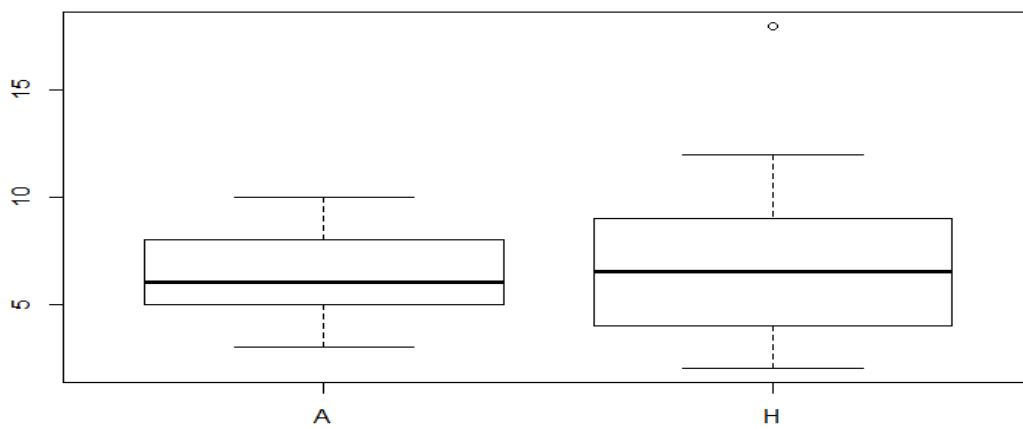


Gráfico 12.- Resultados de la comparativa de BUT (seg) en la visita 3 (p=0.82)

(A: autólogo, H: heterólogo)

Test 4: Tinción con Fluoresceína

En relación a la variación en el tiempo de la tinción con fluoresceína se encontraron diferencias significativas entre las medidas de los resultados de la misma en las diferentes visitas para ambos grupos de tratamiento con un $p=3.8 \times 10^{-13}$ y un 95% de confianza. Se encontraron diferencias significativas entre la primera y la segunda visita con un $p=1.3 \times 10^{-08}$, así como entre la primera y la tercera visita, con un $p=3.2 \times 10^{-10}$ (Gráfico 13)

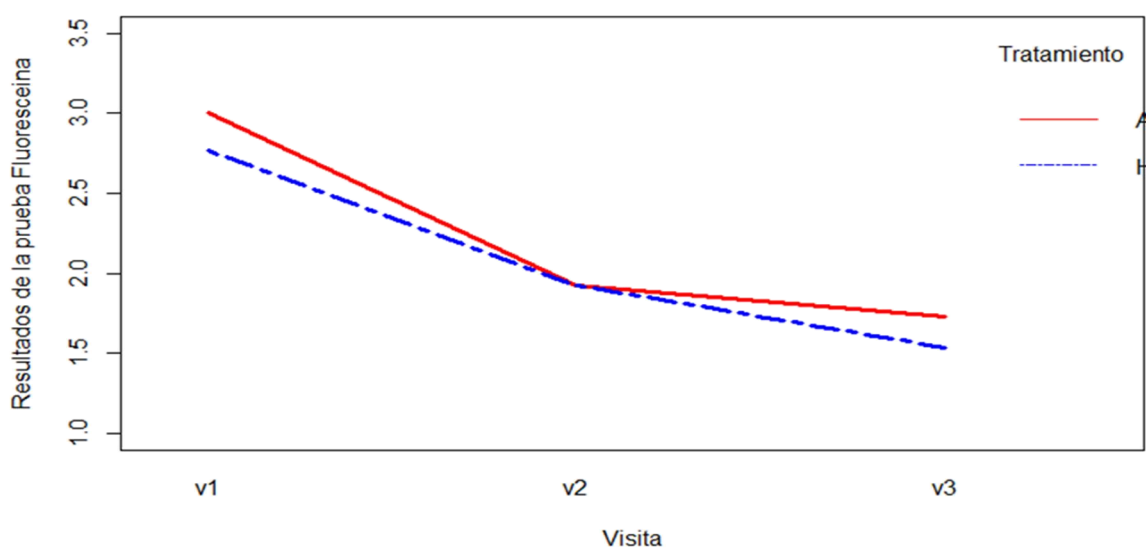


Gráfico 13.- Tinción de fluoresceína medida en las tres visitas

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación al estudio de la tinción de fluoresceína entre suero autólogo y heterólogo no se han encontrado diferencias significativas entre ambos grupos con los siguientes valores de p en las visitas 1, 2 y 3, respectivamente: $p=0.63$, $p=0.75$ y $p=0.37$ (Gráficos 14, 15 y 16)

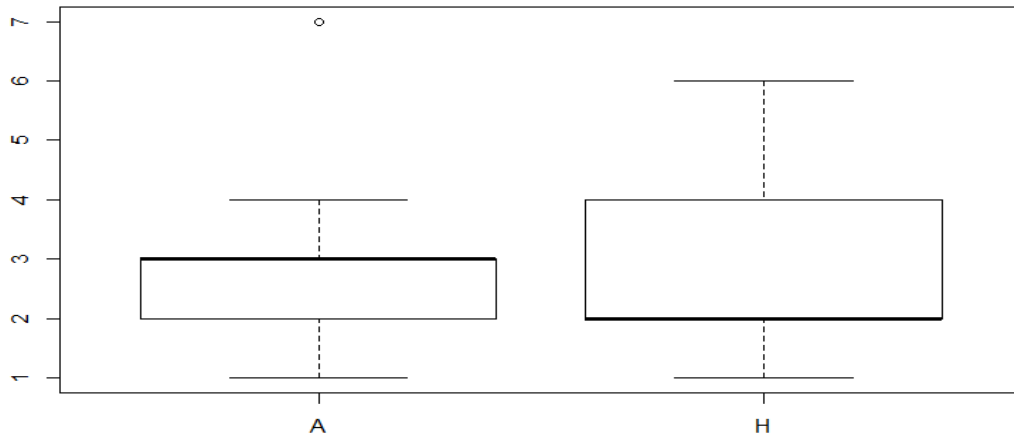


Gráfico 14.- Resultados de la comparativa de fluoresceína en la visita 1 (p=0.63)

(A: autólogo, H: heterólogo)

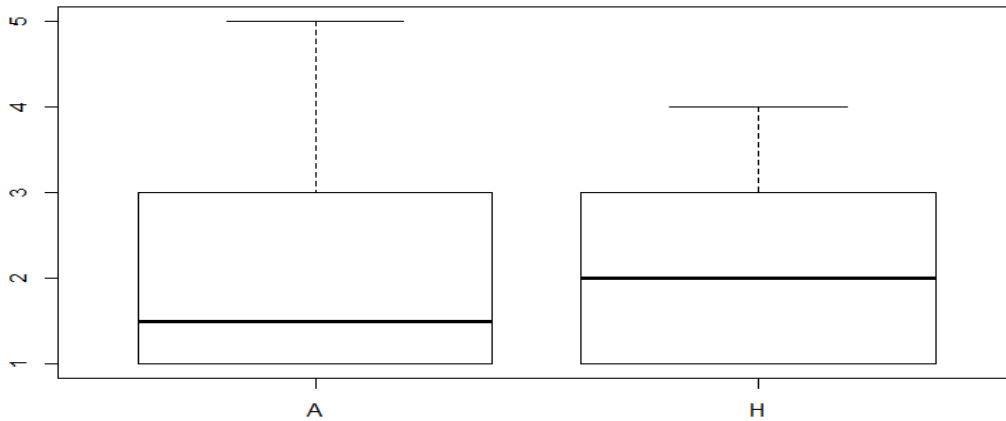


Gráfico 15.- Resultados de la comparativa de fluoresceína en la visita 2 (p=0.75)

(A: autólogo, H: heterólogo)

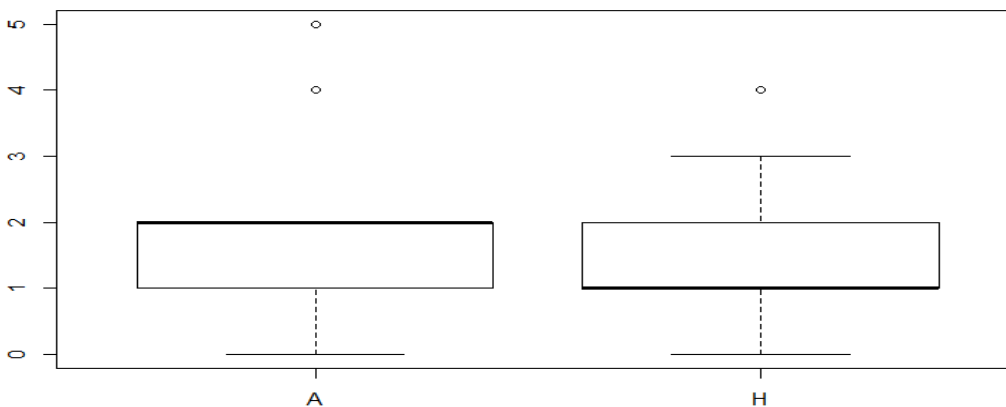


Gráfico 16.- Resultados de la comparativa de fluoresceína en la visita 3 (p=0.37)

(A: autólogo, H: heterólogo)

Test 5: Tinción con Verde de Lisamina

En relación a la variación en el tiempo de la tinción con verde de lisamina los resultados obtenidos permitieron afirmar con un $p=2 \times 10^{-3}$ y un 95% de confianza que sí existen diferencias significativas entre las medias de los resultados de la prueba para las diferentes visitas, encontrándose estas diferencias entre la primera y la segunda visita con un $p=3 \times 10^{-4}$, mientras que no fueron significativas entre la primera y la tercera visita, ni entre la segunda y la tercera visita, obteniendo valores de p mayores al nivel de significación (0.05). (Gráfico 17)

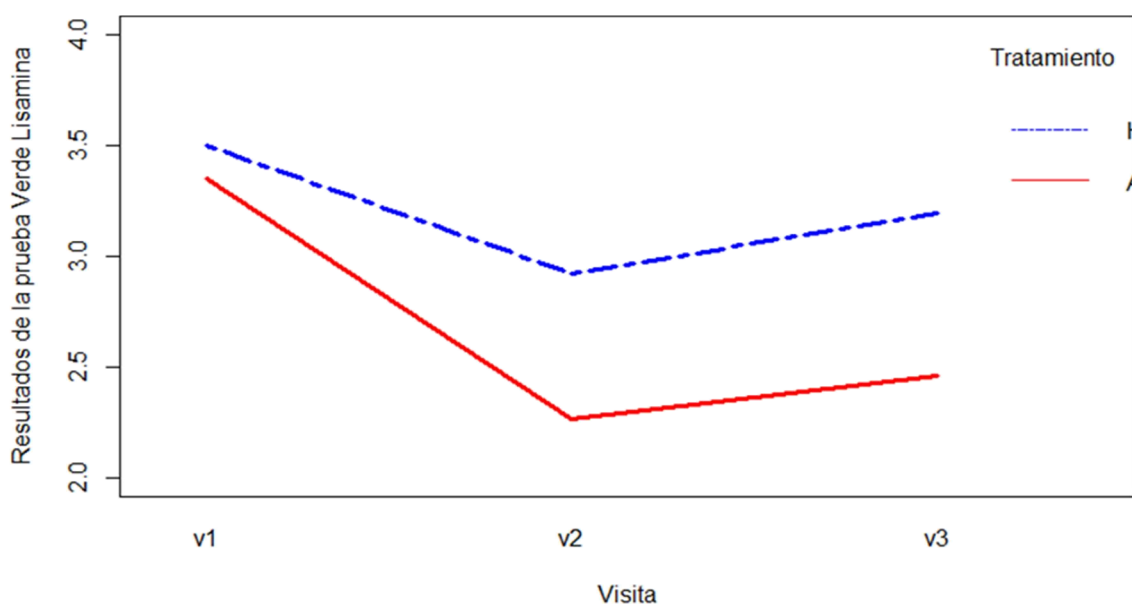


Gráfico 17. Tinción verde de lisamina medida en las tres visitas

(A: autólogo, H: heterólogo)

En la comparativa entre sueros autólogo y heterólogo no se encontraron diferencias significativas entre ambos para la tinción con verde de lisamina, aunque parece apreciarse cierta tendencia por bajos valores de p en la comparativa realizada para las visitas 2 y 3 a favor del suero autólogo. Los valores de p en las visitas 1, 2 y 3, respectivamente fueron: $p=0.98$, $p=0.19$ y $p=0.20$ (Gráficos 18, 19 y 20)

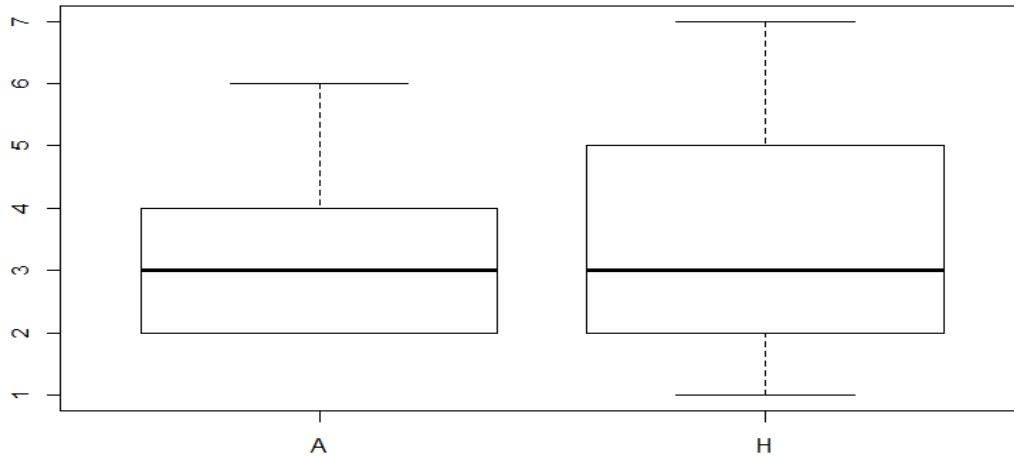


Gráfico 18.- Resultados de la comparativa de verde de lisamina en la visita 1 (p=0.98)

(A: autólogo, H: heterólogo)

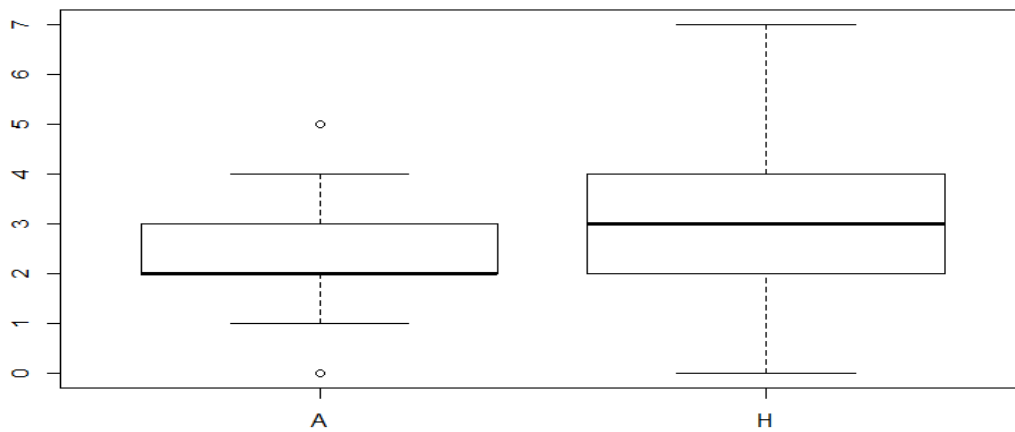


Gráfico 19.- Resultados de la comparativa de verde de lisamina en la visita 2 (p=0.19)

(A: autólogo, H: heterólogo)

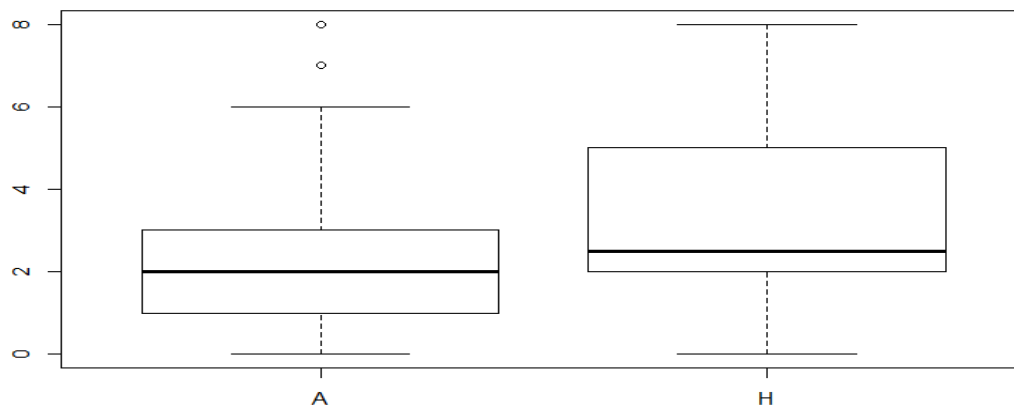


Gráfico 20.- Resultados de la comparativa de verde de lisamina en la visita 3 (p=0.20)

(A: autólogo, H: heterólogo)

Test 6: Realización del Cuestionario

En relación a la valoración del cuestionario se encontraron diferencias significativas entre las medias de los resultados del cuestionario en el tiempo para las tres visitas con una $p = 3.8 \times 10^{-07}$. Se encontraron diferencias significativas entre la primera y la segunda visita con una $p = 4.3 \times 10^{-05}$, así como entre la primera y la tercera visita, con una $p = 1.2 \times 10^{-05} < 0.001$. (Gráfico 21)

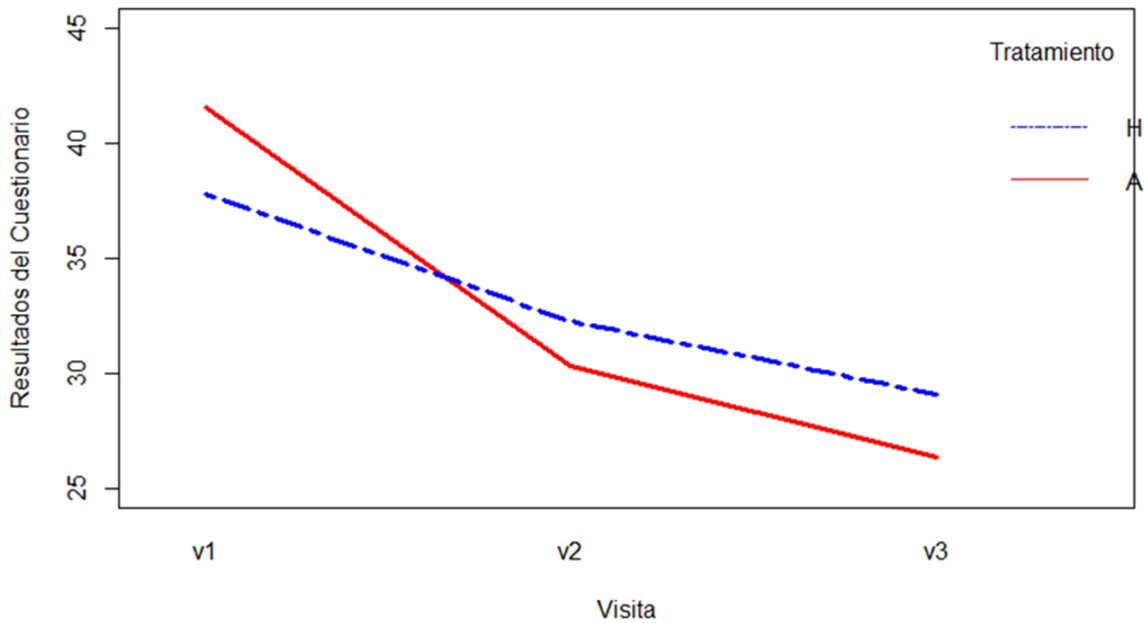


Gráfico 21.- Cuestionario en las tres visitas

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la comparativa entre los sueros autólogo y heterólogo no existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos al analizar los resultados del cuestionario. La p mostró los siguientes valores en las visitas 1, 2 y 3, respectivamente: $p=0.60$, $p=0.55$ y $p=0.70$ (Gráficos 22, 23 y 24)

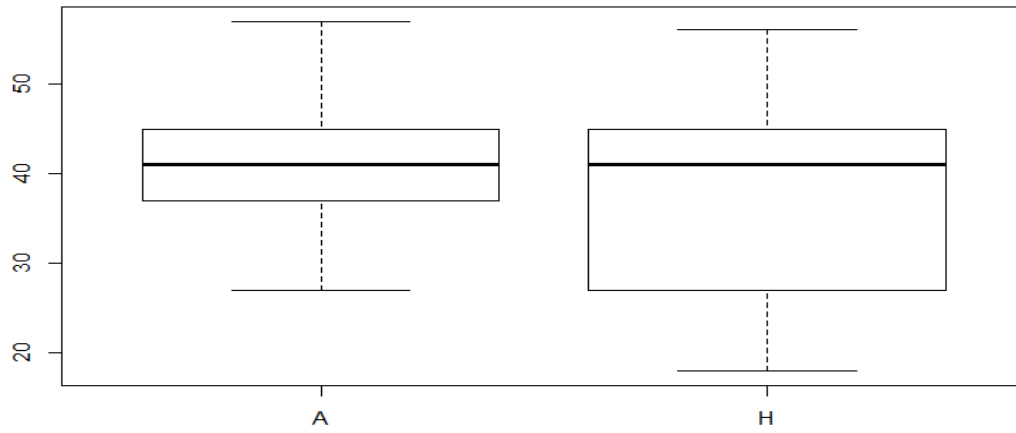


Gráfico 22.- Resultados de la comparativa del cuestionario en la visita 1 (p=0.60)

(A: autólogo, H: heterólogo)

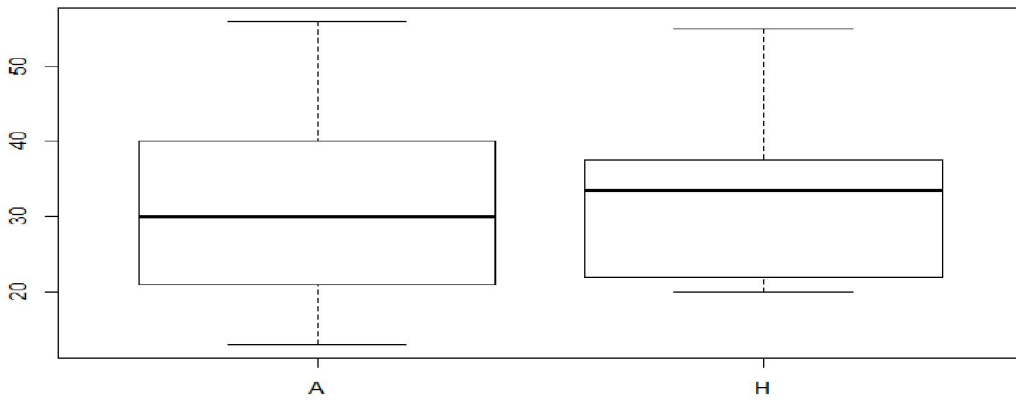


Gráfico 23.- Resultados de la comparativa del cuestionario en la visita 2 (p=0.55)

(A: autólogo, H: heterólogo)

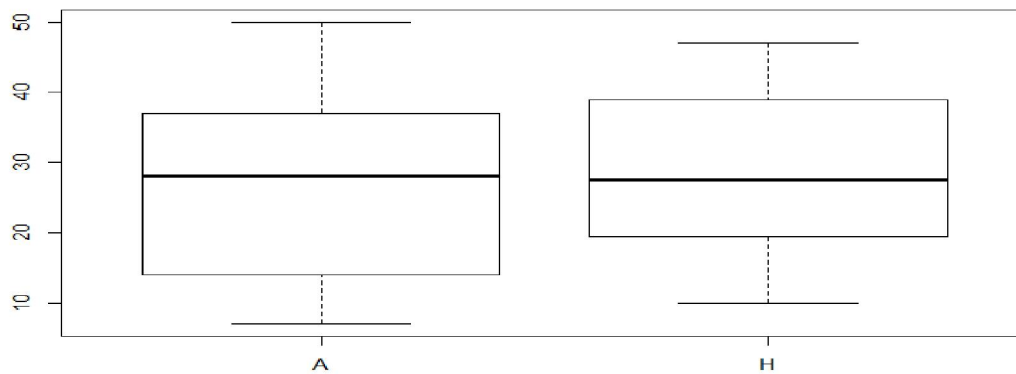


Gráfico 24.- Resultados de la comparativa del cuestionario en la visita 3 (p=0.70)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En resumen, en los test estadísticos aplicados se hallaron diferencias significativas en relación a la variable tiempo en todas las pruebas oftalmológicas realizadas; no siendo significativos los resultados obtenidos en la comparativa entre los dos sueros de estudio, autólogo y heterólogo para las mismas pruebas (tabla 22)

		ESTADÍSTICO DE CONTRASTE		p-VALOR
AGUDEZA VISUAL	TIEMPO	Global	F= 8,56	p= 3×10^{-3} *
		V ₁ -V ₂	-	p= $2,4 \times 10^{-2}$ *
		V ₁ -V ₃	-	p= 8×10^{-4} *
		V ₂ -V ₃	-	p=0,95
	TRATAMIENTO	V ₁	W=259	p=0,14
		V ₂	W=287	p= 0,34
V ₃		W=324,5	p=0,81	
TEST DE SCHIRMER	TIEMPO	Global	F=11,29	p= $2,71 \times 10^{-5}$ *
		V ₁ -V ₂	-	p=0,006 *
		V ₁ -V ₃	-	p= $3,2 \times 10^{-5}$ *
		V ₂ -V ₃	-	p=1
	TRATAMIENTO	V ₁	W=333	p=0,93
		V ₂	W=326	p=0,83
V ₃		W=301,5	p=0,51	
BUT	TIEMPO	Global	F=48,16	p= 2×10^{-16} *
		V ₁ -V ₂	-	p= $1,6 \times 10^{-10}$ *
		V ₁ -V ₃	-	p= $5,9 \times 10^{-12}$ *
		V ₂ -V ₃	-	p=0,04
	TRATAMIENTO	V ₁	W=280	p=0,28
		V ₂	W=290	p=0,38
V ₃		W=325	p=0,82	
FLUORESCEÍNA	TIEMPO	Global	F=38,08	p= $4,23 \times 10^{-14}$ *
		V ₁ -V ₂	-	p= $1,3 \times 10^{-8}$ *
		V ₁ -V ₃	-	p= $3,2 \times 10^{-10}$ *
		V ₂ -V ₃	-	p=0,09
	TRATAMIENTO	V ₁	W=364	p=0,63
		V ₂	W=321	p=0,75
V ₃		W=383,5	p=0,37	
VERDE DE LISAMINA	TIEMPO	Global	F=6,39	p= 2×10^{-3} *
		V ₁ -V ₂	-	p= $3,2 \times 10^{-4}$ 8
		V ₁ -V ₃	-	p=0,07
		V ₂ -V ₃	-	p=0,89
	TRATAMIENTO	V ₁	W=339,5	p=0,98
		V ₂	W=268,5	p=0,19
V ₃		W=269	p=0,2	
CUESTIONARIO	TIEMPO	Global	F=18,7	p= $3,12 \times 10^{-7}$ *
		V ₁ -V ₂	-	p= $4,3 \times 10^{-5}$ *
		V ₁ -V ₃	-	p= $1,2 \times 10^{-5}$ *
		V ₂ -V ₃	-	p=1
	TRATAMIENTO	V ₁	W=88	p=0,60
		V ₂	W=66,5	p=0,55
V ₃		W=70,5	p=0,70	

Tabla 22.- Resumen estadístico de los resultados de las pruebas oftalmológicas en relación al tiempo y comparativa entre suero autólogo y heterólogo

BUT: tiempo de ruptura lagrimal

V₁, V₂, V₃, visitas 1, 2 y 3

* Valores estadísticamente significativos

III.II.b) CUANTIFICACIONES ANALÍTICAS DE LOS SUEROS

III.II.b.1) Análisis descriptivo

IgA (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	Vitamina A (µg/dl)	Vitamina E (µg/dl)	ALBÚMINA SÉRICA (g/dl)	EGF (ng/ml)	TGF (ng/dl)	FIBRONECTINA (µg/dl)
456	1270	305	33	1948	4,1	1,19	23,8	113,34
290	796	111	61	1882	1,8	1,1	18,8	122,63
714	1650	313	26	1909	3,7	0,5	17,09	243,81
154	1130	63	30	1577	4	2,2	18,6	109,97
398	1760	257	33	1774	4,8	0,8	11,7	86,31
198	1080	74,4	63	1771	4,22	*	*	*
135	761	198	62	1776	3,84	0,8	23,13	197,68
226	711	105	69	1787	4,55	0,82	27,66	168,29
279	1460	105	47	1194	4,02	0,4	33,56	268,99
131	945	76,5	50	1580	3,95	0,17	22,63	319,2
283	1300	70,1	44	1415	3,65	0,132	25,23	222,08
419	2860	45,4	35	1099	3,71	0,11	15,55	424,8
107	1530	110	37	1644	4,31	1,3	24,01	352,48
427	4540	129	29	1201	3,86	0,819	15,69	796,12
950	3160	168	20	787	3,63	1,2	19,08	146,17

Tabla 23.- Determinaciones analíticas en grupo autólogo

*Muestra agotada

IgA (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	Vitamina A (µg/dl)	Vitamina E (µg/dl)	ALBÚMINA SÉRICA (g/dl)	EGF (ng/ml)	TGF (ng/dl)	FIBRONECTINA (µg/dl)
127	805	161	45	1638	4,9	2,4	29,3	95,93
246	988	200	42	1111	4,3	2,22	18,5	134,66
131	813	160	43	1734	4,7	2,5	43,38	50,6
304	892	115	52	1615	4,4	2,53	39,28	76,28
109	826	116	36	1318	3,12	1,23	13,01	59,09
212	814	75,2	44	1724	3,31	1,16	23,43	143,36
107	765	54,2	54	1458	3,71	1,16	23,43	100,99

Tabla 24.- Determinaciones analíticas en grupo heterólogo**

**En este grupo *n* es menor dado que con un mismo suero heterólogo se han tratado varios pacientes

	IgA (mg/dl)		IgG (mg/dl)		IgM (mg/dl)		Vitamina A (µg/dl)		Vitamina E (µg/dl)	
	A	H	A	H	A	H	A	H	A	H
Media	344,47	176,57	1663,5	843,28	142,03	125,91	42,6	45,14	1556,27	1514
Error típico	60,14	29,38	275,3	28,02	22,61	19,40	3,97	2,31	89,07	87,56
Mediana	283	131	1300	814	110	116	37	44	1644	1615
Desviación estándar	232,92	77,73	1066,26	74,14	87,56	51,34	15,37	6,12	344,96	231,67
Varianza	54251,98	6042,28	1136909,7	5497,24	7667,23	2635,64	236,25	37,48	118998,49	53673
Curtosis	2,3	-1,01	2,87	2,1	-0,14	-0,96	-1,14	-0,26	0,013	-0,14
Coefficiente asimetría	1,50	0,79	1,75	1,46	1,045	-0,02	0,41	0,21	-0,93	-0,94
Rango	843	197	3829	223	267,6	145,8	49	18	1161	623
Mínimo	107	107	711	765	45,4	54,2	20	36	787	1111
Máximo	950	304	4540	988	313	200	69	54	1948	1734

Tabla 25.- Medidas de centralidad y dispersión de determinaciones analíticas en suero Autólogo (A) y Heterólogo (H)

	ALBÚMINA SÉRICA (g/dl)		EGF (ng/ml)		TGF (ng/ml)		FIBRONECTINA (µg/dl)	
	A	H	A	H	A	H	A	H
Media	3,88	4,06	0,82	1,88	21,18	27,19	255,13	94,41
Error típico	0,17	0,26	0,15	0,25	1,51	4,13	49,52	13,41
Mediana	3,95	4,3	0,81	2,22	20,85	23,43	209,88	95,93
Desviación estándar	0,66	0,69	0,56	0,66	5,67	10,93	185,31	35,49
Varianza	0,44	0,47	0,32	0,44	32,1	119,6	34338,86	1259,55
Curtosis	7,24	-1,70	1,55	-2,68	0,43	-0,94	5,37	-1,36
Coefficiente asimetría	-2,17	-0,29	0,9	-0,3	0,48	0,43	2,10	0,25
Rango	3	1,78	2,09	1,37	21,86	30,37	709,81	92,76
Mínimo	1,8	3,12	0,11	1,16	11,7	13,01	86,31	50,6
Máximo	4,8	4,9	2,2	2,53	33,56	43,38	796,12	143,36

Tabla 26.- Medidas de centralidad y dispersión de determinaciones analíticas en suero Autólogo (A) y Heterólogo (H) (Continuación)

III.II.b.2) Inferencia estadística

En relación a la IgA se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sueros, siendo mayores en suero autólogo, con una $p=0.048$ (Gráfico 25)

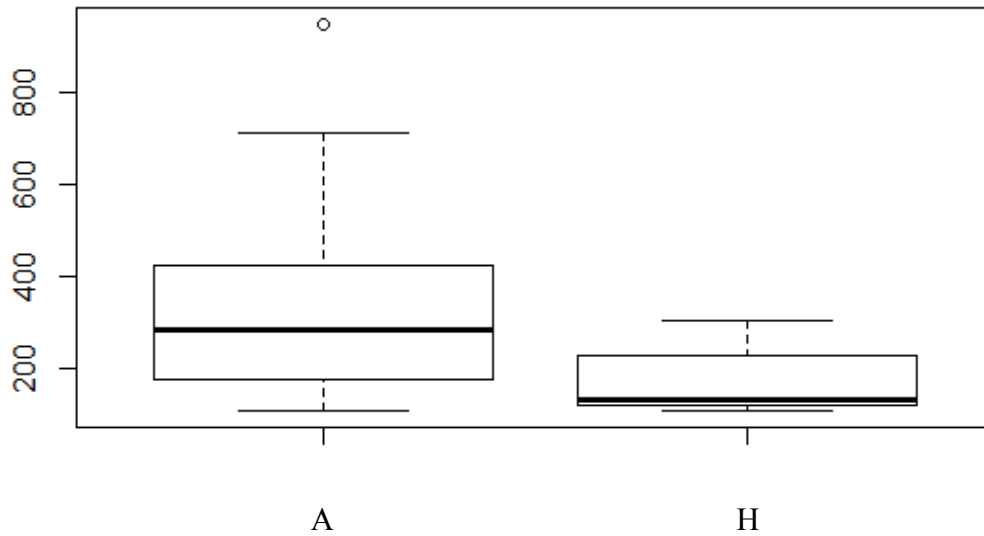


Gráfico 25.- Determinación de IgA (mg/dl) en ambos grupos ($p=0.048$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la *IgG* se ha encontrado en mayor concentración en el suero autólogo, con una $p=3 \times 10^{-4}$ (Gráfico 26)

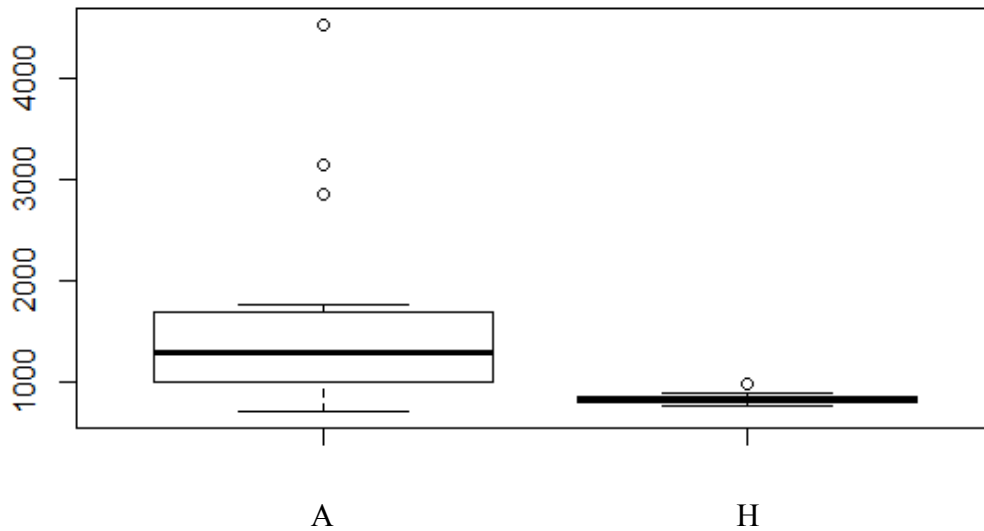


Gráfico 26.- Determinación de IgG (mg/dl) en ambos grupos ($p=3 \times 10^{-4}$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la *IgM* no se encontraron diferencias significativas en la cuantificación en ambos grupos de estudio ($p=0.89$) (Gráfico 27)

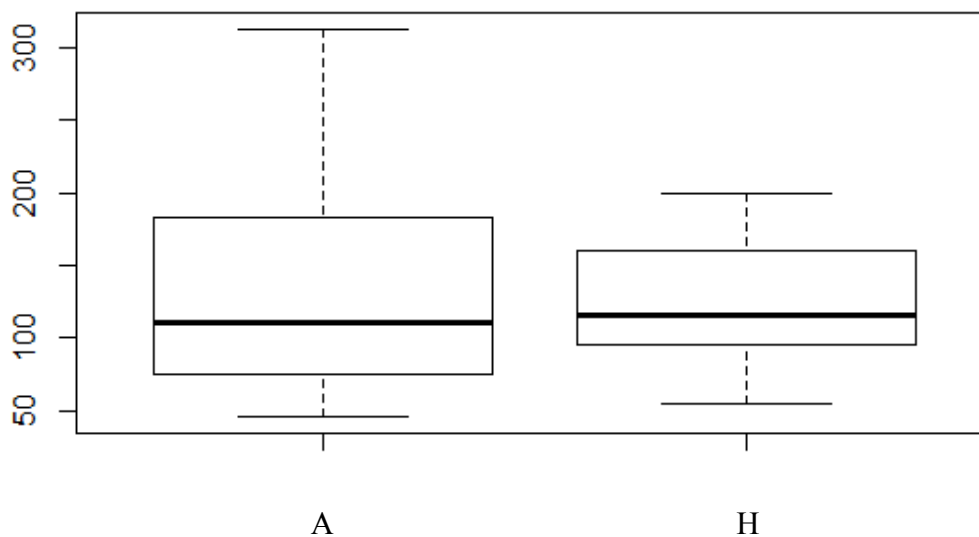


Gráfico 27.- Determinación de IgM (mg/dl) en ambos grupos ($p=0.89$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la *vitamina A* no se han encontrado diferencias en los valores medidos de la misma en suero autólogo y heterólogo ($p=0.50$) (Gráfico 28)

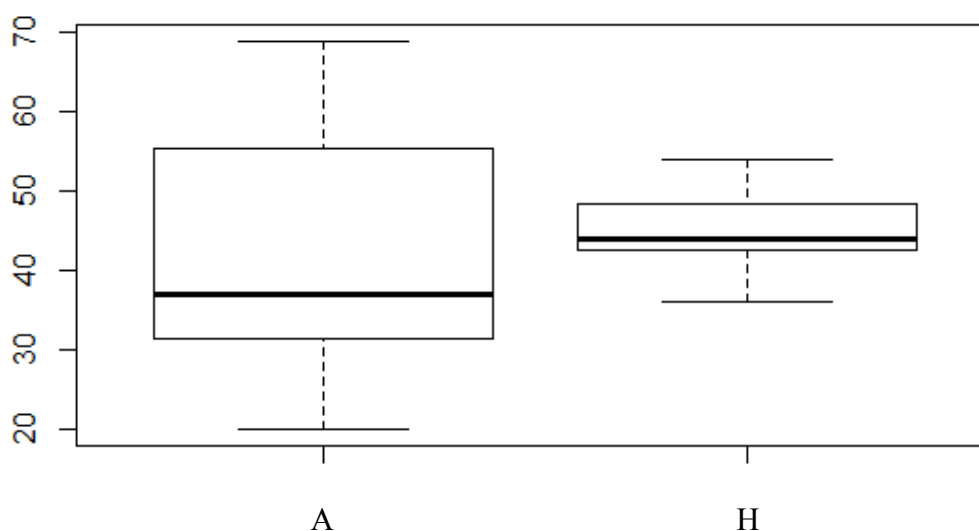


Gráfico 28.- Determinación de vitamina A ($\mu\text{g/dl}$) en ambos grupos ($p=0.50$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la vitamina E no se hallaron diferencias significativas entre los valores medidos en ambos grupos ($p=0.45$) (Gráfico 29)

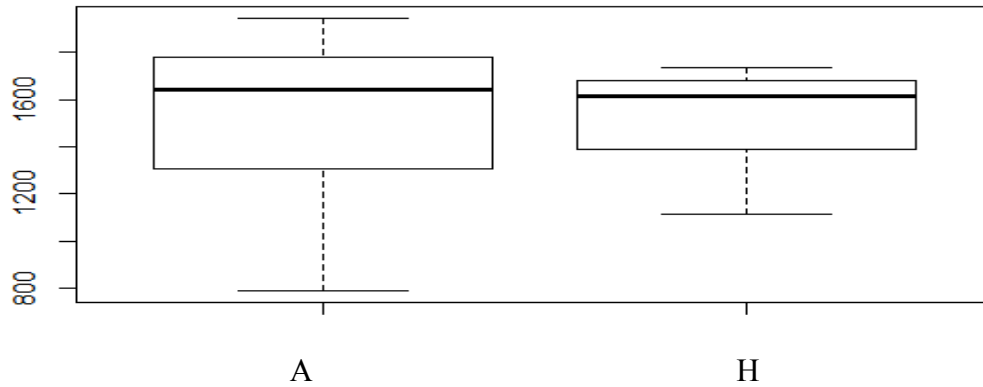


Gráfico 29.- Determinación de vitamina E ($\mu\text{g/dl}$) en ambos grupos ($p=0.45$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la *albúmina sérica* no se han observado diferencias significativas entre los valores medidos en ambos sueros $p=0.6$ (Gráfico 30)

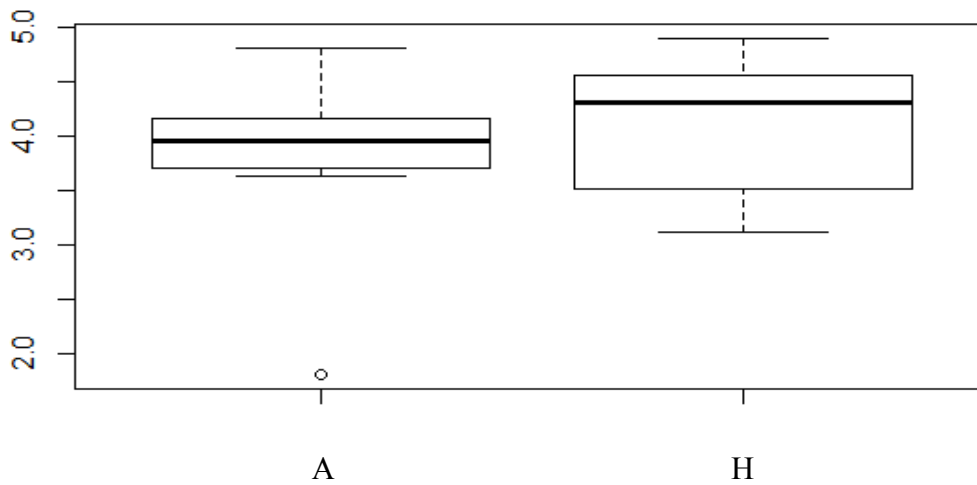


Gráfico 30.- Determinación de albúmina sérica (g/dl) en ambos grupos ($p=0.6$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación al *EGF* se encontraron concentraciones mayores en el suero heterólogo, siendo estadísticamente significativa ($p=2.4 \times 10^{-3}$) (Gráfico 31)

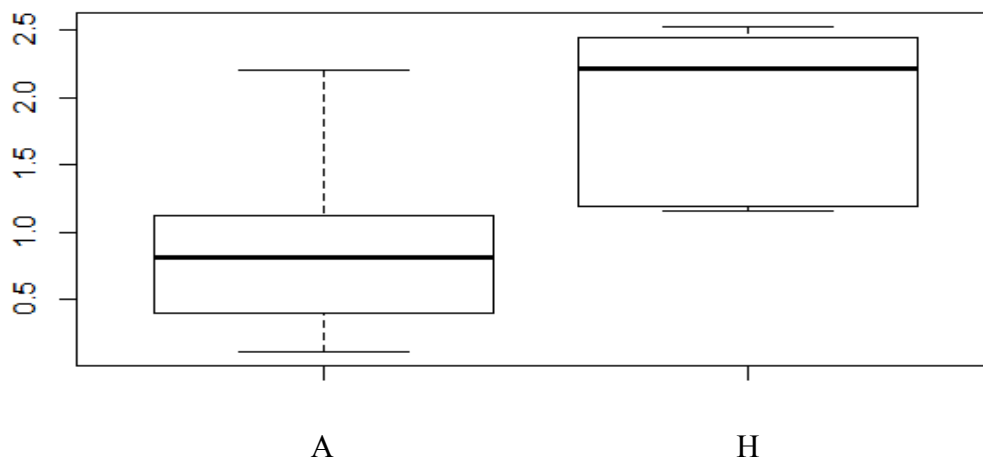


Gráfico 31.- Determinaciones de EGF (ng/ml) en ambos grupos ($p=2.4 \times 10^{-3}$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la medición de *TGF* no se encontraron diferencias entre los grupos, con una $p=0.28$ (Gráfico 32)

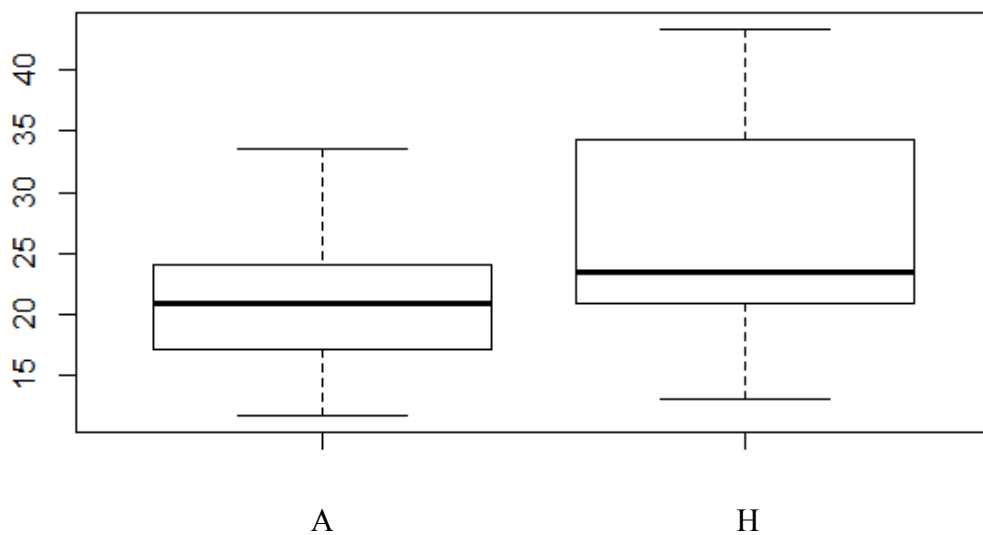


Gráfico 32.- Determinación de TGF (ng/dl) en ambos grupos ($p=0.28$)

(A: autólogo, H: heterólogo)

En relación a la *fibronectina* se objetivaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, siendo mayores las concentraciones en suero autólogo, con una ($p=2.2 \times 10^{-3}$). (Gráfico 33)

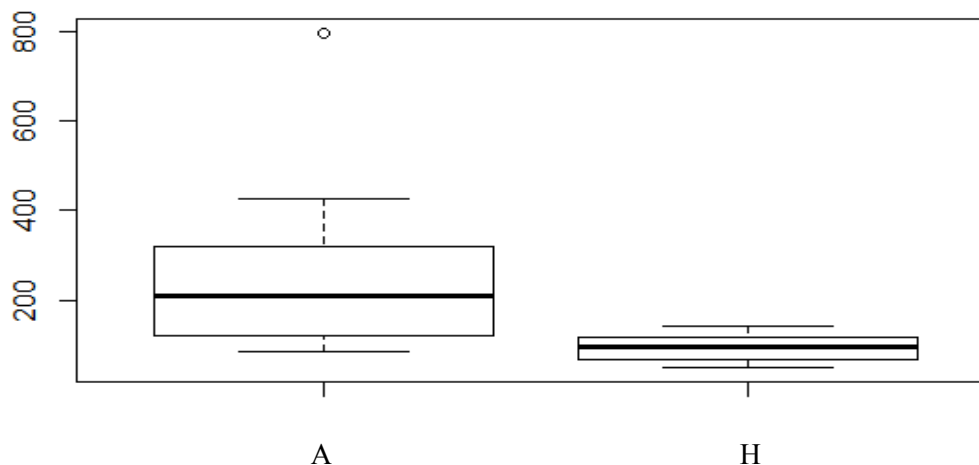


Gráfico 33.- Determinaciones de fibronectina ($\mu\text{g/ml}$) en ambos grupos ($p=2.2 \times 10^{-3}$)
(A: autólogo, H: heterólogo)

Los resultados respecto al análisis de isoimmunización fue negativa para la totalidad de los pacientes del estudio, siendo los anticuerpos irregulares medidos (AAII) negativos antes del estudio y al finalizar el mismo.

Asimismo fueron negativas las serologías realizadas a los pacientes previo y posterior al estudio para hepatitis C: VHC (Ac), hepatitis B: VHB (HBsAg, Anti-Core HB), sida: VIH (Ac +Ag p24-VIH), (pruebas no treponémicas), NAT (Nucleic Acid Amplification Technology)/test PCR para acortamiento de periodo ventana con resultados también negativos.

IV. DISCUSIÓN

La sangre y otros fluidos humanos (leche materna, placenta, saliva, orina e incluso excrementos) han sido empleados desde el comienzo de los tiempos para el tratamiento de diversas afecciones. La simbiosis médico-magia y liturgia han evolucionado en las distintas etapas de la historia con indicación terapéutica de los mismos para el alma y el cuerpo. El papiro de Ebers menciona numerosas enfermedades oftálmicas y sus respectivos tratamientos, entre los que se encuentra el uso de la sangre como colirio para los ojos rojos o con poca visión.

En el siglo pasado comienza a emplearse el componente sérico de la sangre como elemento terapéutico para el tratamiento de la sequedad de la superficie ocular. (Fromaget, 1923), (Rucker, 1938), (Bruce, 1940), (Busse, 1960), (Bisantis,1976), (Fox, 1984) emplearon el suero en diversas concentraciones y formulaciones.

El desarrollo de la ciencia, la seguridad y controles de calidad sobre los hemoderivados y el aumento de la patología subsidiaria este tipo de tratamiento ha llevado a reconsiderar esta terapia en los últimos veinte años. Tratamientos de última elección ante patologías desahuciadas por otras armas terapéuticas.

En nuestro país el empleo de derivados hemáticos para el tratamiento de patologías oculares ha suscitado un gran interés en las últimas dos décadas, dando lugar a gran número de publicaciones, entre otras: (Alió JL, 2007/2015), (Bosch- Valero J, 2008), (Benítez del Castillo JM, 2002) (López-García JS, 2007/2011/2014)

Con este trabajo hemos pretendido reafirmar las conclusiones presentadas en la suficiencia investigadora en el 2011 basado en pruebas y valoraciones subjetivas por el propio paciente en el que no se obtuvieron diferencias significativas entre ambos colirios, asumiéndose la no inferioridad del suero heterólogo respecto al autólogo. Se han añadido pruebas objetivas valoradas por el oftalmólogo pretendiendo dar consistencia al trabajo inicial.

Esta valoración objetiva sin embargo no está exenta de limitaciones, pues al ser pruebas no automatizadas, pueden variar entre oftalmólogos y/o el mismo oftalmólogo entre pacientes (en nuestro estudio participaron tres oftalmólogos en la realización de las pruebas)

En relación al tamaño muestral aceptamos su limitación debido a las exigencias de los criterios de inclusión.

Aunque se pudiera pensar que en los pacientes en tratamiento con suero autólogo previo al estudio influyeran en los resultados, ya que desconocíamos la pauta de suero autólogo en estos pacientes, la duración y el momento del tratamiento previo al inicio del estudio, se realizó un periodo de lavado de dos semanas con lágrimas artificiales previo a la inclusión del estudio. El análisis estadístico respecto a la comparativa del empleo previo de suero autólogo en ambos grupos no resultó ser significativa. Por ambos motivos no se llevó a cabo el análisis de resultados por

subgrupos de tratamiento, considerándose grupos de pacientes “iguales” y homogénea en cuanto a proporción entre ambos brazos del estudio.

El suero autólogo es un tratamiento seguro y bien tolerado (Méndez Fernández R, 2004), sin efectos secundarios incluso en tratamientos prolongados (Tsubota K, 1999). En nuestro estudio hemos corroborado estas premisas, ya que no se han producido abandonos por mala tolerancia al mismo, ni reacción adversa registrada durante el seguimiento de los pacientes, al igual que en el grupo de suero heterólogo.

En la posología, no existe un consenso acerca del número de aplicaciones diarias tópicas de los hemoderivados (López García JS, 2011), (Ferreira de Souza, 2011). López-García SJ, en su revisión de artículos en 2007, afirma que el número de instilaciones varía desde la aplicación horaria hasta tres veces al día. Este autor recomienda su instilación cada tres horas. Tanto Tsubota (1999) como Yoon (2011), aplican el suero de 6 a 10 veces al día. Noble (2011), por su parte lo aplica el número de veces que el paciente empleara la terapia convencional previa (lágrimas artificiales). Takamura (2011) emplea dos pautas distintas, 4 y 8 veces al día. Por lo tanto, no existe una pauta estandarizada para su empleo.

Si bien existen publicaciones que avalan la elaboración de dosis unitarias congeladas y descongelarlas antes de su uso (Bradley JC, 2009), esta metodología no es viable por este fabricante por la carga de trabajo que implica siendo similares los resultados obtenidos con el proceso descrito, siempre que se extremen las condiciones validadas de entrega y transporte hasta los puntos de frío.

También compartimos con otros autores (Tsubota K, 1999), (Poon AC, 2001), (Bosch-Valero J, 2008) la preocupación sobre la posible contaminación de los viales al ser un fármaco de elaboración sin ningún tipo de conservantes. Al envasarse sin conservantes durante periodos variables, facilita el riesgo de infecciones. Poon y colaboradores presentaron tres casos de queratitis infecciosa en pacientes con defecto epitelial persistente (Poon AC, 2001). Sin embargo, Tsubota et al. cultivaron el suero sobrante de los colirios utilizados sin encontrar contaminación bacteriana ni fúngica en ninguno de los botes (Tsubota K, 1999). En general existe una baja contaminación e infección secundaria que puede deberse al contenido de agentes antibacterianos (Bosch-Valero J. 2008). En nuestro estudio fueron negativos todos los cultivos en su preparación. Puede ocurrir y de hecho sucede que, en la práctica de dosificación, el propio paciente pueda contaminar las gotas, por tocar la superficie o contactar con el frasco sobre la superficie ocular. Una buena instrucción desde el Banco de Tejidos a los pacientes disminuyen en un alto porcentaje esta incidencia.

La elaboración de los preparados ha ido sufriendo modificaciones desde el inicio. Parámetros como el volumen de sangre a extraer en principio estaba establecido en 60 mL y en la actualidad en 40 mL, para garantizar la utilización del colirio en los tres meses fijados para la estabilización del producto. Otra medida de mejora ha sido el aislamiento de los viales para mantener los niveles de vitamina A y el etiquetado.

En términos generales no hemos encontrado diferencias significativas entre el suero autólogo y el heterólogo procedente de donantes de sangre, insistimos en donantes de sangre. En algunos medios se seleccionan familiares compatibles, según el grupo AB0, con el enfermo. Nosotros estamos en total desacuerdo con esta práctica, pues se puede ver comprometido el donante y su entorno social, pudiendo incurrir en la negación de información. Además el donante de sangre es una persona que dona de forma desinteresada y no tiene ningún conflicto de intereses con el paciente. Por otro lado de una donación de sangre destinada a colirios son muchos los viales que se pueden obtener con los mismos recursos analíticos y de control de calidad. Para asegurar la compatibilidad seleccionamos donantes del grupo sanguíneo AB. En ninguno de los pacientes del estudio hemos tenido ninguna reacción de isoimmunización. Todos los pacientes han sido AAI negativos previo y al finalizar el estudio. De todas maneras, hay que tener en cuenta que algunos pacientes son reacios a utilizar algo que no es suyo o de sus familiares, esto ocurre en todo producto biológico, que por otro lado no está exento del “riesgo cero” y puede haber una negativa generalizada ante la propuesta de su oftalmólogo. Estos estudios y una buena educación sanitaria deben de informar al paciente de los beneficios de esta terapia y éste se dejara aconsejar ante la última alternativa terapéutica que tiene para su patología.

IV.I EFICACIA DEL TRATAMIENTO

Se ha objetivado una mejoría clínica de los pacientes en la enfermedad de ojo seco a lo largo de los tres meses de tratamiento en ambos grupos, evaluándose tanto el cuestionario subjetivo de síntomas de Donate como la batería de pruebas (agudeza visual, test de Schirmer, BUT, tinción con fluoresceína, verde de lisamina) medidas y comparadas en las diferentes visitas del estudio.

Los datos obtenidos arrojan un resultado general de no inferioridad del suero heterólogo respecto al autólogo. No existe en la literatura actual ningún otro trabajo comparativo entre suero autólogo y heterólogo, siendo este estudio por tanto, pionero. Con los resultados obtenidos en las diferentes variables medidas podemos contar con el suero heterólogo como primera opción terapéutica en aquellos pacientes con dificultad venosa, imposibilidad de desplazamiento, niños, tratamiento anticoagulante, anemias severas...

IV.II PRUEBAS OBJETIVAS Y SUBJETIVAS

Se han encontrado diferencias, entendida como mejoría, estadísticamente significativas, teniendo en cuenta la variable tiempo, es decir, entre la 1ª y la 3ª visita, para las siguientes pruebas: agudeza visual ($p=7.7 \times 10^{-4}$), test de Schirmer ($p=3.2 \times 10^{-5}$), BUT ($p=5.9 \times 10^{-12}$), tinción con fluoresceína (menor puntuación) ($p=3.2 \times 10^{-10}$), cuestionario (menor puntuación) ($p=1.2 \times 10^{-5}$)

No ha resultado significativa la comparativa en el tiempo de la tinción con verde de lisamina comparando la 1ª y la 3ª visita ($p > 0.05$), siendo significativa la encontrada entre la 1ª y la 2ª visita ($p = 3 \times 10^{-4}$).

En el análisis entre tratamientos (colirio autólogo y heterólogo) no se han encontrado diferencias significativas entre ambos para los test (comparando las visitas 1 y 3) de: agudeza visual ($p = 0.14$; $p = 0.81$), test de Schirmer ($p = 0.93$; $p = 0.51$), BUT ($p = 0.28$; $p = 0.82$), tinción con fluoresceína ($p = 0.63$, $p = 0.37$), cuestionario ($p = 0.60$, $p = 0.70$)

En el análisis de la tinción con verde de lisamina los valores de p obtenidos para cada visita en la comparativa entre suero autólogo y heterólogo fueron superiores a 0.05, considerándose que no existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos en relación al resultado de la prueba, aunque parece apreciarse cierta tendencia por bajos p -values en la comparativa realizada para las visitas 2 y 3. La p tomó los siguientes valores en las visitas 1, 2 y 3, respectivamente: $p = 0.98$, $p = 0.19$ y $p = 0.20$.

IV.III DETERMINACIONES ANALÍTICAS

Está descrito que el suero autólogo es rico en factores que optimizan la proliferación, migración y diferenciación de las células epiteliales de la superficie ocular como son el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor Factor β Transformante del Crecimiento de Fibroblastos (TGF- β), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), en su isoforma AB; la vitamina A y proteínas como, la albúmina, α -2 macroglobulina y la fibronectina. Éste último considerado uno de los factores de mayor importancia en la migración celular. También cuenta con factores neuronales: sustancia P y el Factor de Crecimiento tipo Insulina 1 (IGF-1) e Inmunoglobulinas: IgG (López García, 2007).

Hubiera sido nuestro deseo realizar el total de estas determinaciones en nuestro estudio, pero la disponibilidad de recursos ha sido limitada. No obstante, hemos realizado bajo nuestro punto de vista los de mayor incidencia en la superficie corneal, siendo éstas las siguientes: factores EGF y TGF- β 1, vitaminas A, E, albúmina, IgG, IgM, IgA y fibronectina. La mayoría de ellos descritos en la literatura y referenciados para suero autólogo, (Garzón Parra, SJ.2012), a excepción de la vitamina E que ha sido determinada por iniciativa de este estudio. La vitamina E es una vitamina liposoluble que actúa como antioxidante a nivel de las membranas celulares.

a) Factores de crecimiento

La media de las concentraciones de los factores EGF y TGF- β en suero autólogo y heterólogo de donante de banco, han sido 0.81ng/ml y 1.88 ng/ml para el primero y 21.18ng/ml y 27.19ng/ml para el segundo en ambas modalidades de colirios autólogo y

heterólogo respectivamente. Estos valores para el suero autólogo son similares a los descritos por otros autores: para EGF 0.5 ng/ml (Geerling G, 2004) y 0.7ng/ml(Garzón Parra, SJ, 2012). Para TGF- β , dichos autores coinciden en sus valores entre 6-33ng/ml. En nuestro estudio los valores de ambas determinaciones se hallan en mayor concentración en suero heterólogo. Existe diferencia significativa entre los valores medidos para EGF en suero autólogo y heterólogo siendo mayor en este último ($p=2.4 \times 10^{-3}$), sin embargo no hay diferencia estadísticamente significativa del factor TGF- β entre ambos sueros.

b) *Vitaminas A y E*

La media de vitamina A en el grupo autólogo ha sido de 42.60 μ g/dl y la del heterólogo 45.14 μ g/dl, más baja para autólogo que la descrita por otros autores 88.3 μ g/dl(Garzón Parra, SJ.2012), pero dentro del rango de nuestro laboratorio de referencia (20-80 μ g/dl). Es muy importante preservar la integridad del envase ante la luz para evitar la degradación de la vitamina A. Es de todos conocidos su papel como antibacteriano además de antioxidante y preventivo de la metaplasia escamosa.

No hemos encontrado referencia para vitamina E, determinada en suero autólogo por otros grupos de estudio. Nuestros valores han sido de 1556.26 μ g/dl y 1514.00 μ g/dl correspondientes a autólogo y heterólogo con unos valores de referencia de 800.0 a 19000 μ g/dl .

En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre autólogo y heterólogo para ambas vitaminas, siendo $p=0.50$ para vitamina A y $p=0.44$ para vitamina E.

Sería interesante para futuros estudios ver la posible influencia de la vitamina E en estos tipos de colirios, sobre la superficie ocular, como antioxidante.

c) *Proteínas*

La *Albumina* con valores medios de 3.8 g/dl para autólogo coincide con los valores medios de otros autores 3.5-5.5 g/dl (Sandra J, 2012). En el grupo heterólogo ha sido 4.0g/dl. No existen diferencias estadísticamente significativas, referente a la concentración de albúmina, para ambos grupos de estudio ($p=0.59$)

La *Fibronectina*, proteína relacionada con los procesos inflamatorios, y cuya función es la migración celular en los procesos de reparación corneal, la hemos encontrado con una media de 255.13 μ g/ml para autólogo y 94.41 μ g/ml para heterólogo. Nuestra media para autólogo está en sintonía con otros autores: 205 μ g/ml (Garzón Parra SJ,.2012). Nuestros valores de referencia son entre 12-124 μ g/ml. Este valor elevado y fuera de rango en autólogo habla a favor de un proceso inflamatorio en los pacientes de tratamiento autólogo. Hemos hallado diferencias estadísticamente significativas de fibronectina entre ambos grupos de sueros, mayor en autólogo ($p=2.2 \times 10^{-3}$)

d) Inmunoglobulinas

En relación a las Inmunoglobulinas determinadas IgG, IgM, IgA, podemos decir de forma general que son más bajas en el suero heterólogo que en el autólogo. En el grupo de autólogo las cifras medias encontradas son las siguientes: IgG=1663.53mg/dl, IgM=142.02mg/dl e IgA=344.46mg/dl; hallándose dentro del rango definido por otros autores (Garzón Parra SJ, 2012): IgG (800-1800mg/dl), IgM (37-280mg/dl), IgA (90-450mg/dl). Para suero heterólogo hemos encontrado unas medias de IgG=843.28mg/dl, IgM=125.91mg/dl, IgA=176.57mg/dl, con unos valores de referencia de IgG (700-1600mg/dl), IgM (52-322mg/dl), IgA (69-380 mg/dl).

Existen diferencias significativas entre los valores medidos para IgA e IgG en suero autólogo y heterólogo, siendo mayores en el grupo de suero autólogo, con $p=0.048$ para IgA y $p=3 \times 10^{-4}$ No existe diferencia significativa entre los valores medidos para IgM en ambos sueros ($p=0.89$)

En resumen, podemos afirmar que, en el análisis de los valores para ambos tipos de colirios, el realizado con suero heterólogo muestra mayor concentración de factores de crecimiento, albúmina sérica y vitamina A; siendo el autólogo más rico en fibronectina, IgG, IgM, IgA y vitamina E. Aunque sólo fueron estadísticamente significativos los valores de EGF (mayor en heterólogo) y las concentraciones de fibronectina, IgA e IgG (mayores en autólogo).

e) Agentes de enfermedades transmisibles

A pesar de haberse realizado las analíticas oportunas no se puede olvidar el riesgo de transmisión no determinable durante el periodo ventana de las enfermedades: 1.004/100.000 donantes para virus hepatitis B, 0.237/100.000 donantes para virus hepatitis C, 0.578/100.000 donantes para VIH (Alonso Gil M, 2009)

Los controles serológicos realizados al final del estudio fueron negativos para ambos grupos. No se han observado enfermedades infecciosas de posible transmisión por el suero heterólogo de novo durante el tratamiento.

Todos los colirios de suero tanto autólogo como heterólogo fueron negativos para aerobios, anaerobios así como para hongos.

La correcta anamnesis en ambos grupos de estudio así como el procesamiento en áreas de aire tratado han garantizado la negatividad de las determinaciones en los colirios, sin olvidar el papel ejercido por la IgG, lisozima y factores del complemento como bacteriostático y bactericida.

El colirio heterólogo se presenta como primera opción de tratamiento en pacientes con serología previas positivas en los que está contraindicado el empleo de autólogo por los riesgos de transmisión al entorno familiar, ya que se trata de un producto biológico infeccioso.

f) Enfermedades autoinmunes

Nos surgen interrogantes en pacientes con enfermedades autoinmunes. ¿puede influir el tratamiento sistémico en la calidad del suero? ¿en qué medida puede haber fármaco inmunosupresor en el suero con el que realizamos el colirio autólogo? ¿aumentaría la eficacia en estos casos? o ¿por el contrario la disminuiría? ¿qué ocurre en pacientes sin tratamiento sistémico en el momento de la necesidad de terapéutica ocular? ¿es su suero el más adecuado para la elaboración del colirio? O ¿sería más aconsejable utilizar colirio de donante?

Son preguntas aun sin respuesta documentada por lo que sería interesante realizar un estudio en el que se valoraran ambos colirios en estos pacientes con y sin tratamiento en el momento de la necesidad de colirio de suero para poder esclarecer si existen diferencias y poder así determinar cuál sería la primera opción terapéutica en cada caso.

V.CONCLUSIONES

1. El suero heterólogo no es inferior al autólogo respecto a la eficacia terapéutica medida con:
 - a) Pruebas oftalmológicas objetivas: Agudeza visual, test de Schirmer, tiempo de ruptura lagrimal, tinción de fluoresceína y verde de lisamina.
 - b) Cuestionario subjetivo de evaluación de signos y síntomas.
2. El colirio heterólogo puede ser entonces la primera opción de tratamiento con colirio de suero en pacientes con serología positiva, mal acceso venoso, dificultad de desplazamiento, tratamiento anticoagulante, anemia severa y niños
3. Las mayores concentraciones de fibronectina, IgA e IgG en suero autólogo pueden ser debidas al proceso inflamatorio asociado al Síndrome de ojo seco.
4. No se ha encontrado bibliografía referente a los efectos de la vitamina E en suero autólogo, siendo este trabajo pionero en su medición invitando a realizar futuros estudios.
5. Creemos de gran interés un estudio en pacientes con Síndrome de ojo seco severo que sufran enfermedades autoinmunes tratadas.

VI. ANEXOS

1) Consentimiento informado

El contenido del Consentimiento Informado se realizó según las directrices de la Orden del 8 julio de 2009 (BOJA 152 del 6 de agosto)

1. INFORMACIÓN

1.1 Lo que debe saber:

1.1.1 En qué consiste y para qué sirve

Por su patología oftalmológica, solo queda la alternativa terapéutica de utilizar un colirio biológico. Esto es prepararle unas gotas con la parte líquida de la sangre, suero o plasma, para mantener la humedad del ojo, así como proporcionarle factores cicatrizantes. Este colirio procede de la sangre después de una preparación en el laboratorio.

Usted va a formar parte de un estudio clínico donde se le va a administrar un colirio preparado o bien de su propia sangre o de un donante de sangre.

Ni usted ni su oftalmólogo sabrán el origen del mismo, para así valorar de forma objetiva los resultados clínicos que se produzcan.

1.1.2. Cómo se realiza

Con el suero o previamente analizado se preparará un vial sobre una solución salina balanceada lista para su uso

Se le darán los viales necesarios hasta finalizar el estudio.

1.1.3 Qué efectos le producirá

La evidencia científica del momento demuestra su eficacia, en casos como el suyo, si bien no es una práctica muy extendida, pero si está plenamente indicada en su caso concreto

1.1.4 En qué le beneficiará

En la mejoría de los síntomas y en la cicatrización de su proceso.

1.1.5 Qué riesgos tiene

Como otro colirio habitual, reacciones de tipo local: escozor, picor enrojecimiento.

Al ser un producto biológico sin conservantes, puede producirse una contaminación microbiana en raros casos y ocasionar un proceso infeccioso de tipo local en el lugar de la aplicación.

Como producto biológico no está exento de transmisión de agentes infecciosos a pesar de estar debidamente analizado.

1.1.6 Otras informaciones de interés

Se le realizara previamente un control analítico para VIH, hepatitis B, hepatitis y sífilis, del cual será debidamente informado de los resultados.

Se le realizaran visitas por su oftalmólogo para verificar la evolución y eficacia del tratamiento empleado.

Se le entregará un cuestionario de autoevaluación que deberá rellenar antes y después del tratamiento, para que usted exprese la intensidad de los síntomas y la posible mejoría de los mismos.

Finalmente en cumplimiento de la Ley de protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de Diciembre) ponemos en su conocimiento que la información obtenida en la asistencia sanitaria a su persona ha sido incorporada para su tratamiento a un fichero automatizado. Así mismo se le informa que la recogida y tratamiento de dichos datos tienen como finalidad, el estudio epidemiológico, científico y docente, respetando en todo momento su anonimato. Si lo desea, puede ejercitar los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, previstos por la ley.

1.2 Imágenes explicativas

No aplicable

2. CONSENTIMIENTO

2.1 Datos del paciente

2.2 Profesionales que intervienen

2.3 Firma

3. RECHAZO DE INTERVENCIÓN

4. REVOCACIÓN

2)AnexoI BTCa-P-07: Normas para el paciente

Nombre y apellidos _____

Fecha _____ Código asignado _____

Normas a seguir para la conservación de colirio de suero

Se entregan () viales de colirio de suero autólogo al 20% () en Solución BSS.

Este colirio es de uso exclusivo para la persona cuyo nombre y apellidos figura en la cabecera de esta hoja. Bajo ningún motivo podrá utilizarse para otra persona.

Desde que se entrega el colirio se tardará el mínimo tiempo en llegar a casa donde se colocara un vial en la nevera para su uso y el resto en el congelador, en posición vertical en la parte superior del mismo y separados entre ellos. A las dos horas deben estar congelados, observarlos y en caso contrario llamar al Banco de Tejidos.

Una vez descongelado tiene una caducidad de 21 días y se mantendrá en nevera.

Los viales se protegerán de la luz mediante papel de aluminio.

Si tiene que estar fuera de casa utilizar un dispositivo para mantener el colirio refrigerado, por ejemplo una plaquita de hielo y nevera isotérmica.

Dispensar las gotas según la prescripción de su oftalmólogo.

Nunca tocar con los dedos el dosificador ni con este la superficie ocular

Cualquier cambio en el aspecto físico: turbidez, color, debe ser comunicado al Banco de Tejidos .Horario 8:00-15:00 horas nº teléfono 951034119.

Finalizado este tratamiento el paciente será evaluado por el oftalmólogo quien indicará la conducta a seguir

No olvide si necesita continuar con el tratamiento llamar al Establecimiento de Tejidos, para solicitar una nueva cita cuando empiece el último vial. 951034119

En este espacio puede anotar cualquier incidencia relacionada con su colirio para comunicárselo al Establecimiento de Tejidos en su próxima visita

3) Otros



Etiqueta de Riesgo Biológico

-Muestras de etiquetas.

Colirio de suero autólogo al 20% en Solución Salina

Uso exclusivo para:

Fecha fabricación:

Fecha Caducidad





Colirio de suero heterólogo de donante de Banco de Sangre al 20% en Solución Salina

Uso exclusivo para:

Fecha fabricación:

Fecha Caducidad



VII.BIBLIOGRAFÍA

1. Afonso AA, Monroy D, Stern ME, Feuer WJ, Tseng SC, Pflugfelder SC. Correlation of tear fluorescein clearance and Schirmer test scores with ocular irritation symptoms. *Ophthalmology* 1999; 106:803-810.
2. Alio JL, Abad M, Artola A et al. Use of autologous Platelet-Rich plasma in the treatment of Dormant Corneal Ulcers. *Ophthalmology* 2007; 114:1286-1293
3. Alio JL, Rodríguez AE, WróbelDuzinska D. Eye platelet-rich plasma in the treatment of ocular surface disorders. *Curr Opin Ophthalmol* 2015 Jul;26(4):325-32. doi: 10.1097/ICU.0000000000000169
4. Alonso Gil M et al. Proceso asistencial células y tejidos. Publicación Junta de Andalucía 2009; pág 106
5. Alves M, Novaes P, Morraye Mde A, Reinach PS, Rocha EM Is dry eye environmental disease? *Arq Bras Oftalmol* 2014 May-Jun; 77(3):193-200
6. American Academy of Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course. Sección 2: Fundamentos y principios de oftalmología. Edición 2007-2008
7. American Academy of Ophthalmology. Basic and Clinical Science Course. Sección 8: Enfermedades externas y córnea. Edición 2007-2008.
8. Arita R, Itoh K, Amano S. Noncontact infrared meibography to document age-related changes of the meibomian glands in a normal population. *Ophthalmology*. 2008; 115:911-915.
9. Azuma M, Yabuta C et al. Dry eye in LASIK patients. *BMN Res notes* 2014; 7:420
10. Behrens A, Doyle JJ, Stern L et al. Dysfunctional Tear Syndrome Study Group. Dysfunctional Tear Syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea* 2006; 25(8):900-7
11. Benítez del Castillo J, Wasfy MA, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An in vivo confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:3030-3035.
12. Benítez del Castillo JM, De la Casa JM, Sardina RC, Fernández RM, Feijoo JG, Gómez AC, et al. Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum. *Cornea* 2002; 21:781-783
13. Benítez del Castillo JM. How to promote and preserve eyelid health. *Clin Ophthalmol* 2012; 6:1689–1698
14. Bisantis C. Emploi d'un collyre fait d'auto-serum dans les affections conjonctivales liées a une secretion lacrymale alterée. *Ann d'Ocul* 1976; 209:759-62

15. Bosch-Valero J, Martin-Avia J, Sierra-Barreras J, Rodríguez-Marco A, Cristobal-Bescos JA. Suero autólogo en patología ocular por hipovitaminosis. Arch Soc Esp Oftalmol 2008; 83:45–8.
16. Bradley JC, Simoni J, Bradley RH, et al. Time- and temperatura-dependent stability of growth factor peptides in humen autologous serum eye drops. Cornea 2009; 28:200-5.
17. Bron AJ, Evans V.E., Smith J.A. Grading of corneal and conjunctival staining in the context of other dry eye test. Cornea. 2003; 22:640-50
18. Bruce Hamilton J. Keratitis sicca including Sjögren's syndrome. Trans Ophthalm Soc Austral 1940; 2:63 Resumen en Br J Ophthalm 1942; 26:280-1
19. Bunya VY, Langelien N, Chen S. Tear osmolarity in Sjögren Syndrome. Cornea 2013; 32:922-7
20. Busse Grawitz P. Orientierenden Verchuse über den Chemismus der Entzündungsfaktoren in der Tränenflüssigkeit. Graefes Arch Ophthalm 1960; 162: 447-52
21. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. CLAO J. 1990; 16:65-
22. Celebi ARC, Ulsoy C, Mirza GE. The efficacy of autologous serum eyedrops for severe dry eye síndrome: a randomized doublé-blind crossover study. Cornea 2014; 33: 619-626
23. Chew CK, Jansweijer C, Tiffany JM, Dikstein S, Bron AJ. An instrument for quantifying meibomian lipid on the lid margin: the Meibometer. Curr Eye Res. 1993; 12:247-254.
24. Chiang C, Chen WL, Lim JM, Tsai YY. Allogenic serum eye drops for the treatment of persistent corneal epithelial defect. Eye 2009; 23: 290-293
25. Chiang CC, Lin JM, Chen WL, Tsai YY. Allogenic serum eye drops for the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. Cornea 2007. Aug; 26(7):861-3.
26. Christmas NJ, Skolik SA, Howard MA, Saito Y, Barnstable CJ, Liggett PE. Treatment of retinal breaks with autologous serum in an eperimental model. Ophthalmology 1995; 102:263-271
27. Cullinae AB, O'Callaghan P, McDermott K, Keohane C, Cleary PE. Effects of autologous platelet concentrate and serum on retinal wound healin in an animal model. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2002; 240:35-41
28. Denese C. Marks, Jenny Fisher, Phillip Mond, Jerard Segatchian, Peta M. Dennington. Serum eye drop preparation in Australia: Current manufacturing practice / Transfusion and Apheresis Science 53 (2015) 92-94
29. Donate J, Benítez del Castillo JM, Fernández C, García Sánchez J. Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye. Arch Soc Esp Oftalmol 2002; 77:493-500.

30. Efron N. Efron grading scales for contact lens complications. In: Efron N, ed. Contact Lens Complications. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2004; 239-43.
31. Elliot M, Fandrich H, Simpson T, Fonn D. Analysis of the repeatability of tear break-up time measurement techniques on asymptomatic subjects before, during and after contact lens wear. *Cont Lens Anterior Eye* 1998; 21:98-103
32. Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M. Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type dry eye disease. *Mol Vis*. 2010; 19:862-873
33. Fahim MM, Haji S, Koonapareddy CV, Fan VC, Asbell PA. Fluorophotometry as a diagnostic tool for the evaluation of dry eye disease. *BMC Ophthalmol* 2006; 26:6-20.
Farris RL. Tear osmolarity- a new gold standard? *Adv Exp Med Biol* 1994; 350:495-503.
34. Fox RI, Chan R, Michelson JB, Belmont JB, Michelson PE. "Beneficial effect of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca". *Arthritis Rheum* 1984; 27: 459-461.
35. Franck C. Fatty layer of the precorneal film in the «office eye syndrome» *Acta Ophthalmol* 1991; 69:737-43.
36. Freire V, Andollo N, Etxebarria J et al. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: an in vitro and in vivo comparative study. *Cornea* 2014; 33:614-620
37. Fromaget C. Traitement rationnel des kèratites lacrymales. *Ann d'ocul* 1923; 160:590-1
38. Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Kienker LJ, Kettman JR. Advanced multiplexed analysis with the Flow Metrix system. *Clin Chem* 1997; 43:1749-1756.
39. García Lozano I, López García JS, Giménez Vallejo C, Larenas Ferrada C. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Monografía de la Sociedad Española de Oftalmología. Capítulo VI: Suero autólogo: preparación, dispensación y posología: 73-83 Oviedo, 2011.
40. Garzon Parra SJ, Santana Bonilla, A. Effect of autologous serum in the repair of the ocular surface associated with dry eye. *cienc. tecnol. salud. vis. ocul.* / vol. 10, no. 1 / enero-junio 2012 / pp. 43-49
41. Gayton LG. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. *Clin Ophthalmol* 2009; 3:405-412.
42. Geerling G, Daniels JT, Dart JK, Cree IA, Khaw PT. Toxicity of natural tear substitutes in a fully defined culture model of human corneal epithelial cells. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:948-956



43. Geerling G, MacLennan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:1467-1474.
44. Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J. Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol.* 1978; 96:677-681.
45. Gordana Stankovic B et al. Autologous serum in treatment of dry eye. *Med Pregl* 2012; LXV (11-12): 511-515
46. Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001; 20:807-810
47. Goulart Quinto G, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol* 2008; 71(6supl):47-54.
48. Guijarro Hernández, L. Benítez del Castillo, J. Ponce Verdugo, L. Gómez Maldonado, P. Hernández Lamas, MC, Prat Arrojo, I. Assessment of subjective parameters of patients with autologous vs heterologous eye drops treatment in ocular pathology. *AEBT.* 2011
49. Hamano H, Hori M, Hamano T, et al. A new method for measuring tears. *CLAO J.* 1983; 9:281-289.
50. Hanson J, Fikertscher R, Roseburg B. Schirmer test of lacrimation. Its clinical importance. *Arc Otolaryngol* 1975; 101:293-295
51. Hernández Lamas MC; Guijarro Hernández, L; Galeote Padilla, A; Martín Bejar, M; Mayorga Pastrana, C; Falcón Morales F; Jaen García, J; Ponce Verdugo, L; Prat Arrojo, I. Colirio heterólogo como alternativa a pacientes con indicación de colirio autólogo. *SETS.* 2011.
52. Höh H, Schirra F, Kienecker C, Ruprecht KW. Lid-parallel conjunctival folds are a sure diagnostic sign of dry eye. *Ophthalmologe.* 1995; 92:802-808.
53. Hong J, Zhu W, Zhuang H, et al. In vivo confocal microscopy of conjunctival goblet cells in patients with Sjogren's syndrome dry eye. *Br J Ophthalmol.* 2010; 94:1454-1458.
54. Hughes WL, Conjunctivochalasis, *Am J Ophthalmol.* 1942; 25; 48-51.
55. Hwang J, Chung S-H, Jeon S, Kwok SK et al. Comparison of clinical efficacies of autologous serum eyedrops in patients with primary and secondary Sjögren Syndrome. *Cornea* 2014; 3 n° 7
56. Hye RYun Lee, Yun Ji Hong et al. Proposal of standardized guidelines for the production and quality control of autologous serum eyedrops in Korea: based on a nationwide survey. *Transfusion* 2014; 54: 1864-1870
57. Hyon JY, Lee YJ, Yun PY. Management of ocular surface inflammation in Sjögren syndrome. *Cornea.* 2007 Oct; 26 (9 Suppl 1): S13-5

58. Ibrahim OM, Matsumoto Y, Dogru M, Adan ES, Wakamatsu TH, Goto T, Negishi K, Tsubota K. The efficacy, sensitivity, and specificity of in vivo laser confocal microscopy in the diagnosis of meibomian gland dysfunction. *Ophthalmology*. 2010; 117:665-72.
59. International Dry Eye Workshop (DEWS) The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surface* 2007; 5:75–92.
60. Jacobi C, Jacobi A, Kruse FE. Tear film osmolarity management in dry eye disease using electrical impedance technology. *Cornea* 2011; 30:1289-92
61. Jover Botella A, et al. Evaluación de la efectividad del colirio de suero autólogo en el tratamiento de patologías oculares. *Farm Hosp*.2010.doi:10.1016/j.frama.2010.02.004
62. Kanski, Jack J, *Oftalmología clínica*. 6ª edición. Madrid (España): Elsevier; 2009
63. Khanal S, Tomlinson A, McFadyen A, Diaper C, Ramaesh K. Dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:1407- 1414.
64. Korb DR, Herman JP, Blackie CA, Scaffidi RC, Greiner JV, Exford JM, Finnemore VM. Prevalence of lid wiper epitheliopathy in subjects with dry eye signs and symptoms. *Cornea* 2010; 29:377-83.
65. Korb DR, Herman JP, Greiner JV, et al. Lid wiper epitheliopathy and dry eye symptoms. *Eye Contact Lens: Science & Clinical Practice* 2005; 31:2-8.
66. Kruse FE, Tseng SC. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbar and corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34:2976-89.
67. Kurihashi K, Yanagihara N, Nishimura H, Suehiro S, Kondo T. A new tear test – fine thread method. *Pract Otol*. 1975; 68: 533.
68. Kyung-Sun na, Soo Kimm M. Allogenic serum eyedrops for the treatment of Dry Eye patients with chronic graft-versus-host disease. *Journal of ocularpharmacology and therapeutics* 2012. Vol 28 n°12
69. Labetoulle M, Mariette X, Joyeau L. The phenol red thread first results for the assessment of the cut-off value in ocular sicca syndrome. *J Fr Ophtalmol* 2002; 25:674-680.
70. Lagnado R, King AJ, Donald F, et al. A protocol for low contamination risk of autologous serum drops in the management of ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 464-5.
71. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry Workshop on clinical trials in dry eyes. *CLAO J* 1995; 21:221-32.

72. Lemp MA, Bron AJ, Baudouin C et al. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J. Ophthalmol* 2011; 51:792-8
73. Liggett PE, Skolik DS, Horio B, Saito Y, Alfaro V, Mieler W. Human autologous serum for the treatment of full-thickness macular holes. A preliminary study. *Ophthalmology* 1995; 102:1071-1076
74. Liu L, Hartwig D et al. An optimised protocol for the production of autologous serum eye drops. *Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 243: 706-714
75. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I, Murube J. Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy. *Ophthalmology* 2008 Feb; 115(2):262-7. Epub 2007 Aug6.
76. López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Aplicaciones del suero autólogo en Oftalmología. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82:9-20.
77. López García JS, Murube del Castillo J. Suero autólogo y derivados hemáticos en oftalmología. Monografía de la Sociedad Española de Oftalmología: 1-255 Oviedo, 2011.
78. López García JS, García Lozano I, Ramírez N et al. Autologous serum eyedrops diluted with sodium hyaluronate: clinical and experimental comparative study. *Acta Ophthalmol* 2014; 92:e22-e29.
79. MacLennan S, Hartwig D, Geerling G. Experiences with a centralised national service for autologous serum eyedrops in England. *Ophthalmology* 2008; 105:639-43.
80. Macri A, Rolando M, Pflugfelder S. A standardized visual scale for evaluation of tear fluorescein clearance. *Ophthalmology* 2000; 107:1338-1343.
81. Malavazzi GR, Lake JC, Dantas PE. Effect of honey and autologous serum on corneal epithelial healing in rabbits. *Arq Bras Oftalmol* 2005; 68: 347-351.
82. Marcet MM, Shtein RM et al. Safety and Efficacy of Lacrimal Drainage System Plugs for Dry Eye Syndrome: A Report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2015 Aug; 122(8):1681-7.
83. Massingale ML, Li X, Vallabhajosyula M, Chen D, Wei Y, Asbell PA. Analysis of inflammatory cytokines in the tears of dry eye patients. *Cornea* 2009; 28:1023- 1027.
84. Masson PL, Heremans JF, Dive C. An iron binding protein common to manxternal secretions. *Clin Chim Acta* 1966; 14:735-739.
85. Mathers WD, Daley T, Verdick R. Video imaging of the meibomian gland. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:448-449.
86. Matsumoto Y, Dogru M, Goto E, Ohashi Y, Kojima T, Ishida R, Tsubota K. Autologous serum application in the treatment of neurotrophic keratopathy. *Ophthalmology* 2004; 111:115-1120
87. Maurice DM. A new objective fluorophotometer. *Exp Eye Res.* 1963; 2:33- 38.

88. Méndez Fernández R, Benítez del Castillo JM. Suero autólogo. En: Superficie ocular. LXXX Ponencia de la Sociedad Española de Oftalmología. 2004
89. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. A non-invasive instrument for clinical assessment of the pre-corneal tear film stability. *Curr Eye Res.* 1985; 4:1-7.
90. Merayo Lloves J. Conceptos actuales de ojo seco. Del síndrome a la enfermedad. 2008
91. Messmer EM, Bulgen M, Kampik A. Hyperosmolarity of the tear film in dry eye síndrome. *Dev. Ophthalmol* 2010; 45:129-38
92. Mishima S, Gasset A, Klyce SD, Jr., Baum JL. Determination of tear volume and tear flow. *Invest Ophthalmol* 1966; 5:264-276.
93. Mrugacz M, Ostrowska L, Lazarczyk-Kirejczyk J, Bryl A, Mrugacs G, Stefanska E, Szulc A Dry eye disease in patients treated with antidepressants. *Klin Oczna* 2013; 115(2):111-4
94. Muñoz Hernández AM, Benítez del Castillo JM. Alteración de superficie. Capítulo 3 A de libro: Glaucoma y cirugía refractiva, 2008; 139:148
95. Murube-del-Castillo J, Cortes-Rodrigo MD. Eye parameters for the diagnosis of xerophthalmos. *Clin Exp Rheumatol.* 1989; 7:145-150.
96. Nakamura H, Hayakawa K, Sawaguchi S, Gaja T. Removal of retinal indocyanine green dye by autologous serum irrigation in macular hole surgery. *Retina* 2005; 25:736-741
97. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res.* 1998; 17:673-676.
98. Nelson JD, Gordon JF. Topical fibronectin in the treatment of keratoconjunctivitis sicca. Chiron Keratoconjunctivitis Sicca Study Group. *AmJ Ophthalmol* 1992; 114:441-7.
99. Nikolaos G, Ziakas MD, Konstaninos G et al. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions. *Clinical and experimental Ophthalmology* 2010; 38:683-687.
100. Noble BA, Loh RS, MacLennan S, Pesudovs K, Reynolds A, Bridges LR, et al. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in a randomised controlled crossover trial for ocular surface disease. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 647-652.
101. Norm MS. Dessication of the precorneal film. Corneal wetting-time. *Acta Ophthalmol* 1969; 47:865-880.
102. Norm M. Quantitative tear ferning. Clinical investigations. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 1994; 72:369-372.

103. Ogawa Y, Okamoto S, Mori T, Yamada M, Mashima Y, Watanabe R, et al. Autologous serum eye drops. For the treatment of severe dry eye in patients with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:579-583
104. Patel S, Farrell J, Blades KJ, Grierson DJ. The value of a phenol red impregnated thread for differentiating between the aqueous and non-aqueous deficient dry eye. *Ophthalmic Physiol Opt* 1998; 18:471-476.
105. Pinto Fraga FJ, Garrote Rodríguez JI, Abengoza Vela A et al Técnicas diagnósticas para el síndrome de ojo seco I. *Gaceta de optometría y óptica oftálmica* 2011 DEC (465) 12-20
106. Pinto Fraga FJ, Garrote Rodríguez JI, Abengoza Vela A et al Técnicas diagnósticas para el síndrome de ojo seco II. *Gaceta de optometría y óptica oftálmica* 2012 ene(466)
107. Poon AC, Geerling G, Dart JK, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001; 85:1188-97.
108. Pult H, Sickenberger W. LIPCOF and contact lens wearers. A new tool of forecast subjective dryness and degree of comfort of contact lens wearers. *Contactología*. 2000; 22:74-79.
109. Qing P, Angelina A, Zambrano A, Marrone M et al. Autologous serum eyedrop for Dry Eye. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2013; Issue 8 Art n° CD 009327
110. Real Decreto 1015/2009, de 19 de junio, por el que se regula la disponibilidad de medicamentos en situaciones especiales.
111. 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.
112. Real Decreto 175/2001 de 23 de febrero, por el que se aprueban las normas de correcta elaboración y control de calidad de fórmulas magistrales y preparado oficinales.
113. Real Decreto-ley 9/2014, de 4 de julio, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos.
114. Rieger G. Das trockene Auge. Symptomatik Urchassenose, therapie. *Spektr Augenheilkd* 1990; 6:481-6
115. Rodríguez Torres L.A, Porrás Machado D.J, Villegas-Guzmán A.E, Molina-Zambrano J.A. Relación de índice de superficie ocular con pruebas objetivas y tratamiento del ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol* v.85 n.2 Madrid feb 2010

116. Rolando M. Tear mucus ferning test in normal and keratoconjunctivitis sicca eyes. *Chibret International Journal of Ophthalmology*. 1984; 2:32-41.
117. Roman Morilla Ch, Mayorga Pastrana C, Falcón Morales F, Galeote Padilla A, Rizo Alfaro P, Garín Ferreira R, Hdez Lamas MC, Prat Arrojo I. Análisis del procedimiento de terapia biológica con colirio autólogo ante el “Síndrome del ojo seco”. *AEBT*. 2008
118. Rucker CW. Keratitis sicca. Report of a case. *Arch Ophthalmol* 1938; 19: 584-5
119. Sce CW, Bilonich RA, et al. Comparison of two methods for composite score generation i dry eye síndrome. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54:6280-6
120. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye síndrome among US women. *Am J Ophthalmol* 2003; 136:318-326
121. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana MR. Prevalence of dry eye síndrome among US men: estimates from the Physician Health Studies. *Arch Ophthalmol* 2009; 127:763-768
122. Sharma A, Anushree S, Hindman HB. Aging: A Predisposition to Dry Eyes. *J Ophthalmol*. Volume 2014, Article ID 781683, 8 pages
123. Shtein RM, Post-LASIK dry eye. *Expert Rev Ophthalmol* 2011. Oct; 6(5):572-582
124. Sierra Santos L, Sendino Revuelta A, Pacheco Cuadros R, Aparicio Jabalquinto G, Barbado Hernández FJ. Tiroiditis de Hashimoto y síndrome de Sjögren: ¿Asociación o síndrome múltiple autoinmune?. *An. Med. Interna (Madrid)* [revista en Internet] 2001 Feb; 18(2):42-43.
125. Soares EJ, França VP. Transplantation of labial salivary glands for severe dry eye treatment]. *Arq Bras Oftalmol* 2005 Jul-Aug; 68(4):481-9. Epub 2005 Nov 22
126. Tabbara KF, Okumoto M. Ocular Ferning test. A qualitative test for mucus deficiency. *Ophthalmology* 1982; 89(6):712-4
127. Takashi Kojima MD, Akihiro H, Eiki G et al. Autologous serum eye drops for the treatment of Dry Eye diseases. *Cornea* 2008; 27(suppl 1):525-530
128. Tananuvat N, Daniell M, Sullivan LJ, Yi Q, McKelvie P, McCarty DJ, et al. Controlled study of the use of autologous serum in dry eye patients *Cornea* 2001; 20:802- 806.
129. Tapie R. Etude biomicroscopique des glandes de meibomius. *Ann Oculistique*. 1977; 10:637–648.
130. Terry RL, Schnider CM, Holden BA, et al. CCLRU standards for success of daily and extended wear contact lenses. *Optom Vis Sci*. 1993; 70:234-243.

131. Teson M, Lopez-Miguel A, Neves H, Calonge M, Gonzalez garcia MJ, Gonzalez Méijome JM. Influence of climate on clinical Diagnostics Dry eye Test. Pilot study. *Optom Vis sci* 2015 Jul 22
132. Tomlinson A, Blades KJ, Pearce EI. What does the phenol red thread test actually measure? *Optom Vis Sci* 2001; 78:142-146.
133. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:4309-4315.
134. Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997; 124:825-835.
135. Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:390-395.
136. Tsubota K, Goto E, Shimmura S, Shimazaki J. "Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application". *Ophthalmology* 1999; 106:1984-1989.
137. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takamo Y, Ono M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Steven-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996; 122:38-52
138. Vajpayee RB et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:1312-1316.
139. Van Bijsterveld OP. Diagnostic test in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969; 82: 10-14
140. Van Bijsterveld OP. Proceedings: The lysozyme agar diffusion test in the sicca syndrome. *Ophthalmologica* 1973; 167:429-432.
141. Versura P, Profazio V, Campos EC. Performance of tear osmolarity compared to previous diagnostic test for dry eye disease. *Curr Eye Res* 2010; 35:553-64
142. Versura P, Profazio V, Campos EC. A critical look at meibometry as a means to monitor Meibomian gland function. *Acta Ophthalmol.* 2010; 88
143. Versura P, Profazio V, Buzzi M et al. Efficacy of standardized and Quality-Controlled Cord blood serum eye droptotherapy in the healing of severe corneal epithelial damage in dry eye. *Cornea* 2013; vol 32 n°4
144. Vico E, Benítez del Castillo JM, Gimenez RA, Fernandez C, Garcia SJ. Tear function index validation for dry eye diagnosis. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004; 79:265-271.

145. Voak D, Cann R, Finney RD, Fraser ID, Mitchell R, Murphy MF, et al. Guidelines for administration of blood products: transfusion of infants and neonates. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. *Transfus Med* 1994; 4:63-69.
146. Wang HF, Fukuda M, Shimomura Y. Diagnosis of dry eye. *Semin Ophthalmol*. 2005; 20:53-62.
147. Weisbach V, Dietrich T, Kruse FE, Eckstein R, Cursiefen C. HIV and hepatitis B/C infections in patients donating blood for use as autologous serum eye drops. *Br J Ophthalmol* 2007 Dec; 91(12):1724-5
148. Wolffsohn JS. Incremental nature of anterior eye grading scales determined by objective image analysis. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:1434-1438
149. Xu KP, Tsubota K. Correlation of tear clearance rate and fluorophotometric assessment of tear turnover. *Br J Ophthalmol* 1995; 79:1042-1045.
150. Yamada C, King KE, Ness PM. Autologous serum eyedrops: literature review and implications for transfusion medicine specialist. *Transfusion* Jun 2008; 48:1245-1255
151. Yoon KC, Heo H, Jeong IY, Park YG. Therapeutic effect of umbilical cord serum eye drops for persistent epithelial defect. *Korean J Ophthalmol* 2005; 19:174 –178.
152. Yoon KC, Im SK, Park YG, Jung YD, Yang SY, Choi J. Application of umbilical cord serum eye drops for the treatment of dry eye syndrome. *Cornea* 2006; 25:268 – 272.
153. Yoon KC, Jeong IY, Im SK, Park YG, Kim HJ, Choi J. Therapeutic effect of umbilical cord serum eye drops for the treatment of dry eye associated with graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39:231–235.
154. Yoshino K, Garg R, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder SC. Production and secretion of transforming growth factor beta (TGF-beta) by the human lacrimal gland. *Curr Eye Res* 1996; 15:615–24.
155. You L, Ebner S, Kruse FE. Glial cell-derived neurotrophic factor(GDNF)-induced migration and signal transduction in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:2496-2504
156. Young AL, Cheng Ac, Ng HK, Cheng LL, Leung GY, Lam DS. The use of autologous serum tears in persistent corneal epithelial defects. *Eye* 2004; 18:609-614
157. Ziakas NG, Boboridis KG, Terzidou C, Naoumidi TL, Micropoulos D, Georgiadou EN, Georgiadis NS. Long-term follow up of autologous serum treatment for recurrent corneal erosions. *Clin Experiment Ophthalmol* 2010 Oct; 38(7):683-7. doi: 10.1111/j.1442-9071.2010.02304.x. Epub 2010 Jul 9.