

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



## **TESIS DOCTORAL**

Estudio de la liofilización y envases con filtro para optimizar la terapia con colirio de suero autólogo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Miguel Viso Garrote**

DIRECTORES

**Santiago López García**  
**David Díaz Valle**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Doctorado en Ciencias de la Visión**



ESTUDIO DE LA LIOFILIZACIÓN Y ENVASES CON FILTRO PARA  
OPTIMIZAR LA TERAPIA CON COLIRIO DE SUERO AUTÓLOGO.

Miguel Viso Garrote

Directores

Santiago López García

David Diaz Valle

## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS:**

*Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que han colaborado a lo largo de estos años en la realización de esta tesis doctoral.*

*Al Dr. Santiago López García, director de la tesis, por su inestimable ayuda en la realización de este trabajo, no solo por su dedicación y su absoluta disponibilidad sino también por haberme enseñado tanto durante mi residencia, por sus consejos en lo profesional y en lo personal.*

*Al Dr. David Diaz Valle, director de la tesis, por su generosa dedicación y aportación en la realización de este trabajo.*

*A Rosario Cortés y Victoria Portus, del Servicio de Microbiología, y a Raquel Fuentes, del Servicio de Farmacia del Hospital de la Cruz Roja, por su inestimable ayuda en la elaboración de este trabajo.*

*Al Dr. Luis Rivas Jara, del laboratorio de ojo seco del Hospital Ramón y Cajal por su inestimable contribución en la realización de los cultivos celulares.*

*A las Dras. Rafaela Raposo y María Teresa Méndez, de la Escuela de Análisis Clínicos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, por su trabajo en la determinación de los factores de crecimiento y en la liofilización del suero autólogo.*

*A los pacientes que decidieron participar generosamente en este estudio, a pesar de las molestias que ello les suponía.*

*Y por supuesto, quiero dar el agradecimiento más afectuoso a mi familia: Carmen, Salvador, Salva y Rocío. ¡Gracias por todo!*

## **ÍNDICE**

### **RESUMEN**

8

### **ABSTRACT**

11

## **1.INTRODUCCIÓN**

15

### **1.1.- Estado actual del tema**

16

### **1.2.- Superficie ocular**

18

#### **1.2.1.- Conjuntiva**

21

#### **1.2.2.- Córnea**

23

##### 1.2.2.1.- Epitelio

24

##### 1.2.2.2.- Membrana de Bowman

25

##### 1.2.2.3.- Estroma

26

##### 1.2.2.4.- Membrana de Descemet

26

##### 1.2.2.5.- Endotelio

27

#### **1.2.3.- Limbo esclerocorneal**

27

#### **1.2.4.- Película lagrimal**

30

##### 1.2.4.1.- Capa mucoacuosa

31

##### 1.2.4.2.- Capa lipídica

33

#### **1.2.5.- Párpados**

35

#### **1.2.6.- Aparato lagrimal**

35

### **1.3.- Suero autólogo**

36

#### **1.3.1.- Propiedades del suero autólogo**

37

##### 1.3.1.1.- Preparación, dispensación y posología del suero autólogo

46

##### 1.3.1.2.- Suero autólogo: Riesgos específicos, efectos adversos y contraindicaciones

48

#### **1.3.2.- Aplicaciones en oftalmología**

49

##### 1.3.2.1.- Defectos epiteliales persistentes

49

##### 1.3.2.2.- Ojo seco grave

51

##### 1.3.2.2.1.- Ojo seco secundario a síndrome de Sjögren

52

##### 1.3.2.3.- Úlcera neurotrófica

53

##### 1.3.2.4.- Erosión corneal recurrente

54

##### 1.3.2.5.- Insuficiencia limbar

55

##### 1.3.2.6.- Defectos epiteliales tras cirugías

57

##### 1.3.2.7.- Cirugías de reconstrucción de la superficie ocular

59

1.3.2.8.- Enfermedad injerto contra huésped	59
1.3.2.9.- Queratoconjuntivitis límbica superior	60
1.3.2.10.- Úlcera de Mooren	61
1.3.2.11.- Queratitis ulcerativa periférica	62
1.3.2.11.-Queratopatía por exposición	62
<b><u>1.4.- Liofilización</u></b>	66
<b>1.4.1.- Bases de la liofilización</b>	66
<b>1.4.2.- Historia de la liofilización</b>	68
<b>1.4.3.- Fases de la liofilización</b>	70
1.4.3.1.- Pretratamiento	71
1.4.3.2.- Congelación	71
1.4.3.3.- Secado primario	71
1.4.4.4.- Secado secundario	72
<b>1.4.4.- Usos de la liofilización</b>	73
1.4.4.1.- Liofilización de productos farmacéuticos	73
1.4.4.2.- Liofilización de alimentos	74
1.4.4.3.- Liofilización en la industria tecnológica	75
1.4.4.4.- Otros usos	75
<b><u>1.5.- Filtros</u></b>	76
<b>1.5.1.- Bases de la filtración</b>	76
<b>1.5.2.- Historia de la filtración</b>	77
<b>1.5.3.- Uso de los filtros en medicina</b>	78
<b>1.5.4.- Filtros millipore</b>	79
<b>1.5.5.- Polietersulfona</b>	80
<b><u>2.- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u></b>	81
<b><u>3.- MATERIAL Y MÉTODOS</u></b>	86
<b><u>3.1.- Preparación del colirio de suero autólogo</u></b>	88
3.1.1.- Para el estudio del suero liofilizado	88
3.1.2.- Para el estudio de los envases con filtro	91
<b><u>3.2.- Estudios de Laboratorio</u></b>	94
3.2.1.- Concentración de los factores de crecimiento	94
3.2.2.- Estudio de los cultivos celulares	97

3.2.3.- Estudio del pH, osmolaridad y densidad	101
3.2.4.- Estudio de contaminación microbiológica	102
<u>3.3.- Estudio estadístico</u>	105
<b><u>4.- RESULTADOS</u></b>	107
<u>4.1.- Concentración de los factores de crecimiento</u>	108
<u>4.2.- Estudio del pH, osmolaridad y densidad</u>	109
<u>4.3.- Estudio de los cultivos celulares</u>	110
4.3.1.- Proliferación celular	110
4.3.2.- Diferenciación celular	114
<u>4.4.- Contaminación microbiológica</u>	116
<b><u>5.- DISCUSIÓN</u></b>	121
<u>5.1.- Utilidad del suero autólogo</u>	122
<u>5.2.- Dificultades con la terapia convencional</u>	122
<u>5.3.- Mejorando los sistemas de producción     del suero autólogo</u>	123
5.3.1.- Vehiculización con ácido hialurónico	124
5.3.2.- Envases con filtros	127
<u>5.4.- Condiciones de almacenamiento</u>	135
5.4.1.- Congelación	135
5.4.2.- Liofilización	138
5.4.3.- Comparación congelación / liofilización	142
<b><u>6.- CONCLUSIONES</u></b>	148
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	153

## **RESUMEN**

### **Objetivo:**

Estudiar los efectos de la liofilización del suero autólogo sobre la concentración de los factores de crecimiento y sus efectos biológicos, así como la utilización de filtros esterilizantes en los envases como estrategias para optimizar la terapia con colirio de suero autólogo.

### **Diseño:**

El trabajo se estructura en dos estudios en paralelo:

- Estudio experimental, prospectivo y comparativo de los efectos de la liofilización en suero autólogo preparado a partir de sangre procedente de 12 voluntarios sanos.
- Estudio experimental, prospectivo y comparativo de contaminación microbiológica entre envases convencionales y envases con filtro esterilizante adaptado.

### **Método:**

Para el estudio de los efectos de la liofilización en el suero, se determinó la concentración de diferentes factores de crecimiento epiteliotróficos en suero autólogo fresco y suero autólogo liofilizado: factor de crecimiento transformante beta 1 (TFG- $\beta$ 1), factor de crecimiento epitelial (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB) y albúmina. Las muestras de suero autólogo fresco fueron estudiadas inmediatamente después a su preparación, mientras que

las muestras de suero liofilizado fueron estudiadas inmediatamente tras su reconstitución con suero salino así como 15 y 30 días después de su reconstitución. El suero reconstituido se conservó a 4°C durante los 30 días del estudio.

En paralelo, estudiamos en cultivos de células epiteliales, corneales y conjuntivales, el efecto biológico de la adición de ambos preparados, suero fresco y liofilizado, a los medios de cultivo convencionales.

También se determinó el pH, osmolaridad y densidad del suero en muestras de ambos preparados biológicos.

Para el estudio de contaminación microbiológica, se estudiaron 176 envases de suero autólogo utilizados en terapia domiciliaria: 48 de ellos incluían un filtro adaptado y los otros 128 eran envases convencionales. Los envases con filtro se analizaron tras 28 días de uso, mientras que los envases convencionales se estudiaron después de 7 días de utilización. En todos los casos la preparación del suero autólogo fue similar. Se empleó agar sangre y agar chocolate como medios de cultivo para los estudios microbiológicos mientras que para los estudios de hongos se usó agar Sabouraud con cloranfenicol.

### **Resultados:**

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de los factores de crecimiento entre muestras de suero autólogo fresco y suero reconstituido tras la liofilización. La concentración de los factores de crecimiento en el suero reconstituido permaneció estable a los 15 y 30 días.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre osmolaridad, pH y densidad determinadas en muestras de suero fresco y liofilizado,

ni tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sus efectos biológicos sobre la proliferación y diferenciación de las células epiteliales en los cultivos celulares.

Sólo uno de los envases con filtro esterilizador (2,1%) se contaminó con *Staphylococcus epidermidis* tras un mes de tratamiento, mientras que la tasa de contaminación en los envases convencionales alcanzó el 28,9% tras 7 días de uso. Los gérmenes más frecuentes encontrados en las muestras fueron *Staphylococcus coagulasa negativo* (48,6%).

### **Conclusiones:**

Las propiedades del suero autólogo se conservan tras la liofilización. El suero autólogo liofilizado puede ser conservado y almacenado sin restricciones de temperatura y puede ser fácilmente reconstituido para la preparación de colirio de uso clínico habitual.

El uso de envases con filtro adaptado reduce significativamente la tasa de contaminación del colirio de suero autólogo, extendiendo así el uso de cada recipiente hasta las 4 semanas sin prácticamente riesgo de contaminación.

## **ABSTRACT**

### **Objective:**

To study the effects of lyophilization of autologous serum on the concentration of growth factors and their biological effects, as well as the use of sterilizing filters in containers as strategies to optimize therapy with autologous serum eye drops.

### **Design:**

The work is structured in two parallel studies:

Experimental, prospective and comparative study with autologous serum from 12 healthy volunteers.

Experimental, prospective and comparative study of microbiological contamination involving conventional containers and containers with an adapted sterilizing filter.

### **Methods:**

For the study of the effects of lyophilization on serum the concentration of different epitheliotropic growth factors was measured in fresh autologous serum and lyophilized autologous serum: transforming growth factor beta 1 (TFG- $\beta$ 1), epithelial growth factor (EGF), platelet-derived growth factor AB (PDGF-AB) and albumin. The samples were studied after serum preparation (fresh serum) and immediately after saline solution reconstitution of lyophilized serum (0), 15, and 30 days later.

In parallel, the biological effects of both serum samples were compared on conjunctival and corneal cell cultures.

The pH, osmolarity, and serum density were also determined in both samples.

For the study on microbiological contamination, one hundred seventy-six autologous serum containers used in home therapy were studied; 48 of them included an adapted filter and the other 128 were conventional containers. Containers equipped with a filter were tested after 28 days of use, whereas conventional containers were studied after 7 days of use. In all cases, the preparation of the autologous serum was similar. Blood agar and chocolate agar were used as regular culture media for the microbiologic studies, whereas Sabouraud agar with chloramphenicol was the medium for fungal studies.

### **Results:**

No significant differences were found in the concentration of growth factors between fresh serum and re-dissolved serum samples after lyophilization. The concentration of growth factors remained stable at 15 and 30 days. No differences were found related to osmolarity, pH, and density between fresh and lyophilized serum. In addition, no differences were found on the conjunctival and corneal cells proliferation and differentiation in cells cultures between either serum preparation.

Only one of the containers with an adapted sterilizing filter (2.1%) became contaminated with *Staphylococcus epidermidis* after 1 month of treatment, whereas the contamination rate among conventional containers reached 28.9% after 7 days of use. The most frequent germs found in the samples were coagulase-negative *Staphylococcus* (48.6%).

**Conclusions:**

The properties of autologous serum remain after lyophilization. The lyophilized serum can be easily stored without temperature restrictions and easily reconstituted for preparation of eyedrops for standard clinical use.

Using containers with an adapted filter significantly reduces the contamination rates in autologous serum eyedrops, thus extending the use of such container by the patients for up to 4 weeks with virtually no contamination risks.



# 1. INTRODUCCIÓN

---

### **1.1 Estado actual del tema**

El suero es el producto remanente tras extraer de la sangre las células sanguíneas y las proteínas de la coagulación. Se conoce como suero autólogo al suero utilizado con fines terapéuticos en la misma persona de la que fue extraído, mientras que sería suero heterólogo cuando éste es utilizado para otra persona.

El empleo del suero autólogo en oftalmología aparece por la necesidad de utilizar sustitutos lagrimales que, además de humidificar y lubricar la superficie ocular, aporten otros componentes presentes en la lágrima y que se encuentran disminuidos en los casos de sequedad ocular (López-García et al., 2007).

Cuando se habla de ojo seco, no se hace referencia a un único estado patológico, sino que se incluyen una gran variedad de alteraciones de la superficie ocular de diversas causas que tienen en común un déficit en la funcionalidad de la lágrima. La expresión clínica del ojo seco varía desde pequeñas molestias oculares hasta cuadros graves que pueden llegar a producir ceguera por transformación metaplásica de la córnea o a ocasionar perforaciones que comprometan la integridad del globo ocular (López-García et al., 2003).

La córnea obtiene sus nutrientes (glucosa, electrolitos...) del humor acuoso, mientras que los factores de crecimiento, las vitaminas y los neuropéptidos necesarios para la proliferación y migración de las células provienen de la lágrima (Wilson & Liang, 1997), de ahí su especial importancia en la estabilidad y viabilidad del epitelio corneal y conjuntival (Tseng & Tsubota, 1997).

Los componentes del suero tienen efecto trófico sobre el epitelio conjuntival y corneal modulando la proliferación, migración y diferenciación celular. Gracias a estos efectos, el suero autólogo es una herramienta fundamental a la hora de tratar

patología del segmento anterior y la superficie ocular (Quinto, Campos & Behrens, 2008). De estos componentes, los más importantes son el Factor de Crecimiento Epiteial (EGF), el factor  $\beta$  Transformante del Crecimiento de los Fibroblastos (TGF- $\beta$ ), la vitamina A, la fibronectina, la albúmina, la  $\alpha$ 2 macroglobulina, el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), la sustancia P y el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Kruse & Tseng, 1993).

Mantener la actividad biológica del suero autólogo nos obliga a seguir un riguroso control tanto del método de preparación como de las condiciones de almacenamiento, lo que, en muchos casos, puede limitar su uso clínico (Bradley et al, 2009) (Partal & Scott, 2011). En este sentido, sería de gran interés dirigir las investigaciones a estudiar nuevas vías de producción, presentación y almacenamiento del colirio que faciliten su posología y disminuyan las frecuentes extracciones de sangre a las que se ven sometidos los pacientes que necesitan un tratamiento crónico. Trabajos previos han demostrado cómo la dilución del suero autólogo con hialuronato de sodio puede facilitar y optimizar el tratamiento con estos preparados (López-García et al, 2014). La liofilización es un método de conservación muy útil a la hora de preservar sustancias termolábiles, como las proteínas presentes en el suero autólogo. Diferentes estudios han confirmado que la liofilización es eficaz para preservar a largo plazo derivados hemáticos ya que al ser un proceso que se realiza en frío, los factores de crecimiento y el resto de sustancias termolábiles presentes en ellos no se ven alterados (Choi et al, 2001), (Li et Al, 2014), (Bode & Fishcer, 2007), (Zhang et al,2017).

La preparación del colirio de suero autólogo debe ser un proceso individualizado que no implique el uso de conservantes para evitar daños en la

superficie ocular. La consecuencia es una fácil contaminación de los envases, lo que limita su vida útil. Se recomienda no utilizar el mismo envase durante más de 7 días, incluso algunos autores recomiendan la utilización diaria de envases (Bradley et al, 2009) (Sitaramamma et al, 1998) (Maclennan et al, 2008). En este sentido, sería de gran utilidad investigar si el uso de filtros esterilizantes (0,22  $\mu\text{m}$ ) integrados en el envase de dispensación, disminuye el riesgo de contaminación y alarga la vida útil de estos productos, con la ventaja adicional de reducir la frecuencia y cantidad de sangre necesaria para su preparación.

El objetivo de nuestro trabajo fue doble: Por un lado, explorar a nivel experimental si la liofilización del suero autólogo puede ser una alternativa a la terapia convencional con estos preparados, para lo que estudiamos la viabilidad, estabilidad y eficacia biológica de los factores tróficos presentes en el suero autólogo reconstituido a partir de suero autólogo liofilizado, y por otro evaluar el efecto del uso de envases con filtro esterilizador adaptado sobre la contaminación del colirio de suero autólogo.

### **1.2 Superficie ocular**

La superficie ocular incluye al conjunto de estructuras y anejos oculares que se encuentran en contacto con el medio exterior. Comprende la córnea, la conjuntiva, la película lagrimal, los párpados y el aparato lagrimal, pero también la adecuada inervación sensitivo-motora y la regulación endocrina por hormonas del eje hipotálamo-hipófisis. Una adecuada integración anatómica y funcional de estos

elementos es fundamental para mantener el correcto funcionamiento de la superficie ocular (Tseng & Tsubota, 1997) (Figuras 1 y 2).

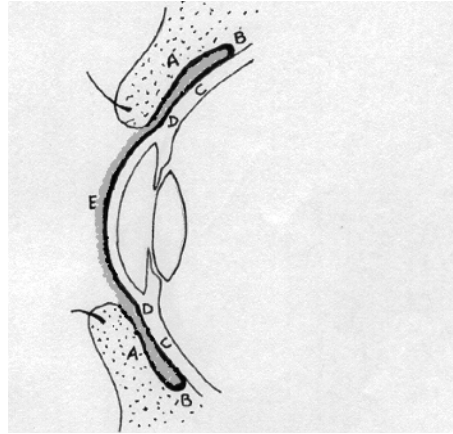


Figura 1a

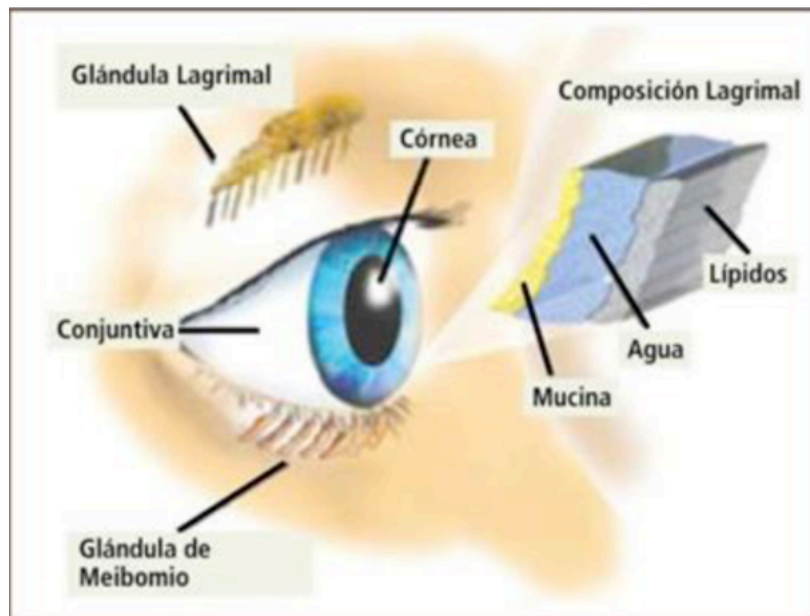


Figura 1b

**Figura 1a y 1b: Esquema de la superficie ocular: A- conjuntiva palpebral, B- fornix, C- conjuntiva bulbar, D- limbo, E- córnea. La película lagrimal está representada por la línea gris.** Extraído de Actualización clínica en OJO seco para el médico no oftalmólogo - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: [https://www.researchgate.net/figure/Superficie-Ocular-Y-Pelicula-Lagrimal\\_fig4\\_272641328](https://www.researchgate.net/figure/Superficie-Ocular-Y-Pelicula-Lagrimal_fig4_272641328).

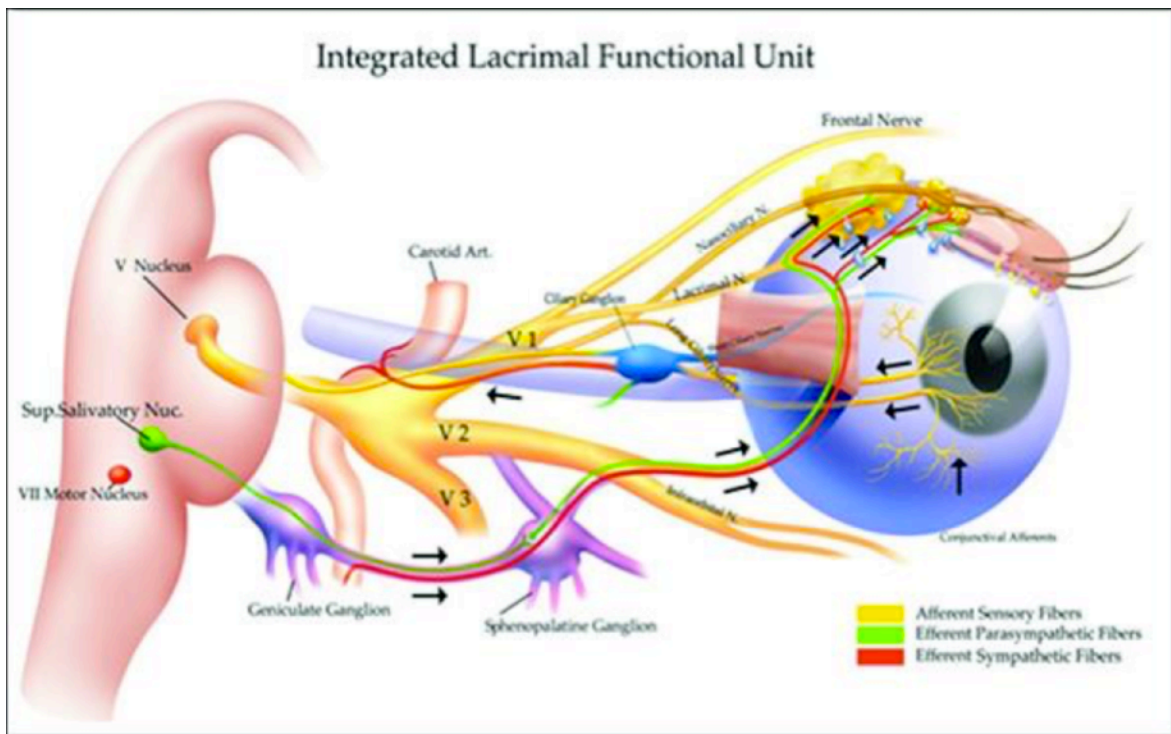


Figura 2a

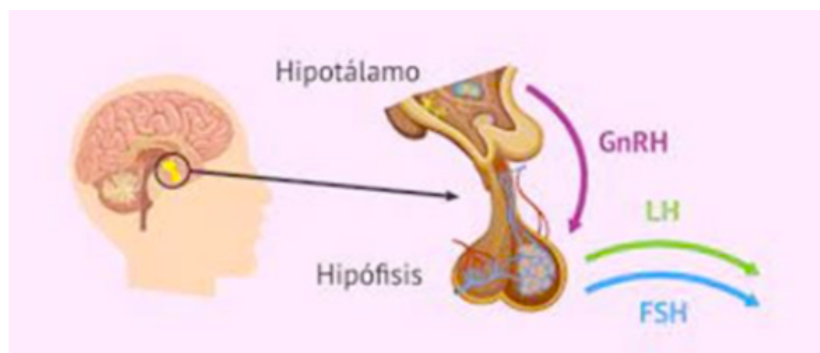


Figura 2b

**Figura 2a y 2b: Inervación sensitivo-motora de la vía lagrimal y regulación endocrina vía hormonas del eje hipotálamo-hipófisis.**

Extraído de <https://images.app.goo.gl/supUzfdRbhqj2MYC9> y de Stern, Michael E.. (2005). Dry eye: Is this a disease or a natural consequence of aging?. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología, 80 (3), 129-131

### 1.2.1 Conjuntiva

La conjuntiva es la capa mucosa transparente que recubre la superficie interna de los párpados y la parte anterior de la esclera.

Podemos diferenciar entre: conjuntiva tarsal, que recubre la cara interna de los párpados; conjuntiva bulbar, que se encuentra sobre la esclera anclada a ella mediante la cápsula de Tenon; y fórnix conjuntival, que forma el fondo de saco que une la conjuntiva tarsal y la bulbar y que es más laxo y flexible para permitir el movimiento del globo ocular y el parpadeo.

Histológicamente la conjuntiva se compone de epitelio y estroma.

El epitelio es estratificado no queratinizado, compuesto por entre 3 y 7 capas de células en función de su localización. En la capa externa presenta microvellosidades y micropliegues, así como un glicocáliz, que aumentan la superficie conjuntival y facilitan la estabilidad de la película lagrimal. (Nichols, Dawson & Togni, 1983). El epitelio conjuntival presenta células caliciformes, glándulas apocrinas productoras de mucina, distribuidas entre las células epiteliales por toda la conjuntiva (Figura 3). Las células epiteliales y las células caliciformes parecen derivar de un progenitor común (Pellegrini et al, 1999). Además, podemos encontrar en menor número otras células que aparecen dispersas entre el epitelio conjuntival como melanocitos, linfocitos y células de Langerhans.

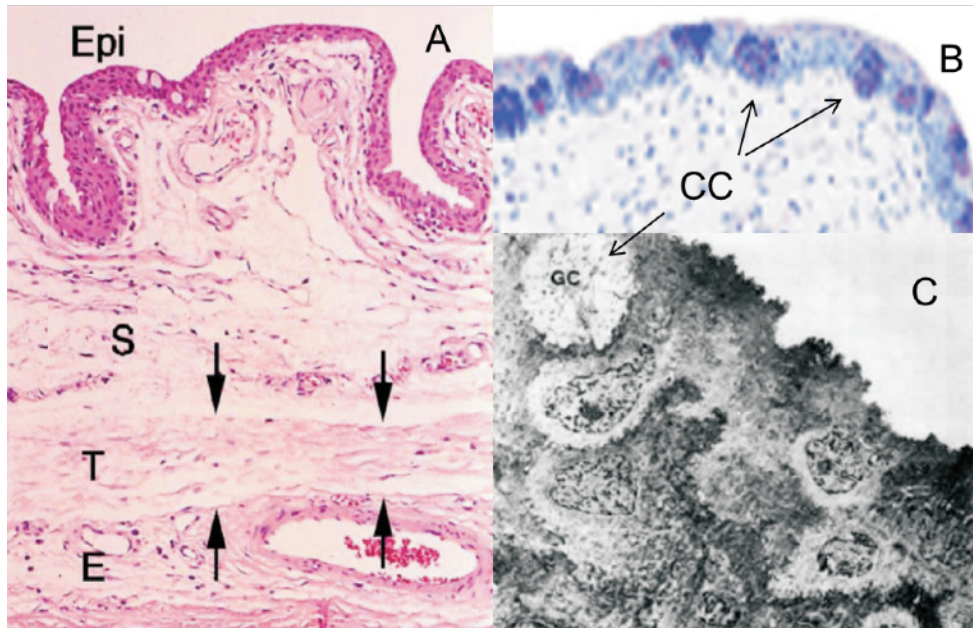
El estroma conjuntival se compone de dos capas: una superficial linfoide y una profunda fibrosa. Es un tejido muy vascularizado que presenta fibroblastos, linfocitos, mastocitos, células plasmáticas y neutrófilos (McClellan, 1997) (Figura 4).

Además, en la conjuntiva se encuentran dos tipos de glándulas lagrimales accesorias: glándulas de Krause y de Wolfring, con estructura similar a la glándula lagrimal principal.

Las tres funciones principales de la conjuntiva son: aportar estabilidad a la película lagrimal, defensa de la superficie ocular y vascularización del limbo.



**Figura 3. Microscopia electrónica de una célula caliciforme rodeada por células epiteliales. Se puede apreciar cómo está rellena de gránulos de mucina sobre todo en la zona apical que están a punto de ser liberados** Adaptado de Gipson, I.K. (2016). *Goblet cells of the conjunctiva: A review of recent findings. Progress in Retinal and Eye Research*, 54, 49-63.

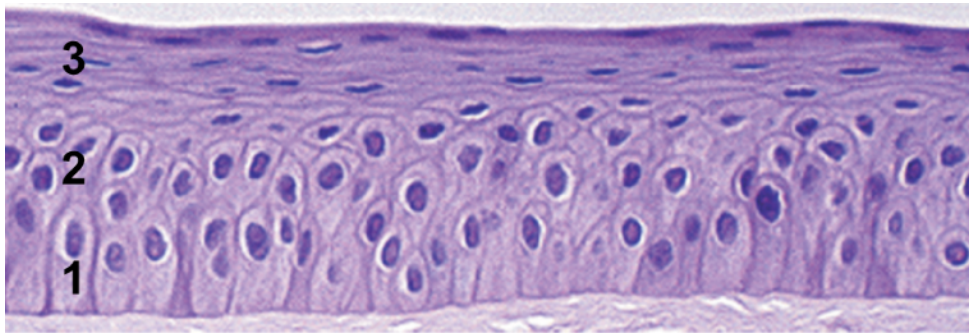


**Figura 4. Histología de la conjuntiva. [A] Corte histológico completo: (Epi) Epitelio, (S) Estroma, (T) Capsula de Tenon, (E) Epiesclera. [B] Epitelio y estroma. (CC) Células Caliciformes. [C] Microscopía electrónica del epitelio conjuntival.** Extraído de Kanski, Oftalmología Clínica (2011)

### 1.2.2 Córnea

La córnea es una estructura compleja y altamente diferenciada que permite la refracción y la transmisión de la luz al interior del ojo. Tiene una superficie anterior en contacto con la lágrima y una posterior en contacto con el humor acuoso. La córnea es avascular, se nutre y elimina sus sustancias de desecho a través del humor acuoso. Esta ausencia de vascularización junto con la pérdida de mielina que muestran sus terminaciones nerviosas en el paso por el limbo corneal permiten que la córnea sea transparente.

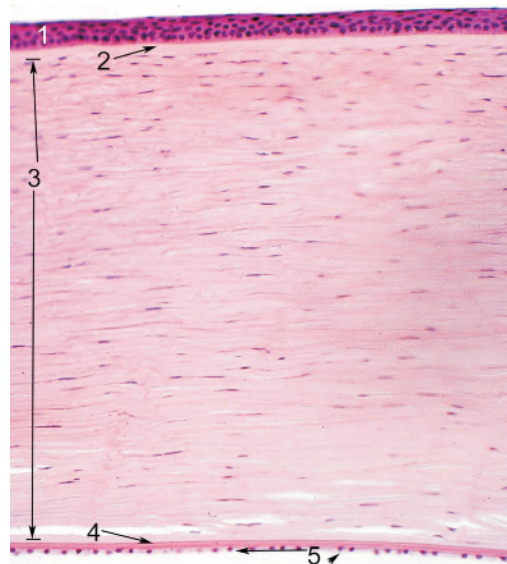
La córnea está formada por cinco capas: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Figura 5).



**Figura 5. Corte histológico de la córnea. 1. Epitelio. 2. Membrana de Bowman. 3. Estroma. 4. Membrana de Descemet. 5. Endotelio.** Extraído de Kanski, Oftalmología Clínica (2011)

#### 1.2.2.1 Epitelio corneal

Se trata de un epitelio estratificado no queratinizado con entre 5 y 7 capas celulares. Se distinguen en él tres tipos de células: basales, alares y superficiales (Figura 6).



**Figura 6. Corte histológico de la córnea. (1) Células basales, (2) Células alares, (3) Células superficiales.** Extraído de Kanski, Oftalmología Clínica (2011)

Las células basales forman una única capa de células cilíndricas que se unen a la membrana basal mediante hemidesmosomas. Al dividirse, las células hijas se dirigen hacia la superficie transformándose en células alares.

Las células alares son ricas en filamentos de actina, fundamental para la migración celular (Gipson & Anderson, 1980). Forman entre 3 y 5 capas de células que se van haciendo más planas cuanto más cerca de la superficie se encuentran.

Sobre las células alares se encuentran las células superficiales, formando una única capa de células planas y hexagonales. Poseen un glicocáliz formado por proyecciones de polisacáridos que lubrica, retiene agua y dificulta la adhesión de patógenos a la superficie ocular (Argueso, 2013).

Las células madre del epitelio corneal están fundamentalmente en el limbo esclerocorneal (Zieske, Bukusoglu & Yankauckas, 1992), mientras que las células madre del epitelio conjuntival se encuentran dispersas por toda la conjuntiva, aunque en mayor medida en el fórnix (Chen et al, 2003). En ambos casos, son las células responsables de la renovación del epitelio corneal y conjuntival respectivamente.

La membrana basal es producida por las células basales y está formada por colágeno tipo IV y glicoproteínas como laminina y fibronectina. Se distinguen dos capas, una más superficial, la lámina lúcida, y otra más profunda denominada lámina densa.

Su función es la unión del epitelio a la membrana de Bowman.

### 1.2.2.2 Membrana de Bowman

Es una fina lámina acelular que se encuentra bajo el epitelio y que se acaba fundiendo con el estroma. Está formada por laminina, fibronectina y colágeno tipo

IV y VII. Actúa como barrera y como anclaje del epitelio al estroma (Ljubimov et al, 1995)

### 1.2.2.3 Estroma

El estroma representa el 90% del grosor corneal. El 80% de su peso es agua. Además de agua, está formado por fibras de colágeno, sustancia fundamental y células. Las fibras de colágeno, fundamentalmente tipo I y V, se disponen en unas 200-250 láminas paralelas a la superficie. Todas las fibras de cada lámina están en la misma dirección y las láminas quedan apiladas con una distancia constante entre ellas y con una disposición oblicua con la lámina superior e inferior. Esta configuración es fundamental para mantener la transparencia corneal (Freegard, 1997).

La sustancia fundamental contiene proteoglicanos, que captan iones y agua y que ayudan a mantener la disposición de las fibras colágenas.

Las células predominantes en el estroma son los queratocitos. Están dispuestos entre las láminas de colágeno y sintetizan colágeno y proteoglicanos. Cuando hay una agresión se activan y migran a la zona de la herida contribuyendo a la formación de la cicatriz. Hay mayor cantidad de queratocitos en las proximidades a la membrana de Bowman y Descemet (Berlau et al, 2002).

### 1.2.2.4 Membrana de Descemet

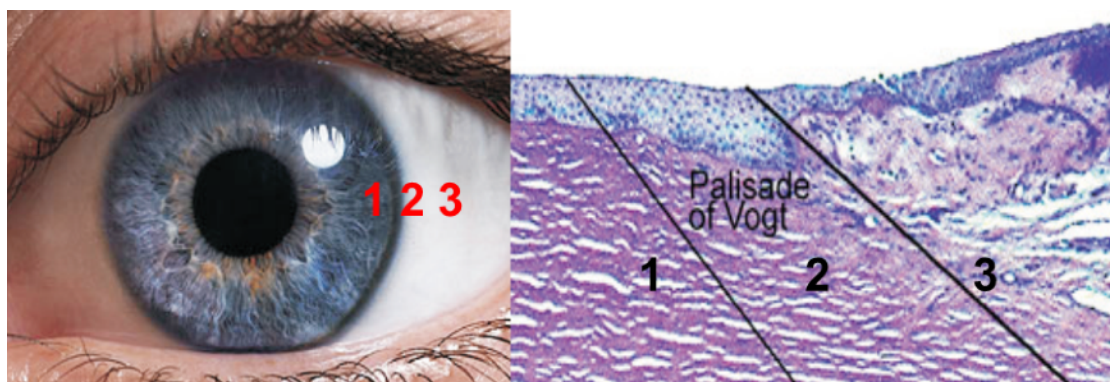
Es una membrana basal producida por las células endoteliales. Está compuesta por fibronectina y colágeno de los tipos IV y VII (Newsome et al, 1981).

### 1.2.2.5 Endotelio

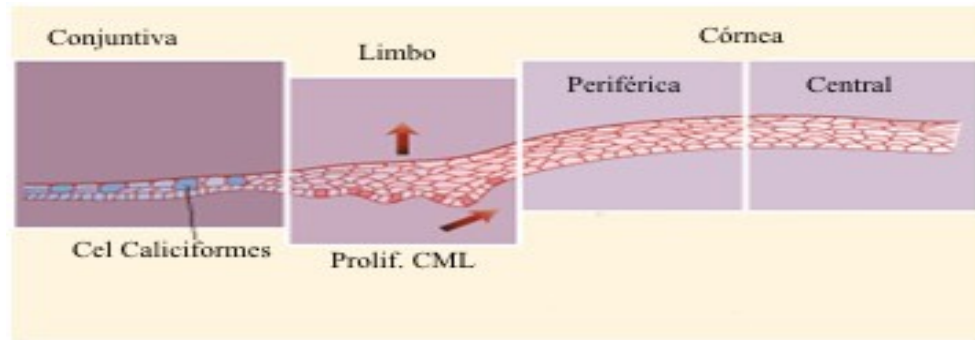
Compuesto por una única capa de células cuboideas sin capacidad de regeneración. Regulan el paso de sustancias desde el humor acuoso al estroma y deshidratan el estroma para mantener la transparencia corneal (Waring, 1982).

### **1.2.3 Limbo esclerocorneal**

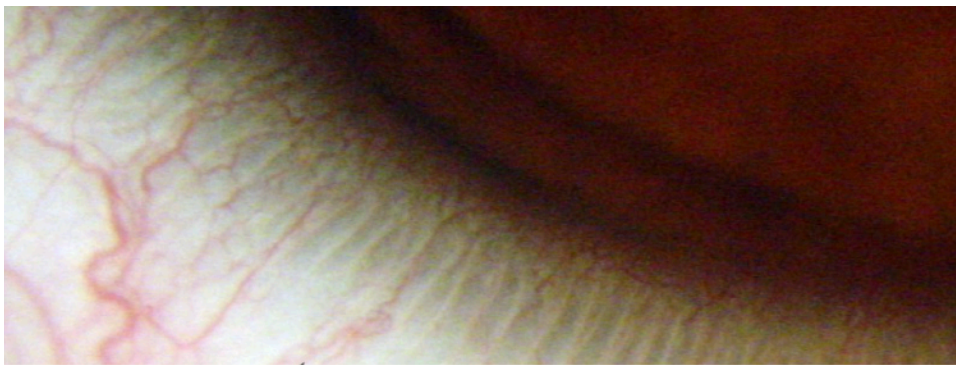
Es la zona de unión entre córnea, esclera y conjuntiva (Figuras 7 y 8). Es la zona de la superficie ocular con el epitelio más grueso, con hasta 12 capas celulares. Este epitelio se proyecta entre las papilas subepiteliales delimitando unas líneas blanquecinas de disposición radial que reciben el nombre de empalizadas de Vogt (Figura 9).



**Figura 7. Limbo esclerocorneal. (1) Córnea (2) Limbo (3) Conjuntiva.** Afrodriguezg, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0>>, via Wikimedia Commons



**Figura 8. Esquema del epitelio de la superficie ocular: a la izquierda, el epitelio conjuntival con las células caliciformes; en el centro, el epitelio limbal con las células madre limbares y a la derecha, el epitelio corneal.** Extraído de Kanski, *Oftalmología Clínica* (2011)



**Figura 9. Empalizadas de Vogt**

En el limbo se encuentran las células madre del epitelio corneal y tiene gran importancia en su regeneración. Las células madre derivan del neuroectodermo. Se dividen por mitosis dando lugar a otras células con gran capacidad mitótica llamadas células amplificadoras transitorias. Estas células amplificadoras transitorias continúan dividiéndose y se diferencian en células alares y superficiales que migran hacia el centro y hacia la superficie de la córnea (Thoft & Friend, 1983). Cuando una célula madre se divide, una de las células hijas mantiene su condición de célula madre mientras que la otra, después de algunas mitosis, inicia el proceso de diferenciación. De esta forma se consigue la autopropagación de la célula

madre y la renovación del epitelio corneal. (Beebe & Masters, 1996) (Kruse & Tseng, 1994).

Las células madre se ven influenciadas por algunos factores séricos, como el ácido retinoico (Kruse, 1994) y algunas proteínas de la familia del TGF- $\beta$  (You et al, 1999) que participan en la activación, proliferación y diferenciación celular del epitelio corneal.

En condiciones normales, las células basales corneales pueden ser suficientes para mantener el recambio fisiológico del epitelio corneal (Haddad, 2000).

La destrucción del limbo esclerocorneal da lugar a la vascularización de la superficie corneal, a la formación de un epitelio irregular con tendencia a la formación de úlceras recurrentes de difícil curación presentando clínica de dolor, fotofobia y pérdida de visión. Además, con el tiempo comienzan a aparecer células caliciformes en el epitelio dando lugar a una conjuntivalización del epitelio corneal.

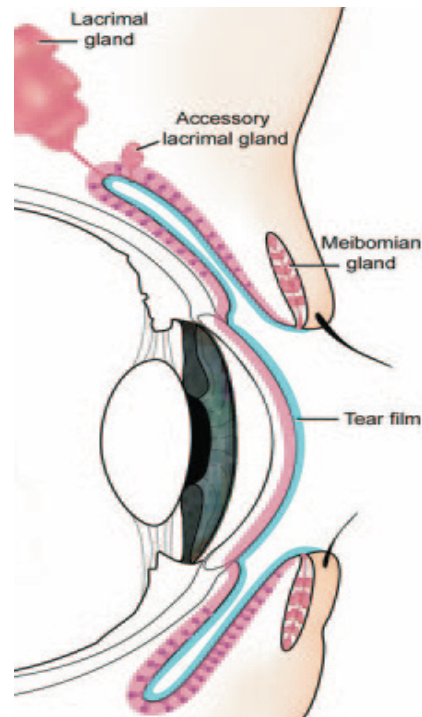
Normalmente esta destrucción se produce por agresiones externas que llevan asociada una inflamación prolongada (Tsai & Tseng, 1995). También hay trabajos que relacionan casos de insuficiencia limbar tras un procedimiento de queratectomía fototerapéutica (Nghiem-Buffer et al, 2003). Otros casos de insuficiencia limbar menos habituales pueden ser la queratopatía de los pacientes con aniridia (López-García et al, 2008) y la insuficiencia limbar idiopática (España et al, 2002).

### 1.2.4 Película lagrimal

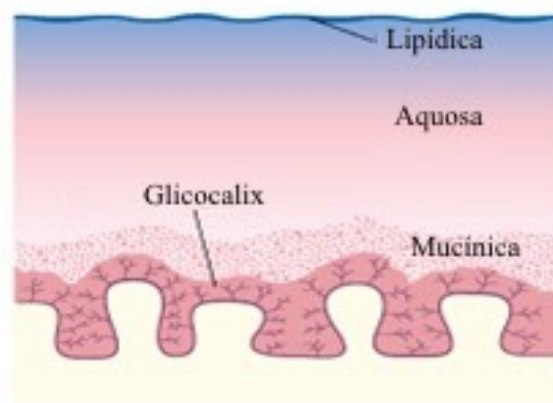
La película lagrimal es una fina película fluida que cubre la zona expuesta al medio externo del globo ocular (Figura 10). Es la primera superficie de refracción de la luz que ingresa al ojo y protege e hidrata la córnea (Willcox et al, 2017). Además, la película lagrimal colabora en la nutrición de la córnea y permite el aporte de oxígeno y la retirada de sustancias de desecho de la superficie ocular.

El grosor de la película lagrimal varía según las publicaciones, fluctuando entre las 2 y las 5 micras (Werkmeister et al, 2013) (dos Santos et al, 2015).

El modelo de la película lagrimal propuesto por Wolff en los años 40 distinguía tres capas (Figura 11). Una capa mucínica que cubre la superficie ocular y que disminuye la hidrofobicidad de la membrana de las células epiteliales, una capa acuosa que lubrica y aporta nutrientes y oxígeno a la córnea, y una capa lipídica que evita que la lágrima se evapore. En la actualidad se considera este modelo una simplificación de la realidad y se acepta que la película lagrimal se comporta como una única unidad funcional dinámica con diferentes compartimentos: una capa lipídica superficial y una capa mucoacuosa en contacto con la córnea (Figura 12) (Yokoi et al, 2014).



**Figura 10. Esquema de la película lagrimal y superficie ocular.** Cortesía de Allergan Limited.



**Figura 11. Esquema de la película lagrimal: representa la disposición espacial de las tres capas de la película lagrimal.** Cortesía de Allergan Limited.

#### 1.2.4.1 Capa mucoacuosa

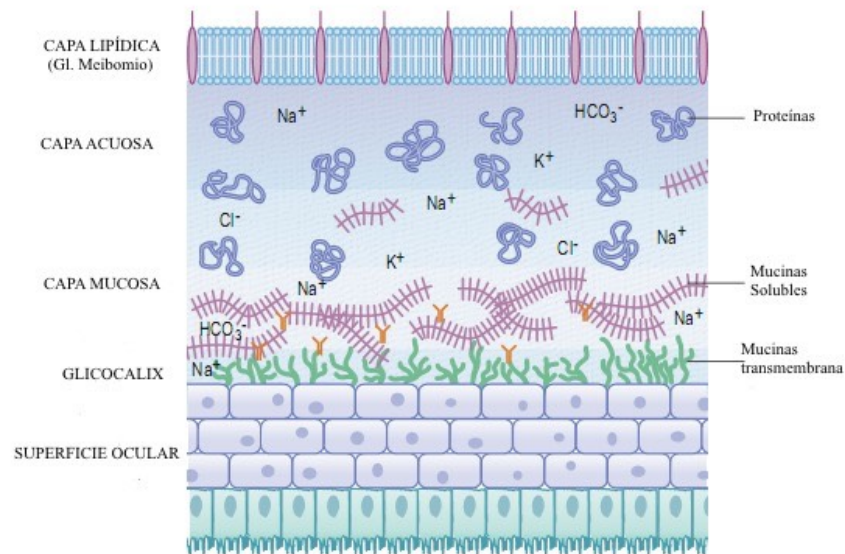
La capa mucoacuosa es la más profunda. Históricamente se dividía en una fase mucínica y una acuosa, pero en la actualidad se considera una sola fase

formada por un gel en donde la concentración de mucinas es más elevada en la porción interna de la misma (Cher, 2008).

La superficie apical de los epitelios de conjuntiva y córnea tienen mucinas transmembrana que convierten la superficie hidrófoba, propia de los fosfolípidos de las membranas celulares, en una superficie hidrófila a la que la lágrima se puede adherir firmemente, permitiendo una adecuada distribución de ésta sobre la superficie ocular. Estas mucinas se extienden hasta 500 nm en el interior de la película lagrimal y también actúan como línea defensiva para las células epiteliales.

La lágrima se produce por la secreción de la glándula lagrimal principal y, en menor medida, por las glándulas accesorias de la conjuntiva. Está compuesta sobre todo por agua, pero también por hidratos de carbono, lípidos, proteínas y electrolitos. La concentración de electrolitos es muy importante, ya que de ella depende la osmolaridad de la lágrima.

La producción de secreción lagrimal se produce fundamentalmente a través de estímulos corneales. El impulso nervioso viaja a través del nervio trigémino, llegando al tronco del encéfalo, que enviará el estímulo que desencadenará la secreción lagrimal a través del nervio facial hacia la glándula lagrimal (Botelho, 1964). Además de esta secreción lagrimal refleja, también tenemos una secreción lagrimal basal, una secreción desencadenada por emociones y la secreción lagrimal que ocurre durante el sueño. (Craig et al, 2013)



**Figura 12. Esquema de la película lagrimal.** Extraído de <https://www.tearfilm.org/mgdreportspanish/report/imgs/figura3.gif>

#### 1.2.4.2 Capa lipídica

La capa lipídica tiene aproximadamente 40 nm de grosor y proviene de la secreción de las glándulas de Meibomio que se encuentran en los márgenes palpebrales. En menor medida, las glándulas de Zeis y de Moll también colaboran en su formación.

La secreción meibomiana se extiende formando la capa lipídica con cada parpadeo. Esta capa reduce la evaporación de la película lagrimal (Knop et al, 2011). Además, proporciona una superficie óptica más homogénea, que mejora la calidad óptica del ojo.

También forma una barrera que evita la salida de lágrima más allá del borde muco-cutáneo así como la entrada de grasa de la piel en el interior de la lágrima.

No está del todo clara la composición completa de la capa lipídica. Si se conoce su arquitectura, una bicapa lipídica con diferente estructura y composición

en ambas capas: moléculas polares que actúan como surfactante, orientando su grupo polar hidrófilo hacia la capa mucoacuosa y facilitando así la propagación de la película lagrimal; y moléculas lipofílicas, de menor polaridad, en la interfaz con el aire que actúan como barrera (Wilcox et al, 2017).

A diferencia de lo que ocurre en la fase mucoacuosa, que parece aislarse después de cada parpadeo, la capa lipídica parece tener continuidad con los meniscos superior e inferior. Esta continuidad y esta extensión de los lípidos sobre la fase mucoacuosa hacen que esta segunda resista al colapso a medida que se va haciendo más fina. (Rosenfeld & Fuller, 2012)

La estimulación de la secreción meibomiana está regulada por estímulos neuronales y hormonales. Las glándulas de Meibomio están rodeadas de un plexo nervioso que contiene nervios sensitivos, simpáticos y parasimpáticos. Pese a conocer con detalle esta inervación, se desconoce el papel que juegan estos nervios en la secreción meibomiana.

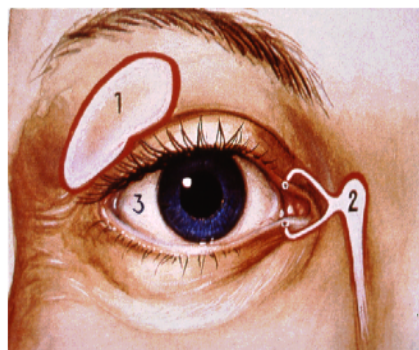
Sí es conocido en cambio cómo las glándulas son sensibles a las hormonas sexuales. Poseen receptores androgénicos y estrogénicos. Los andrógenos suponen un estímulo para la síntesis de lípidos, y se requiere un equilibrio entre la cantidad de andrógenos y estrógenos para que haya una producción adecuada de secreción meibomiana (Sullivan et al, 2000).

### 1.2.5 Párpados

Los párpados protegen el ojo y crean una dinámica lagrimal adecuada. El mecanismo del parpadeo posibilita que la lágrima se distribuya sobre la superficie ocular y que pueda ser eliminada a través de los puntos lagrimales. Otro efecto del parpadeo es la compresión de las glándulas de Meibomio que facilita la liberación de su contenido.

### 1.2.6 Aparato lagrimal

Está formado por las glándulas encargadas de la secreción lagrimal y por el sistema encargado de su eliminación (Figura 13). La secreción acuosa, componente principal de la lágrima, es producida en la glándula lagrimal principal y las accesorias. La glándula lagrimal principal se encuentra en la fosa lagrimal de la órbita. Las glándulas accesorias de Krause y Wolfring están distribuidas por toda la conjuntiva.



**Figura 13. Esquema del aparato lagrimal: 1- glándula lagrimal, 2- vías lagrimales, 3- cuenca lagrimal.**

*Adaptado de Jmarchn, CC BY-SA 3.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>>, via Wikimedia Commons*

### **1.3. Suero autólogo**

El plasma es la fracción acelular de la sangre. El suero es el remanente del plasma una vez se han extraído los factores hemostáticos por la coagulación de la sangre. Por tanto, el suero es el producto que queda al eliminar de la sangre los elementos celulares y las proteínas de la coagulación. Cuando se utiliza en la misma persona de la que fue extraída la sangre, nos referimos a él como autólogo.

Cómo se ha explicado previamente, la lágrima juega un papel vital en la estabilidad y regeneración del epitelio conjuntival y corneal. En los pacientes en los que la producción lagrimal resulta insuficiente, ya sea por deficiencia cuantitativa o cualitativa de la lágrima, ésta debe ser suplementada de forma externa para evitar las complicaciones derivadas de la sequedad ocular.

En el mercado existen gran cantidad de lágrimas artificiales capaces de cubrir el déficit acuoso y, en menor medida, los déficits lipídico y de mucina. El uso del suero autólogo en oftalmología aparece por la necesidad de utilizar sustitutos lagrimales distintos de las lágrimas artificiales y que además de lubricar la superficie ocular, sean capaces de aportar otros componentes presentes en la lágrima y que son deficientes en el caso del ojo seco.

Además del suero autólogo, se han usado otros productos biológicos como el suero de cordón umbilical (Yoon et al, 2006), el suero fetal bovino (Borderie et al, 1999) o el plasma rico en plaquetas (Alio et al, 2012). Rodriguez Calvo-de-Mora et al midió los efectos de los colirios de suero autólogo, suero heterólogo y suero de cordón umbilical en pacientes con ojo seco grave y estudió la concentración de varios factores de crecimiento, encontrando efectividad similar entre los tres sueros y sin encontrar una concentración mayor de moléculas en el suero de cordón frente

al suero autólogo, quizá relacionado con la mayor demora en la preparación del suero de cordón frente al suero autólogo (Rodríguez Calvo-de-Mora et al, 2022).

Tanto el suero de cordón, el suero heterólogo y el suero fetal bovino al no ser sustancias autólogas pueden desencadenar con mayor probabilidad reacciones adversas inmunomediadas, además de tener la posibilidad de transmitir enfermedades infecciosas (Vajpayee et al, 2003).

### **1.3.1 Propiedades del suero autólogo**

Las propiedades del suero autólogo vienen determinadas fundamentalmente por los efectos tróficos de sus componentes sobre el epitelio conjuntival y corneal.

De estos componentes los de mayor importancia son el EGF, el TFG- $\beta$ , el PDGF-AB, la vitamina A, la fibronectina, la albúmina, la  $\alpha$ 2 macroglobulina, la sustancia P y el factor IGF-1.

El EGF tiene efecto sobre la migración de las células epiteliales (Van Setten et al, 1992) y actúa como antiapoptótico (Collins et al, 1994). El EGF está presente en el suero en una concentración mayor que en la lágrima donde aparece tanto en la secreción lagrimal basal como en la refleja (Ohashi et al, 1989), siendo su concentración menor en la lágrima refleja (Alvarado Valero et al, 2004). La concentración de EGF en lágrima basal varía entre 1,9 y 9,7 ng/ml, mientras que en la secreción lagrimal refleja oscila entre 0,7 y 8,1 ng/ml. La concentración de EGF en lágrima es superior a los 0,5 ng/ml encontrados en suero, aunque disminuye significativamente en casos de sequedad ocular.

El EGF fue el primer factor de crecimiento identificado. Es sintetizado como una larga molécula precursora de 207 aminoácidos que posteriormente es procesada por diferentes enzimas proteolíticas. La molécula madura está formada por 53 aminoácidos y tiene un peso molecular de 6,2 kDa. Su estructura es similar a la del factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ), compartiendo ambos factores el mismo receptor (EGFR) (Bell et al. 1986).

El EGF estimula una amplia variedad de tipos celulares. Acelera los procesos de reparación y cicatrización de las heridas, favoreciendo, por un lado, la proliferación y migración de células epiteliales y fibroblastos y, por otro, aumentando la síntesis de proteínas como la fibronectina y activando la expresión de sus receptores (Van Setten et al. 1992, Pastor & Calonge, 1992, Nishida et al. 1997).

Tiene también un efecto quimiotáctico sobre los fibroblastos, estimula la formación de colágeno y matriz extracelular y tiene efectos antiapoptóticos. A nivel corneal favorece la migración de los queratocitos (Andresen et al. 1997), y parece ser el responsable del aumento de la producción de MUC1 por las células caliciformes de la conjuntiva, las cuales expresan receptores para EGF (Tsubota et al. 1999b).

El TGF- $\beta$  pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento. Se conocen cinco isoformas (TGF- $\beta$ 1-5), siendo el TGF- $\beta$ 1 el más importante y mejor caracterizado (Yingling et al. 1995).

Presenta una estructura dimérica de 112 aminoácidos con un peso molecular de 25 kDa. En la córnea se ha detectado TGF- $\beta$ 1 en epitelio, estroma y endotelio

(Wilson et al. 1994), siendo expresados niveles más altos de este factor a nivel epitelial durante los procesos de reparación estromal.

El TGF- $\beta$  tiene un efecto pleiotrópico, actuando de forma diferente, y a veces opuesta, dependiendo del tipo de células sobre las que actúe y del entorno que las rodea. En general se considera un factor inhibidor y regulador de la función de otros factores de crecimiento.

A nivel corneal disminuye la migración de los queratocitos (Andresen et al. 1997), pero favorece la quimiotaxis de fibroblastos así como la producción de matriz extracelular por un mecanismo doble: estimulando la producción de colágeno, fibronectina y proteoglicanos, y disminuyendo su degradación al inhibir la actividad de las metaloproteinasas y otras enzimas proteolíticas (Hosgood, 1993).

En un mecanismo sinérgico con PDGF e integrinas, el TGF- $\beta$  favorece la diferenciación de miofibroblastos y por tanto la contracción de las heridas (Jester & Ho-Chang, 2003, Jester et al. 2002).

Los efectos del TGF- $\beta$  en los procesos de regeneración corneal se consideran en general negativos, si bien este factor juega un importante papel en la cicatrización corneal al regular la acción de otros factores de crecimiento. Por un lado, el TGF- $\beta$  es un inhibidor de la proliferación de células epiteliales y por otro, dado su marcado carácter profibrótico, puede contribuir a una regeneración anómala del estroma corneal con alteración de la distribución de las fibras de colágeno y la consiguiente pérdida de transparencia.

Dado que su concentración en suero es casi tres veces mayor que la encontrada en la lágrima (Geerling et al. 2004), conviene diluir el suero autólogo para su aplicación oftalmológica con el fin de reducir su concentración.

La vitamina A o retinol es una vitamina liposoluble esencial para el organismo. Interviene como catalizador en múltiples reacciones bioquímicas y tiene propiedades antibacterianas y antioxidantes al neutralizar los efectos negativos de los radicales libres.

A nivel ocular, es necesaria para el proceso fisiológico de la visión. Su poder antioxidante ejerce un efecto positivo en la prevención de enfermedades degenerativas como la DMAE, miopía o cataratas.

En la superficie ocular ejerce un notable efecto en la prevención de infecciones, y es esencial para el mantenimiento de la integridad y reparación de los epitelios y mucosas al prevenir los procesos de metaplasia escamosa de los epitelios (Tsubota et al. 1999).

Su déficit origina la xeroftalmia, un cuadro en el que de forma progresiva aparece sequedad ocular, metaplasia de los epitelios corneal y conjuntival, queratinización (manchas de Bitot), pérdida de la transparencia corneal, queratomalacia y ceguera.

La vitamina A es uno de los principales factores epiteliotróficos presentes en el suero autólogo, siendo su concentración casi 100 veces superior a la encontrada en la lágrima (Geerlin et al. 2004, Alvarado Valero et al. 2004).

El PDGF se considera un factor de gran importancia en la regulación del crecimiento y división celular. Se conocen cinco isoformas (AA, BB, CC, DD y AB) con acciones diferentes según el tipo de célula estimulada y que actúan a través de dos receptores tirosina quinasa específicos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Cao et al. 2002, Bergsten et al. 2001).

A nivel de la superficie ocular las isoformas más importantes son la B y AB. El PDGF es un potente factor quimiotáctico para monocitos, macrófagos y fibroblastos, actuando también como un factor regulador y estimulador de la migración de células mesenquimales (Nedeau et al. 2008, Xaymardan et al. 2004).

A nivel de la superficie ocular, las células epiteliales son capaces de modular el reclutamiento de fibroblastos y su conducta durante la cicatrización en un proceso mediado por PDGF-AB y las interleuquinas  $1\beta$  y  $1\alpha$ , regulando la homeostasis y remodelación del estroma corneal tras agresiones por una interacción paracrina unidireccional desde el epitelio corneal hacia el estroma (Daniels y Khaw, 2000, Kim et al. 1999).

Después de una lesión corneal, los queratocitos adyacentes a la zona afectada mueren por apoptosis y sólo cuando la lesión es cubierta de nuevo por el epitelio, incluso por una única capa de células con la recuperación del efecto barrera, los fibroblastos regresan a la zona de la lesión.

En el suero autólogo se identifican al menos tres factores neuronales: el Factor de Crecimiento tipo Insulina (IGF-1), la Sustancia P y el Factor de Crecimiento Neuronal (NGF).

A nivel de la superficie ocular, el IGF-1 estimula la migración y proliferación del epitelio corneal en un mecanismo sinérgico dosis dependiente con la Sustancia P que favorece la migración celular (Nishida et al. 1996), presentando también efectos sobre la proliferación celular, sin alterar el fenotipo de los queratocitos, y efectos quimiotácticos para fibroblastos, jugando un importante papel en la regulación de la acción de otros factores (Assouline et al. 1992).

La sustancia P es un péptido neuroactivo y a nivel ocular estimula la migración del epitelio corneal en un mecanismo sinérgico con el IGF-1.

Por último, el NGF induce en las neuronas el crecimiento y la ramificación axonal (Madduri et al. 2009), tiene efectos antiapoptóticos e induce la producción de sustancia P y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina que favorecen la proliferación del epitelio corneal.

En la superficie ocular, la fibronectina es uno de los factores más importantes en la fase de migración celular durante la reparación del epitelio corneal tras lesiones (Nishida et al, 1983) (Phan et al. 1991). Su concentración en suero es casi 10 veces superior a la encontrada en la lágrima (Geerling et al. 2004).

La albúmina actúa como vehículo de la mayoría de sustancias apolares insolubles en un medio polar como el de la fase acuosa de la lágrima. Gracias a estas sustancias transportadas (corticosteroides, hormonas y ácidos grasos libres) favorece la cicatrización, disminuyendo la degradación de citoquinas y factores de crecimiento en las zonas de lesión tisular. Tiene también actividad antiapoptótica (Shimmura et al. 2003).

La  $\alpha$ 2 macroglobulina presenta actividad anticlagenasa (Poon et al. 2001).

Las inmunoglobulinas, lisozima y complemento presentes en el suero autólogo le aportan un marcado efecto anti-infecciones. La lisozima es particularmente útil frente a Gram +, mientras que el complemento lo es frente a Gram -.

En la tabla 1 se muestra una relación comparada de la concentración de los principales factores epiteliotróficos presentes en la lágrima y en el suero autólogo, mientras que la tabla 2 muestra las principales acciones de las sustancias presentes en el suero autólogo a nivel de la superficie ocular.

	Lágrima	Suero autólogo
EGF (ng/ml)	0,2 - 3,0	0,5
TGF- $\beta$ (ng/ml)	2 - 10	6 - 33
Vitamina A (mg/ml)	0,02	46
Lisocima (mg/ml)	1,4	6
Fibronectina ( $\mu$ g/ml)	21	205

**Tabla 1. Concentraciones comparadas entre lágrima y suero autólogo de los principales factores epiteliotróficos**

Sustancias	Acciones a nivel de la superficie ocular
EGF	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Favorece la proliferación, migración y diferenciación de células epiteliales y fibroblastos.</li> <li>-Aumenta la síntesis de fibronectina</li> <li>-Efecto antiapoptótico.</li> <li>-Aumenta la producción de mucina 1.</li> </ul>
TGF- $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Efecto regulador sobre otros factores de crecimiento</li> <li>-Inhibe la proliferación celular.</li> <li>-Favorece la migración de fibroblastos y su diferenciación a miofibroblastos. Efecto quimiotáctico de PMN, macrófagos, etc.</li> <li>-Favorece la formación de matriz extracelular (importante efecto fibrogénico) y neovascularización. Inhibe las metaloproteinasas.</li> <li>-Efecto antiinflamatorio.</li> </ul>
Vitamina A	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Propiedades antibacterianas y antioxidantes</li> <li>-Mantenimiento y reparación de las células epiteliales corneales y conjuntivales.</li> <li>-Prevención de la metaplasia escamosa.</li> </ul>

PDGF	-Regulación de las interacciones entre células epiteliales y estroma durante los procesos de cicatrización. -Regulador de la expresión y acción de otros factores de crecimiento. -Favorece la migración y diferenciación de fibroblastos así como el depósito de matriz extracelular. Efecto angiogénico y quimiotáctico.
Fibronectina	-Favorece la migración celular en los procesos de reparación corneal.
Albúmina	-Efectos antiapoptóticos. -Protege la degradación de citoquinas y FC.
$\alpha$ -2 macroglobulina	-Efecto anticolagenasa
FGF	-Favorece la proliferación de la mayoría de las células implicadas en la reparación tisular. Efecto quimiotáctico sobre fibroblastos. -Favorece la síntesis y contracción de la matriz extracelular. -Favorece la migración de los queratocitos
IGF-1	-Regula la acción de otros FC. -Estimula la proliferación y migración del epitelio corneal. -Aumenta la expresión de integrinas. -Efecto antiapoptótico. -Efecto quimiotáctico para fibroblastos.
Sustancia P	-Favorece la migración y proliferación del epitelio corneal y queratocitos
NGF	-Favorece la proliferación y diferenciación de células epiteliales. -Favorece el crecimiento de los fibroblastos y la regeneración y crecimiento neuronal. Induce neovascularización corneal.
Inmunoglobulinas	-Efecto antimicrobiano.
Lisozima	-Efecto antimicrobiano
Complemento	-Efecto antimicrobiano

**Tabla 2. Principales acciones de las sustancias presentes en el suero autólogo a nivel de la superficie ocular.**

*(EGF) Factor de crecimiento epitelial. (TGF- $\beta$ ) Factor de crecimiento transformante  $\beta$  de fibroblastos. (FC) Factor de crecimiento. (PDGF) Factor de crecimiento derivado de plaquetas. (FGF) Factor de crecimiento de fibroblastos. (IGF-1) Factor de crecimiento tipo insulina. (NGF) Factor de crecimiento neuronal.*

Todos estos componentes confieren al suero autólogo un efecto trófico y bactericida, lo que unido a un pH y osmolaridad muy similares al de la lágrima natural, ha justificado que muchos autores afirmen que la aplicación de la terapia

con suero autólogo supera ampliamente a la terapia sustitutiva con lágrimas artificiales. Sin embargo, otros trabajos no han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento convencional y la terapia con suero autólogo (Noble et al, 2004). Un reciente metaanálisis (Wang et al, 2019), confirma los beneficios de la terapia con suero autólogo en relación con el tratamiento convencional con lágrimas artificiales en los test sintomáticos de ojo seco, en el tiempo de rotura de la lágrima y en las pruebas de tinción de la superficie ocular, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en otros de los parámetros estudiados.

En cuanto a los estudios in vitro, se ha objetivado la superioridad del suero autólogo frente a lágrimas artificiales en la preservación de la integridad de las membranas celulares y los niveles de ATP intracelular (Poon et al, 2001). También se ha demostrado un mayor efecto del suero autólogo en comparación con lágrimas artificiales sobre la proliferación celular (Geerling et al, 2001) y sobre el incremento de la transcripción de RNA para el Factor de Crecimiento Neuronal y para los receptores del TFG- $\beta$  (You et al, 2001).

Con todo, y dada la gran variabilidad existente en la bibliografía relativa al tipo de población estudiada, metodología de preparación, dispensación y almacenaje del suero autólogo, la mayoría de las publicaciones coinciden en la necesidad de realizar estudios unificados, prospectivos, randomizados y multicéntricos para poder evidenciar los efectos diferenciales de esta terapia en relación al tratamiento sustitutivo con lágrimas artificiales.

### 1.3.1.1 Preparación, dispensación y posología del suero autólogo.

Al tratarse de un producto para uso individual, el colirio de suero autólogo no se considera un producto farmacéutico sino una fórmula magistral. Revisando la bibliografía, existe una gran variabilidad en la metodología de preparación, almacenaje y dispensación del colirio de suero autólogo. En la tabla 3 se muestran las variaciones encontradas en la literatura referentes a las distintas fases de la preparación y aplicación del suero autólogo, mientras que en la tabla 4 se muestran, de forma resumida, las diferencias en la elaboración y dispensación del suero autólogo en diferentes publicaciones (Geerling et al. 2004).

Fase de elaboración	Variaciones en artículos publicados
Fase de coagulación	0–2 días
Fuerza de centrifugación	1500 -5000 rpm (300-4000 g)
Tiempo de centrifugación	5–20 minutos
Dilución	20%, 33%, 50%, o 100%
Diluyente	0.9% SF, BSS, 0.5%.
Antibióticos	Colirio de cloranfenicol
Envases	1–10 ml en jeringas de insulina o envases adaptados para uso oftálmico
Almacenamiento	–20° a +4° C
Posología	1 gota/hora a 1 gota /8 horas

(rpm) revoluciones por minuto. (g) Fuerza “g” de centrifugación. (SF) Suero Fisiológico. (BSS) Solución Salina Balanceada.

**Tabla 3: Variaciones en las distintas fases de elaboración, dispensación y almacenaje del suero autólogo. (Adaptado de Geerling et al. 2004).**

La posología varía también según los distintos autores desde la aplicación horaria hasta su aplicación tres veces al día. En nuestro caso, recomendamos instilaciones cada 3 horas y utilizamos el mismo frasco durante una semana. La correcta utilización del preparado hace que disminuya considerablemente el riesgo de contaminación. La contaminación del suero autólogo puede producirse durante cualquier momento de su preparación, pero lo más común es que ésta se produzca por mala manipulación del paciente, de ahí que frecuentemente estas muestras se contaminen sobre todo con *S. Epidermidis* (Sauer et al. 2004). Sin embargo, a pesar de la contaminación de los envases, la aparición de complicaciones infecciosas en estos pacientes es excepcional.

Autor	Año publicación	Concentración	Centrifugación	Tiempo de coagulación	Frecuencia de instilación.
Fox	1984	33%	500g/10	-	2 h
Tsubota	1999	20%	1500rpm/5	-	6-10 h
Rocha	2000	33%	500g/10	-	1 h
Poon	2001	50-100%	4000rpm/10	2 h	3 h
Tananuvat	2001	20%	4200rpm/15	-	4 h
Takamura	2002	20%	3000rpm/10	-	3-6 h
Ogawa	2003	20%	3000rpm/5	-	2 h
De souza	2001	100%	-	-	1 h
García	2003	20%	5000rpm/10	-	2 h
D. Castillo	2002	20%	1500rpm/5	-	8 h
Goto	2001	20%	1500rpm/5	-	2h

Etchaberry	2007	20%	1500 rpm/8	-	-
Solórzano	2008	20%	3000 rpm/10	-	-
López García	2007/8	20%	3000 rpm/10	2 h	4 h

*(rpm) revoluciones por minuto. (g) Fuerza “g” de centrifugación. (-) dato no referido en el artículo.*

**Tabla 4. Diferencias en cuanto a metodología de elaboración y dispensación del suero autólogo en diferentes publicaciones. (Adaptado de Geerling et al 2004).**

#### 1.3.1.2 Suero autólogo: Riesgos específicos, efectos adversos y contraindicaciones.

Las principales desventajas de la utilización del suero autólogo se derivan de su condición de fluido corporal y de la necesidad de una preparación individualizada por tratarse de un producto autólogo. Estas características suponen un riesgo añadido en dos cuestiones como son el riesgo de transmisión de enfermedades a terceras personas al preparar el suero, que es excepcional (Eberle et al. 2000), la autoinmunidad y la posible contaminación del colirio. La mala manipulación y/o el tiempo de utilización de los envases son los principales factores implicados en la contaminación microbiológica de las muestras.

La terapia con suero autólogo es, en general, muy bien tolerada por los pacientes, siendo excepcional la aparición de complicaciones secundarias a la utilización de estos preparados, incluso durante largos periodos de tratamiento (López-García et al. 2007). Su condición de producto autólogo elimina el riesgo de

transmisión de enfermedades y reacciones alérgicas en los pacientes que reciben este tratamiento. En algunos casos puede aparecer una leve irritación ocular con disconfort en forma de quemazón, lagrimeo y visión borrosa que, generalmente, desaparece en unos minutos y rara vez obliga a suspender el tratamiento.

Aparte de los pacientes con enfermedades infecciosas susceptibles de transmisión parenteral, existen muy pocas contraindicaciones para este tipo de terapia. En embarazo y lactancia, el uso de estos preparados no está contraindicado, aunque es preferible utilizar otras alternativas terapéuticas que no requieran extracciones de sangre.

El suero autólogo no debe utilizarse en la fase aguda de infecciones oculares, sobre todo aquellas que afectan de forma importante al espesor corneal. En estos casos, el enfoque terapéutico inicial ha de ir encaminado al tratamiento de la infección. En fases posteriores, la utilización de estos preparados puede ser muy útil potenciando los fenómenos de regeneración y cicatrización secundarios.

### **1.3.2 Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología**

La terapia con suero autólogo ha sido empleada con mayor o menor éxito en las siguientes patologías:

#### 1.3.2.1 Defectos epiteliales persistentes:

Se trata de un defecto epitelial mayor de 2 mm, que lleva al menos 2 semanas sin responder al tratamiento habitual (Figura 14).

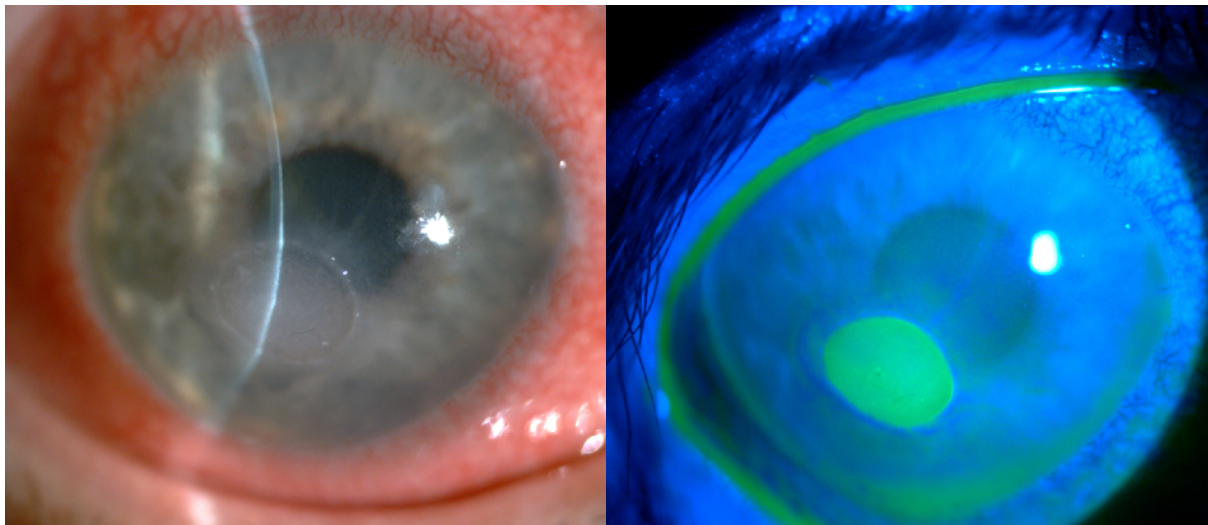
Entre los cuadros que pueden desencadenar un defecto epitelial persistente podemos encontrar causas muy variadas como distrofias corneales, insuficiencia limbar, queratitis infecciosas, patología neurotrófica, secundarios a cirugía refractiva o al uso de fármacos tóxicos para el epitelio corneal entre otras muchas. Todos estos casos tienen en común la existencia de un defecto epitelial y la incapacidad para cerrar este defecto. Entre los tratamientos empleados para cerrar estos defectos epiteliales persistentes se incluyen terapia con lágrimas artificiales, lentes de contacto terapéuticas, tarsorrafia, trasplante de membrana amniótica, toxina botulínica, trasplante de limbo, colirio de insulina, fibronectina tópica, tetraciclinas o células epiteliales cultivadas.

En estos pacientes se ha comprobado como la terapia con suero autólogo contribuye a una curación más precoz de los defectos epiteliales persistentes. En el estudio de Poon et al (2001), el 63 % de los defectos epiteliales persistentes cerraron en menos de un mes frente a los 7,2 meses de media que tardaron en curar los tratados con terapia convencional.

Otra opción interesante para el cierre de los defectos epiteliales persistentes es el uso combinado de colirio de suero autólogo con la colocación de una lente de contacto terapéutica (Schrader et al, 2006).

Habitualmente se usa colirio de suero autólogo a una concentración del 20%, aunque otras concentraciones pueden ser usadas. Los resultados del tratamiento con suero autólogo son generalmente buenos, aunque no todos los pacientes responden y la velocidad de cierre es variable, siendo de pocos días en algunos de los pacientes y llegando a tardar varios meses en los casos más resistentes (Ferreira de Souza et al, 2001). La posología puede variar en función de la patología de base que ha originado el defecto epitelial y de las propias características de

éste, generalmente las instilaciones deben ser frecuentes al principio, aplicándose cada hora o dos horas y disminuyendo progresivamente a medida que el defecto epitelial va cerrando, hasta retirarlo cuando la reepitelización es completa y la patología que ha originado el defecto se encuentra controlada.



**Figura 14. Defecto epitelial persistente.**

#### 1.3.2.2 Ojo seco grave

Ésta fue la primera aplicación del suero autólogo en oftalmología (Fox et al, 1984). El suero autólogo, además de aportar nutrientes, disminuye la apoptosis y aumenta la expresión de mucina 1, ambos alterados en el ojo seco (Kojima et al, 2008).

La mayoría de autores reportan una mejoría en el ojo seco grave tras las primeras 48 horas de uso del tratamiento y un empeoramiento paulatino al suspender el tratamiento. Diversos autores (Tsubota et al, 1999a) (Poon et al, 2001), reportan una mejoría rápida de los síntomas y de las tinciones con rosa de bengala, fluoresceína y test de Schirmer, y un empeoramiento progresivo de éstos unas 4

semanas después de suspender la aplicación del suero. En casos de ojo seco se ha especulado con la posibilidad de que los efectos sean dosis dependientes, así se han encontrado más beneficios en pautas de dosificación que aplicaban gotas 8 veces al día frente a 4 veces al día. En un estudio realizado por nuestro grupo en pacientes con ojo seco de diversa gravedad, hemos encontrado como la aplicación de suero autólogo mejoró una media de 3 mm el test de Schirmer y de 4 segundos el BUT. De igual forma mejoró la tinción con fluoresceína y rosa de Bengala, así como la estabilidad de la película lagrimal.

### 1.3.2.2.1 Síndrome de ojo seco secundario a síndrome de Sjögren.

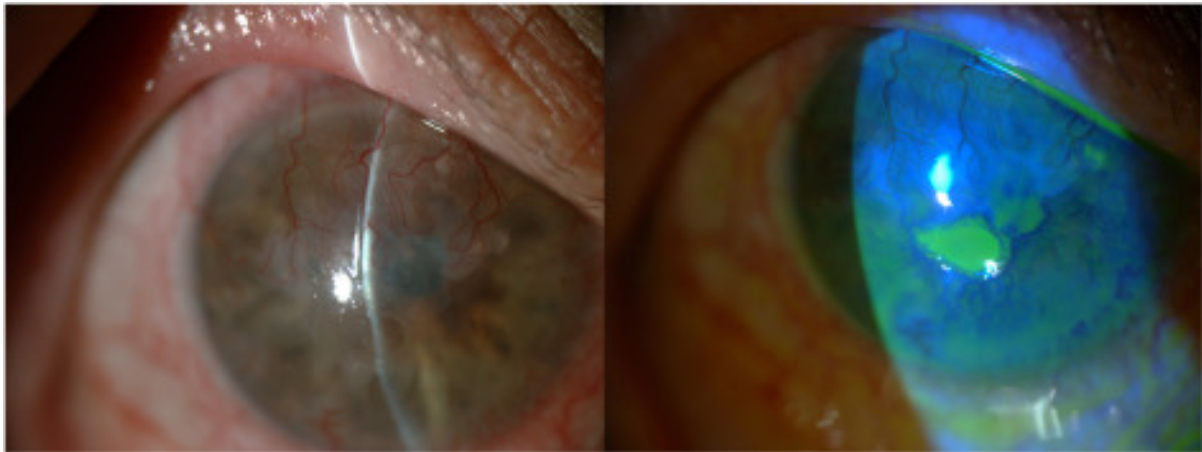
El síndrome de Sjögren primario es una enfermedad crónica de origen autoinmune que afecta a las glándulas exocrinas. Afecta fundamentalmente a las glándulas lagrimales y salivares, dando lugar a un cuadro caracterizado por xeroftalmia y xerostomía. También puede aparecer como síndrome de Sjögren secundario, asociado a otros trastornos autoinmunes sistémicos como lupus, enfermedades inflamatorias intestinales o artritis reumatoide. Muestra una mayor incidencia entre mujeres entre los 40 y 60 años. El síndrome de ojo seco asociado a síndrome de Sjögren se caracteriza por una hiposecreción y alteración de la composición lagrimal debido a la infiltración inflamatoria de la glándula lagrimal. Este entorno proinflamatorio mantenido hace que el ojo seco asociado a síndrome de Sjögren sea de los más persistentes y difíciles de tratar. La ausencia de factores tróficos corneales por el gran déficit de lágrima puede ser suplida con el tratamiento con suero autólogo (Tsubota et al, 1999a).

### 1.3.2.3 Úlcera neurotrófica

La queratopatía neurotrófica es una patología degenerativa corneal caracterizada por la disminución en la sensibilidad de la superficie corneal y alteraciones en la cicatrización (Figura 15). Las causas más frecuentes de esta disminución de la sensibilidad son las infecciones por virus herpes simple y zoster y las secuelas tras causticaciones, traumatismos o intervenciones quirúrgicas o daño neuropático producido por la diabetes (Cavanagh et al, 1989).

La pérdida de sensibilidad corneal que presentan estos pacientes supone no sólo que exista una deficiencia en el parpadeo y el lagrimeo reflejo, sino también que deje de existir la influencia trófica de la innervación sobre el epitelio corneal, que juega un papel fundamental en la regeneración epitelial y se desarrolla través de mediadores químicos como la acetilcolina o la sustancia P. Esto produce una disminución del metabolismo y mitosis celular, así como un aumento de la permeabilidad del epitelio a factores nocivos. Ya sea como terapia única (Matsumoto et al, 2004), o formando parte de una terapia combinada que incluye cianoacrilato, tetraciclina sistémica y una tarsorrafia temporal (Diaz-Valle et al, 2003), el suero autólogo contribuye al control de la progresión de la úlcera neurotrófica y a la regeneración de la superficie corneal.

El pronóstico de la queratopatía neurotrófica depende de diferentes factores como la profundidad de la lesión, el grado de hipoestesia y la causa de la pérdida de sensibilidad corneal (el virus varicela zóster produce las queratopatías más graves). Es importante un correcto seguimiento de estos pacientes debido a que por su hipoestesia corneal la enfermedad puede cursar sin apenas síntomas, lo que puede provocar que cuando estos pacientes acudan a recibir atención oftalmológica, muchas veces el pronóstico de sus úlceras sea malo.



**Figura 15. Úlcera neurotrófica**

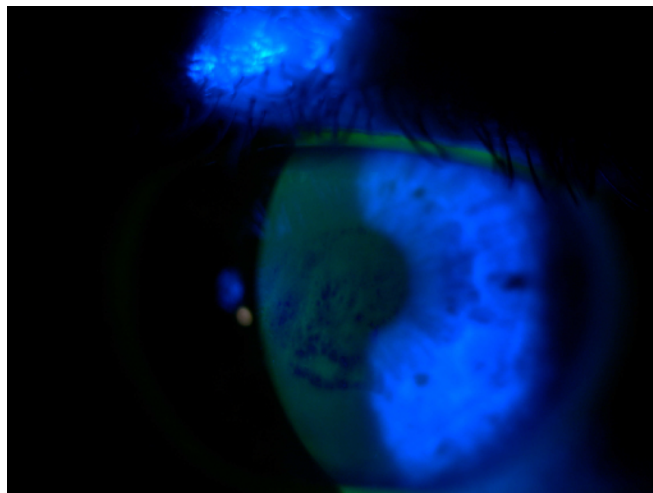
#### 1.3.2.4 Erosión corneal recurrente

Este síndrome, caracterizado por una inadecuada unión entre el epitelio corneal y la membrana basal, cursa con repetidos episodios agudos de dolor, visión borrosa e irritación ocular al romperse de forma espontánea el epitelio corneal (Figura 16). Estos síntomas se producen con más frecuencia al despertar por la mañana, produciéndose una desepitelización de las áreas débilmente adheridas al abrir los ojos. Las erosiones corneales recurrentes pueden ser de presentación espontánea (habitualmente en pacientes con alguna distrofia corneal) o aparecer tras un evento desencadenante como un traumatismo.

El tratamiento inicial de las erosiones corneales recurrentes consiste en medidas de lubricación, aplicación de colirios de antibióticos y oclusión ocular. El uso de colirios y pomadas hipertónicos permiten eliminar el edema del epitelio irregular. Cuando estas medidas no son eficaces se puede optar por tratamiento quirúrgico: punciones en el estroma anterior, desepitelización mecánica, con alcohol o la queratectomía fototerapéutica o PTK.

Se ha visto como con el tratamiento con suero autólogo disminuye el número de recurrencias en estos pacientes. (Benítez del Castillo et al, 2002). De igual forma, la terapia con suero se puede usar de forma aislada o en combinación con otras técnicas para mejorar aún más sus resultados (Holzer et al, 2005).

En un trabajo de nuestro grupo, hemos encontrado como la tasa de recurrencia de las erosiones corneales disminuyó en un 87,5% en los pacientes tratados con suero autólogo en relación a estos mismos pacientes cuando fueron tratados con terapia convencional con lágrimas artificiales.



**Figura 16. Defecto en la adherencia entre el epitelio corneal y la membrana basal que puede dar lugar a una erosión corneal recurrente.**

#### 1.3.2.5 Insuficiencia Limbar

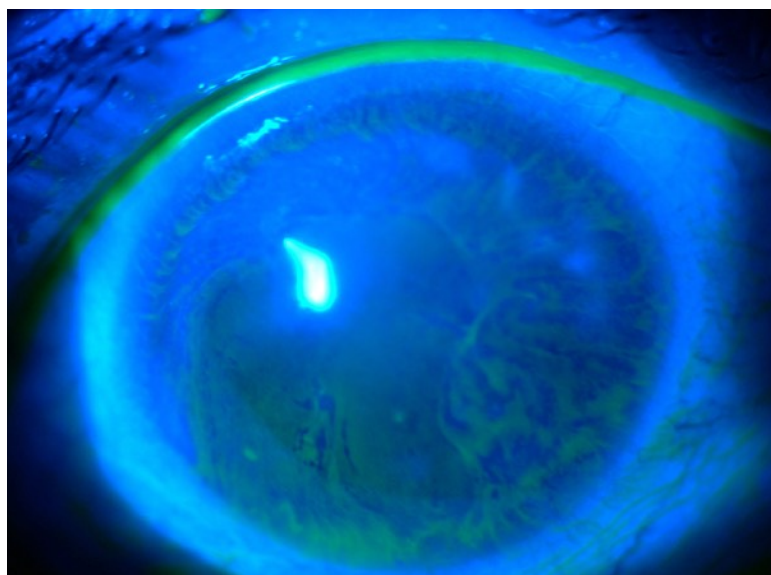
La insuficiencia limbar se produce por diversas causas, entre ellas las causticaciones, el uso inadecuado de lentes de contacto o las enfermedades mucosinequiantes.

La afectación característica es la conjuntivalización de la córnea, que asocia pannus fibrovascular y en muchas ocasiones defectos epiteliales de difícil curación (figura 17).

En los casos graves en los que hay afectación del eje visual, el tratamiento de la insuficiencia limbar es quirúrgico y consiste en una epiteliectomía conjuntival sectorial secuencial, en la que se retira el epitelio anómalo y el pannus para que se produzca una reepitelización a expensas del tejido limbar sano.

En los casos en los que no hay tejido limbar sano, se debe realizar un trasplante de células limbares a partir del otro ojo del paciente (autotrasplante conjuntivo-limbar -CLAU-) o, si no fuese posible, a partir de células de un donante vivo histocompatible (trasplante limbar de donante vivo relacionado -lrCLAL-) o de donante cadáver (alotrasplante queratolimbar -KLAL-).

Tras la cirugía se produce un gran defecto epitelial cuya recuperación suele ser lenta. En estos casos puede ser de gran utilidad la terapia con suero autólogo en vez de con lágrimas artificiales convencionales (Watson et al, 2008)



**Figura 17. Insuficiencia limbar.**

### 1.3.2.6 Defectos epiteliales tras cirugías

Las cirugías que realizamos en mayor o menor medida se pueden considerar agresivas para la superficie ocular por lo que toda la patología de la superficie ocular se ve agravada tras una cirugía. El suero autólogo puede ser de utilidad en los casos en los que se desencadene una epiteliopatía importante. Entre las cirugías que más frecuentemente producen defectos epiteliales significativos encontramos las siguientes:

- Queratoplastia: el epitelio de la córnea donante normalmente es inviable y se pierde en el postoperatorio temprano. Una rápida reepitelización evita la aparición de complicaciones como infecciones, formación de leucomas y rechazo del injerto. Los defectos epiteliales persistentes tras queratoplastia son una de las complicaciones más frecuentes y aparecen en un 4,2% de las queratoplastias penetrantes. Ming et al (2010), estudiaron el efecto del colirio de suero autólogo en estos pacientes y comprobaron que reduce el tiempo de reepitelización. Estos autores consideran la diabetes como un factor fundamental en el retraso de la epitelización corneal.

- Cirugía Vitreorretiniana: los defectos epiteliales secundarios a cirugía vitreorretiniana pueden aparecer de forma precoz o tardía. Entre los precoces encontramos los que están producidos de forma intencionada para mejorar la visualización en pacientes con córneas edematizadas y los que aparecen de forma secundaria a los cambios intraquirúrgicos de presión ocular que provocan fragilidad epitelial. Los defectos epiteliales tardíos pueden estar relacionados con la hipoestesia corneal tras la colocación de un cerclaje o con cambios en la superficie corneal relacionados con los explantes. Hay que tener en cuenta que muchos de los pacientes que necesitan cirugía vitreorretiniana pueden tener

también problemas de base de la superficie ocular. La terapia con suero autólogo se ha usado con éxito en el tratamiento de estos defectos epiteliales (Huang et al, 2008).

- Catarata: al realizar las incisiones necesarias para la facoemulsificación se produce una lesión de las fibras nerviosas corneales, fundamentales para la producción de lágrima, y que explican la frecuencia de los síntomas de ojo seco en el postoperatorio de la cirugía de cataratas. Habitualmente estos síntomas son más intensos en los pacientes con un síndrome de ojo seco previo u otra patología de la superficie ocular ya diagnosticado antes de la cirugía. En estos pacientes el tratamiento con suero autólogo antes o después de la cirugía puede estar indicado.

- Cirugía refractiva corneal: Los síntomas y signos de sequedad ocular tras una cirugía LASIK suelen durar aproximadamente 1 mes. Un pequeño porcentaje de pacientes continúa refiriendo síntomas de ojo seco más de un año después de la operación. Se ha propuesto que con la creación y manipulación del flap se puede producir una pérdida de ramas del plexo nervioso subepitelial que induce una hipoestesia corneal y una menor frecuencia de parpadeo (Benitez del Castillo et al, 2001) (Toda, 2018). Es de especial importancia realizar un adecuado estudio de la superficie ocular y de la producción lagrimal en la consulta preoperatoria de cirugía refractiva con el fin de detectar los casos de ojo seco moderados y graves que se pueden ver agravados con un LASIK y, que por ello, deben ser considerados una contraindicación para la realización de esta técnica (Llovet et al, 2017). La terapia con suero autólogo ha demostrado su eficacia en el tratamiento de defectos epiteliales post-LASIK en comparación con la terapia con lágrimas artificiales (Noda-Tsuruya et al, 2006).

En la queratectomía fotorrefractiva o PRK el epitelio corneal se regenera sobre la superficie de la córnea ablacionada, habitualmente de forma rápida y predecible. Por ello se puede considerar la PRK una técnica más conservadora que el LASIK en los pacientes que quieran corregir su defecto refractivo y presenten cierto grado de sequedad ocular (Llovet et al, 2017). Aún así, un tratamiento adecuado de la superficie ocular, de forma preoperatoria y postoperatoria, incluyendo la terapia con suero autólogo (Ilhan, 2016), puede contribuir a acelerar la reepitelización corneal y disminuir las complicaciones y las molestias del paciente.

### 1.3.2.7 Cirugías de reconstrucción de la superficie ocular

Se ha usado como terapia adyuvante a distintas técnicas de reconstrucción de la superficie ocular como trasplante de limbo, trasplante de membrana amniótica, queratoplastia penetrante o queratoprótesis en pacientes con síndrome de Stevens-Johnson o penfigoide ocular (Tsubota et al, 1996).

### 1.3.2.8 Enfermedad injerto contra huésped

La enfermedad injerto contra huésped es una de las mayores causas de morbimortalidad tras un trasplante de progenitores hematopoyéticos usado para el tratamiento de diversas enfermedades hematológicas (Anderson & Regillo, 2004).

El desarrollo de patología ocular proviene fundamentalmente de la fibrosis de las glándulas lagrimales secundaria a la infiltración inflamatoria que origina un ojo seco de difícil manejo. Las secuelas oculares son las complicaciones tardías más frecuentes y producen un marcado deterioro de la calidad de vida de los pacientes al poder cursar con sensación de cuerpo extraño persistente, disminución de visión y en los casos más graves, complicaciones que pueden conducir a la ceguera.

El suero autólogo puede jugar un papel fundamental en el equilibrio del entorno inflamatorio que caracteriza a esta enfermedad gracias a que aporta los factores tróficos, antiapoptóticos y antimicrobianos que la glándula fibrosada está dejando de aportar (Ogawa et al, 2003). Su uso en combinación con terapia inmunomoduladora (Rao et al, 2006), contribuye al control de la respuesta inflamatoria, base fisiopatológica de la enfermedad. Se debe recordar que esta respuesta inflamatoria no sólo se genera a nivel ocular, por lo que el abordaje de estos enfermos debe ser multidisciplinar.

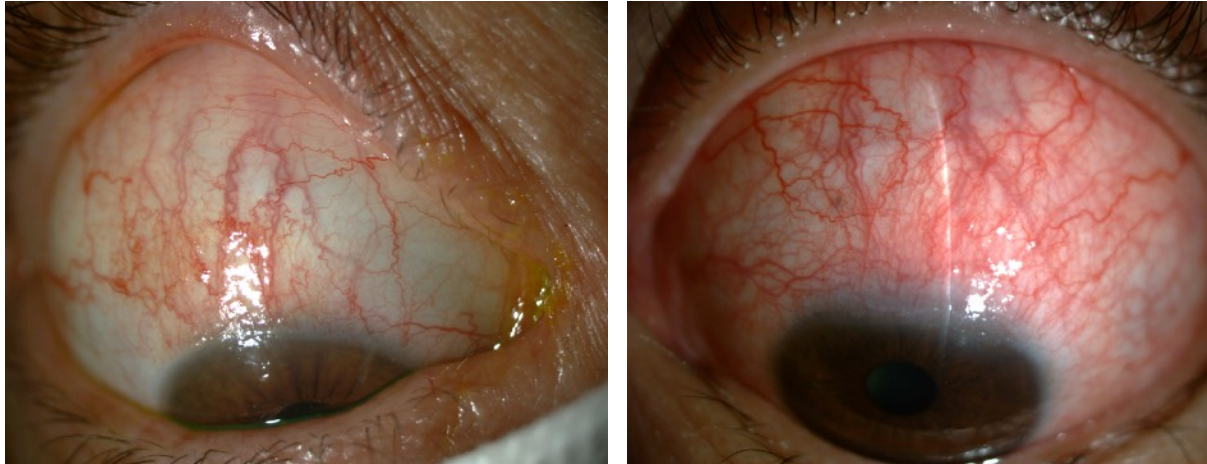
Además de la inflamación linfoplasmocitaria y fibrosis de la glándula lagrimal, se debe tener en cuenta que los diferentes quimioterápicos y la radioterapia con la que muchos de estos pacientes están tratados contribuyen a la génesis de su ojo seco.

Un tratamiento precoz con suero autólogo e inmunomoduladores tópicos deben ser la norma para evitar actuar cuando el daño celular se ha instaurado y la fibrosis se ha comenzado a producir.

### 1.3.2.9 Queratoconjuntivitis límbica superior

La queratoconjuntivitis límbica superior es una entidad poco habitual caracterizada por unos signos clínicos sutiles: leve epiteliopatía en el área limbo-corneal superior que causa un gran discomfort ocular (Corwin, 1968) (figura 18). Se cree que está causada por la fricción producida por el párpado superior sobre esa zona de la córnea, que originaría una falta de recubrimiento lagrimal localizada a ese nivel. También se ha relacionado con enfermedades autoinmunes, infecciones virales o enrojecimiento ocular crónico. El tratamiento habitual consiste en la instilación de lágrimas artificiales, corticoides locales y la oclusión del conducto

lagrimal superior. En los casos que no responden al tratamiento tradicional se puede emplear la terapia con suero autólogo (Goto et al, 2001)



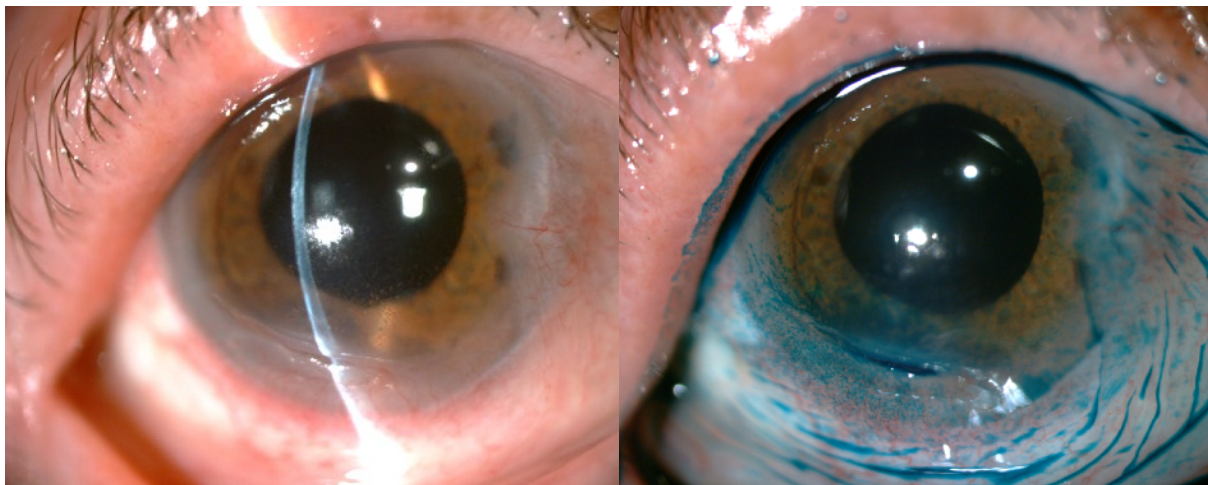
**Figura 18. Queratoconjuntivitis límbica superior.**

#### 1.3.2.10 Úlcera de Mooren

La úlcera de Mooren es una queratitis ulcerativa crónica poco frecuente, que se caracteriza por comenzar en la periferia y por avanzar de manera circunferencial. Origina un importante adelgazamiento corneal que puede acabar en perforación ocular hasta en un 36% de los casos. Aparece de forma idiopática y se cree que puede ser desencadenada por procesos autoinmunes. Los pacientes refieren un característico dolor incapacitante, fotofobia y enrojecimiento ocular. Puede ser tanto unilateral como bilateral y las recurrencias son comunes. Se han intentado diversos tratamientos con bastante poco éxito. Las propiedades epitelizantes y antiinflamatorias del suero autólogo pueden jugar un papel importante en esta patología (Mavrakanas et al, 2007).

#### 1.3.2.11 Queratitis ulcerativa periférica

La queratitis ulcerativa periférica se presenta como una lesión destructiva en forma de media luna del estroma corneal yuxtalímbico (figura 19). La lesión se caracteriza por degradación del estroma y células inflamatorias con un defecto epitelial suprayacente. Se asocia con diversos trastornos autoinmunes como artritis reumatoide, poliarteritis nodosa o enfermedades inflamatorias intestinales. La ulceración se produce por la inadecuada activación del sistema inmune que induce la liberación de colagenasas y proteasas que destruyen el estroma corneal. El suero autólogo puede ser empleado como terapia adyuvante, parece promover un sobrecrecimiento conjuntival sobre la úlcera que evite la perforación ocular (Preciado & Arellanes-García, 2006)



**Figura 19. Queratitis ulcerativa periférica.**

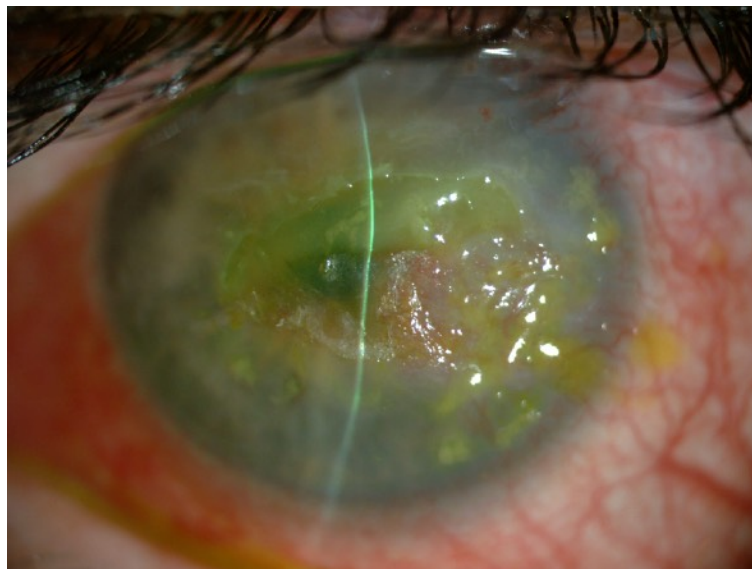
#### 1.3.2.12 Queratopatía por exposición

La queratopatía por exposición se produce de forma secundaria a un inadecuado cierre palpebral que genera una insuficiente lubricación de la superficie ocular por la pérdida del mecanismo del parpadeo.

Las causas de este deficiente cierre palpebral son muy variadas. Como ejemplos podemos encontrar: enfermedades palpebrales cicatriciales, enfermedades inflamatorias de la órbita, parálisis del VII par craneal, alteraciones neurológicas degenerativas como Enfermedad de Parkinson, causas iatrogénicas (tras blefaroplastia) o exposición durante el sueño.

En estos pacientes se suele encontrar una queratitis punteada que habitualmente afecta al tercio inferior de la córnea, si bien en los casos más graves puede afectarse toda la superficie corneal, presentando defectos epiteliales confluentes que pueden generar adelgazamiento corneal con riesgo de perforación ocular (figura 20).

La terapia con suero autólogo es una herramienta más dentro del arsenal terapéutico para abordar la queratopatía por exposición, especialmente en los casos más graves (von Hofsten et al, 2016).



**Figura 20. Queratitis por exposición.**

También se ha usado, con mayor o menor éxito, en pacientes tras la cirugía de pterigion (Sul et al, 2018), en el manejo de puntos de fuga de ampollas de filtración (Matsuo et al 2005), en el tratamiento quirúrgico de agujeros maculares de espesor completo (Kung & Wu, 2013) (Wells & Gregor, 1996), y en asociación con concentrado de plaquetas en modelos experimentales de cicatrización retiniana (Cullinane et al, 2002).

Nuestro grupo también ha estudiado la aplicación del suero autólogo en el manejo de la queratopatía cálcica, asociando el suero autólogo a los quelantes del calcio. La aplicación tópica disminuye la intensidad de la placa de calcio, apareciendo más espacios translúcidos sobre ésta y observándose una regresión franca en algunos pacientes. También lo hemos empleado en el postoperatorio tras la extracción de las placas de calcio. De igual forma, lo estamos empleando en el postoperatorio de pacientes con pterigion. En estos pacientes hemos encontrado como la aplicación de éste durante un mes tras la extirpación del pterigion reduce la tasa de recidivas y los pacientes refieren una importante mejoría sintomática con su utilización.

El suero autólogo se ha utilizado también en el tratamiento de la queratopatía de pacientes con aniridia (López-García et al, 2008). El 95% de estos pacientes presentó una mejoría clínica significativa tras el tratamiento con suero autólogo en relación a las terapias previas con lágrimas artificiales. La metaplasia escamosa mejoro unos dos grados de media en todos los niveles de gravedad e independientemente de la gravedad de la queratopatía. El suero autólogo favoreció la epitelización y la estabilidad de la película lagrimal en un 92% de los pacientes,

presentando pocos efectos sobre la regresión de neovasos y sobre la transparencia corneal.

Todas estas aplicaciones se pueden resumir diciendo que el suero autólogo es eficaz estimulando las células del epitelio corneal y conjuntival, gracias al aporte de una serie de factores de crecimiento que se encuentran en una situación deficitaria en todos estos procesos que cursan con trastornos de la epitelización.

Además, es un tratamiento bien tolerado y cuya preparación no resulta ser excesivamente cara, ya que no presenta excesivas dificultades técnicas y la casi totalidad de los aparatos que se necesitan para su preparación (campana de flujo, centrifugadora...) están disponibles en la mayoría de los hospitales.

Su principal inconveniente es la frecuencia con que hay que someter a los pacientes a extracciones de sangre. En ese sentido se han estudiado moléculas que permitan una mejor biodisponibilidad del producto o el uso de filtros que permitan una mejor preservación (López-García & García-Lozano, 2012).

En esta línea de intentar disminuir las extracciones de sangre y mejorar la conservación del producto, la liofilización, herramienta habitualmente utilizada para conservar productos que contienen proteínas termosensibles a largo plazo, puede ser también utilizada como método de preparación y preservación del suero autólogo.

## **1.4. Liofilización**

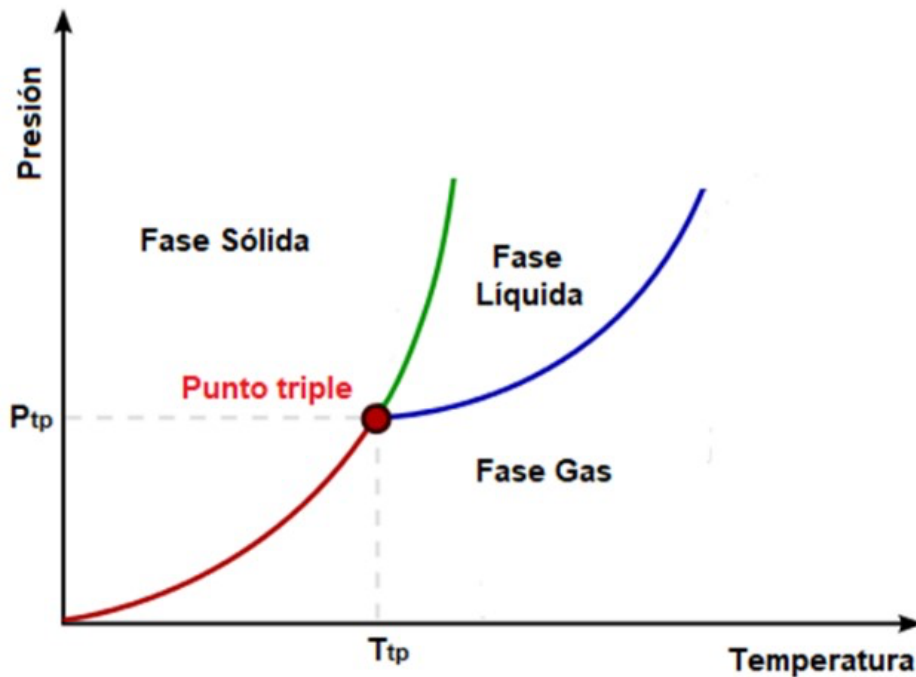
### **1.4.1 Bases de la liofilización**

Es bien conocido como el agua se comporta ante los cambios de temperatura. Entre 0°C y 100° C es agua en estado líquido, al sobrepasar los 100° C pasa a su estado gaseoso, el vapor de agua, y si baja de 0°C pasará a su estado sólido, el hielo. Esto es lo que ocurre a la presión atmosférica habitual.

Pero si se analiza el efecto de los cambios de presión, se podrá observar que a medida que la presión decrece, la temperatura a la cual el agua líquida pasa a su estado gaseoso también disminuye.

Si se llega a disminuir lo suficiente la presión, el agua se evaporará a temperatura ambiente. Si el descenso de la presión llega a menos de 6 mBAR, el agua no puede alcanzar el estado líquido, y en su lugar pasará del estado sólido directamente al estado gaseoso o viceversa.

Esta interacción entre presión y temperatura define el llamado punto triple, donde pequeñas variaciones en cualquiera de estas características pueden cambiar el estado de la masa de agua a hielo, a líquido o a vapor (Figura 21) (Clark et al, 1994).



**Figura 21. Punto triple.** Extraído de [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f6/Phase-diag\\_es.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f6/Phase-diag_es.svg)

El punto triple del agua se produce exactamente a una temperatura de 273,16 K (0,0098°C) y a una presión parcial de vapor de agua de 611,73 Pascales (6,1173 milibares; 0,0060373057 atm) y en él coexisten en equilibrio el estado sólido, líquido y gaseoso (Murphy & Koop, 2005).

Estando el agua a una presión y temperatura inferiores a las del punto triple, un aumento de la temperatura sin modificar la presión permitirá que el agua pueda ser extraída de un producto congelado solamente como vapor, sin pasar por su estado líquido. Este proceso es conocido como sublimación y es clave para la liofilización (Whitten, Gailey & Davis, 1992).

Así pues, la liofilización es un proceso de deshidratación a baja temperatura que implica congelar el producto, bajar la presión y luego eliminar el agua congelada por sublimación (Lombraña, 2008).

### **1.4.2 Historia de la liofilización**

Desde la época precolombina, las comunidades indígenas de los Andes centrales han desecado patatas y otros tubérculos gracias a las peculiares condiciones de altura y bajas presiones en las que se encuentra su hábitat. Al exponer estos productos a las bajas temperaturas nocturnas en las montañas, éstos se congelan. La acción de los primeros rayos de sol sobre el producto va a producir un desecado a muy bajas presiones y temperatura similar al que se produce en la liofilización (Gil Rosendo, 2017). Son necesarios varios ciclos consecutivos de congelación y desecación hasta que se consigue una pasta seca llamada chuño.

En este rango de presión, no nos encontraríamos por debajo del punto triple, pero el rango de temperaturas que permiten la fase líquida del agua es estrecho. Esto permite que se produzca una evaporación a temperaturas muy bajas que no llegan a destruir la estructura de los alimentos, por lo que produce una desecación bastante similar a la liofilización actual.

En la segunda mitad del siglo XIX, Pasteur y otros microbiólogos contemporáneos intuyeron la necesidad de implantar nuevas técnicas de secado

capaces de preservar los materiales biológicos sin afectar su composición y comenzaron a trabajar en métodos de secado a baja temperatura. Sin embargo, no fue hasta 1905 cuando se empezó a utilizar la disminución de la presión para conseguir el secado. Benedict y Manning emplearon una bomba química de vacío usando éter etilo y ácido sulfúrico (Benedict & Manning, 1905). Esta bomba no resultó muy eficaz y, en 1909, Shackell usó una bomba mecánica de vacío en un equipo de secado similar al de Benedict y Manning consiguiendo que el proceso de obtención de vacío fuese mucho más rápido (Shackell, 1909). En 1906, los científicos franceses Arsène d'Arsonval y Frédéric Bordas construyeron el que se cree que fue el primer aparato de liofilización de laboratorio (Corver, 2009).

A lo largo de la primera mitad del siglo XX los trabajos continuaron y se fueron definiendo las condiciones adecuadas para la liofilización de plasma sanguíneo y antibióticos (principalmente penicilina), cuya producción a gran escala fue significativa a finales de la década de 1930. Las mejoras aportadas al proceso por Flosdorf y Mudd entre 1935 y 1940, sentaron las bases del proceso de liofilización actual.

La segunda guerra mundial supuso un punto de inflexión para el desarrollo de la liofilización. Ante las crecientes necesidades de plasma sanguíneo y penicilina para tratar a los heridos en batalla y ante la falta de transportes refrigerados, la liofilización se desarrolló como una técnica que permitía que el plasma sanguíneo y la penicilina fuesen químicamente estables y viables sin refrigeración (Corver, 2009)

Pese a que Flosdorf y Mudd ya empezaron a usar el término liofilizar (Flosdorf & Mudd, 1935), no fue hasta 1943 cuando Alexander Fleming propuso el término

lío-filización formalmente. Éste proviene de las palabras griegas 'lueo' y 'phileo', que quieren decir 'solvente' y 'amigo'.

Si bien en la primera mitad del siglo XX la liofilización se empleó sobre todo en el campo de la salud, en la segunda mitad comenzó a entrar en el sector alimentario.

En 1958, siendo aún una técnica muy costosa, comenzó a usarse en unos pocos alimentos, como la leche, los huevos, el café o las sopas.

Tanto los alimentos como los productos farmacéuticos o biológicos que se liofilizan tienen en común que contienen sustancias termosensibles y volátiles, por lo que se necesita un método de conservación en el que se trabaje a temperaturas y presiones reducidas. De esta manera no se altera la estructura fisicoquímica del producto y se puede conservar sin mantener cadena de frío debido al bajo porcentaje de humedad que hace que este sea de gran estabilidad microbiológica.

La liofilización es una técnica costosa si se compara con otras formas tradicionales de secado, pero al no emplear calor, evita en gran medida la pérdida de las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos.

### **1.4.3 Fases de la liofilización**

Existen cuatro fases de la liofilización: pretratamiento, congelación, secado primario y secado secundario.

### 1.4.3.1 Pretratamiento

Incluye cualquier tratamiento del producto previo a su congelación. Puede implicar concentrar el producto, añadir componentes que mejoren su estabilidad o su apariencia o que mejoren su procesado (Schwegman, 2009).

### 1.4.3.2 Congelación

Para que la liofilización sea de la mayor calidad posible, se deben formar cristales de hielo grandes, ya que estos son más fáciles de eliminar durante la sublimación. Esto se consigue con una congelación lenta o subiendo y bajando varias veces la temperatura en torno al punto de congelación (Fellows, 2009). Por esta razón, la fase de congelación es la más importante del proceso de liofilización. Una cristalización adecuada es fundamental para conseguir una correcta velocidad de reconstitución y estabilidad del producto.

Por el contrario, en aquellos casos de liofilización en los que se quiera preservar estructuras como la pared celular, la formación de grandes cristales mediante una congelación lenta provoca la ruptura de estas paredes celulares, por lo que en estos casos es preferible una congelación más rápida (Fellows, 2009).

### 1.4.3.3 Secado primario

Durante el secado primario, la presión se reduce y se suministra el calor necesario al material para que las moléculas de agua sublimen. En el secado primario sublima un 95% del agua contenido en el producto y también debe ser un proceso lento, porque si se calienta demasiado, las moléculas termosensibles podrían dañarse (Corver, 2009).

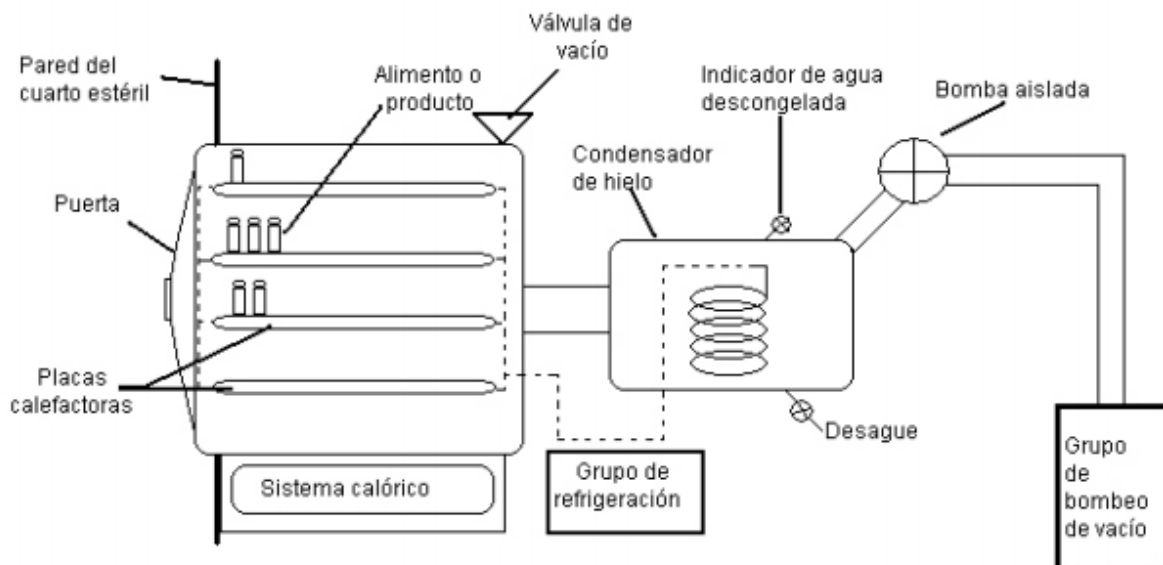
### 1.4.3.4 Secado secundario

En la fase de secado secundario se pretende eliminar aquellas moléculas de agua que no se han congelado al encontrarse en adsorción con la superficie del producto. La adsorción de una sustancia es la adhesión de moléculas a la superficie con la que se encuentran en contacto, en torno a la cual estas moléculas forman una película.

En esta fase, la temperatura se eleva más que en el secado primario para romper esta adhesión entre las moléculas de agua y las de la superficie del producto.

Una vez que se completa la liofilización, el vacío se rompe con un gas inerte y se sella herméticamente. Al final del proceso, el agua contenida en el producto liofilizado es de entre un 1 y un 4% respecto al total que contenía antes de la liofilización (Corver, 2009).

Existen varios modelos de liofilizadores disponibles en el mercado y aunque con diferentes características, todos ellos tienen en común una serie de componentes fundamentales como son: un sistema de refrigeración, un sistema de vacío, un condensador y un sistema calórico (Figura 22).



**Figura 22. Esquema de un liofilizador.** Adaptado de <http://avibert.blogspot.com/2013/03/equipos-de-lioofilizacion-parte-iv.html>

#### 1.4.4 Usos de la liofilización

##### 1.4.4.1 Liofilización de productos farmacéuticos

La liofilización empezó a ser usada en productos farmacéuticos en 1930, cuando se empleó para conservar suero y plasma sanguíneos. En 1940 permitió la producción a gran escala de penicilina. A partir de 1950 tuvo un papel crítico en la vacunación contra enfermedades como la viruela (Corver, 2009).

Gracias a la liofilización, la vacuna mantiene su efectividad durante varias semanas a temperatura ambiente incluso en ambientes tropicales. Esto facilitó la campaña de la Organización Mundial de la Salud contra esta enfermedad que amenazaba al 60% de la población mundial en 1960 y que en 1980 fue declarada como erradicada.

En la década de 1990, la proporción de medicamentos liofilizados era del 12% de todos los medicamentos inyectables. Este porcentaje subió hasta el 41% en 2011 y entre 2013 y 2015 llegó a ser el 50%, estando este crecimiento impulsado sobre todo por fármacos como anticuerpos monoclonales y otros fármacos biológicos (Rey L, 2010).

Los productos farmacéuticos se producen como polvos liofilizados preparados para la reconstitución en viales o como jeringas precargadas con la dosis adecuada para cada paciente.

Entre los ejemplos de productos farmacéuticos liofilizados encontramos vacunas como la del sarampión, la fiebre tifoidea o el meningococo; Interferon alfa, gran cantidad de antibióticos, derivados hemáticos y fármacos biológicos como Remicade (infiximab), Enbrel (etanercept) o Herceptin (trastuzumab).

### 1.4.4.2 Liofilización de alimentos

La liofilización de alimentos tuvo un gran desarrollo inicial gracias a la capacidad de esta forma de preservación para prolongar la vida útil y a la facilidad de conservación del producto liofilizado.

La liofilización fue especialmente empleada para la preparación de raciones destinadas a profesionales como militares, astronautas o montañeros que precisaban alimentos ligeros y capaces de conservarse durante mucho tiempo sin estropearse a pesar de las adversidades climáticas (Lombraña, 2009) (NASA, 2004).

Posteriormente, el abaratamiento de los equipos y optimización de los programas de liofilización popularizó estos sistemas de conservación que

mantenían íntegras las propiedades organolépticas y nutritivas de los productos de alimentación.

Tras la reconstrucción mediante hidratación del producto liofilizado, éste recupera su textura, aroma y sabor originales. La liofilización da como resultado la más alta calidad de alimentos entre todas las técnicas de secado disponibles (Lombraña, 2009).

### 1.4.4.3 Industria tecnológica

Además de sus usos en farmacia y en alimentación, en los últimos años ha comenzado a utilizarse en otros campos de industria tecnológica. En la industria química se liofilizan los productos para hacerlos más estables y fáciles de disolver.

También en nanotecnología, la liofilización se usa para la purificación de nanotubos (Maugey, 2007).

### 1.4.4.4 Otros usos

La liofilización se ha utilizado también en el campo de la taxidermia. De esta forma se conservan las estructuras de peces, anfibios, reptiles, insectos y mamíferos pequeños.

También ha sido estudiado y es empleado como método de recuperación de libros y documentos dañados por agua y otros líquidos.

## **1.5 Filtros**

### **1.5.1 Bases de la filtración**

Se denomina filtración al proceso de separación de sólidos en suspensión en un líquido mediante un medio poroso, llamado filtro. El filtro retiene los sólidos mayores del tamaño de la porosidad y permite el paso del líquido y partículas de menor tamaño. El tamaño de las partículas más grandes que pueden pasar con éxito a través de un filtro se denomina tamaño de poro efectivo. La filtración ha evolucionado como un arte práctico desde aplicaciones primitivas, como la tradicional filtración en lecho de arena empleado desde la antigüedad para la extracción de agua potable. La variedad de dispositivos de filtración, o filtros, es tan extensa como las variedades de materiales porosos disponibles como medios filtrantes y las condiciones particulares de cada aplicación. Así encontramos desde sencillos dispositivos, como los filtros domésticos de café o los embudos de filtración para separaciones de laboratorio, hasta complejos sistemas automatizados como los empleados en las industrias petroquímicas y de refino para la recuperación de catalizadores de alto valor, o los sistemas de tratamiento de agua potable destinada al suministro urbano (Sparks & Chase, 2015).

### **1.5.2 Historia de la filtración**

La filtración ha ido desarrollándose a lo largo de la historia de la humanidad. Su origen se remonta a la antigüedad, donde se utilizaban métodos mecánicos y químicos para purificar el agua. Los antiguos egipcios utilizaban arena y grava para filtrar el agua del Nilo. Los romanos también utilizaron métodos similares y desarrollaron sistemas de alcantarillado para eliminar los residuos de las ciudades.

A medida que la tecnología avanzó, surgieron nuevos métodos de filtración. Durante la Edad Media, los alquimistas desarrollaron métodos para purificar metales y productos químicos mediante la filtración. En el siglo XIX, se desarrollaron los primeros filtros de aire y de agua mecanizados, utilizando materiales como arena, grava y carbón activado.

En el siglo XX, surgieron nuevos materiales y tecnologías para la filtración. Durante la Segunda Guerra Mundial, se desarrollaron los primeros filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) para proteger a los trabajadores de las fábricas de armamento de las partículas de polvo y los contaminantes. A medida que la industria avanzó, se desarrollaron nuevos materiales como la membrana de polipropileno y los medios filtrantes sintéticos (Baker & Moses, 1981).

En la actualidad, la filtración se ha convertido en una industria en sí misma, con una amplia gama de aplicaciones en la industria, la medicina, el transporte, la construcción y el hogar. Los avances en la tecnología de filtración continúan, con el

desarrollo de nuevos materiales y técnicas para purificar el aire y el agua, así como para separar moléculas y partículas en una gran variedad de campos.

### **1.5.3 Uso de los filtros en medicina**

Los filtros son ampliamente utilizados en medicina para purificar y separar moléculas y partículas. Algunas de las aplicaciones más comunes son:

**Dialisis:** Se emplean filtros de membrana para separar los productos de desecho y el exceso de agua de la sangre de los pacientes con insuficiencia renal.

**Filtros de sangre:** se utilizan en cirugía cardíaca y en trasplantes. Sirven para eliminar partículas no deseadas de la sangre, como trombos, coágulos o fragmentos de catéter antes de que ésta sea devuelta al cuerpo del paciente.

**Filtros de aire:** Los filtros HEPA se emplean en salas de hospitales y quirófanos para purificar el aire y reducir la propagación de microorganismos y partículas.

**Filtros de cámara de aislamiento:** Los filtros de cámara de aislamiento se utilizan para proteger a pacientes y personal médico de enfermedades contagiosas al purificar el aire en las cámaras de aislamiento.

**Purificación de proteínas:** Generalmente el proceso de purificación de proteínas implica varias etapas de filtrado y separación para separar una proteína específica de otras proteínas y moléculas. Suelen implicar diferentes principios de separación como la afinidad (interacción específica de una proteína y un ligando, que permite capturar una proteína en una mezcla), exclusión por tamaño (se basa en el diferente tamaño de las proteínas y se consigue mediante un tamiz molecular),

o la cromatografía de intercambio iónico (se basa en la diferencia de carga de las moléculas de una mezcla que interactúan de manera diferente con una resina cargada).

Filtros de endoscopia: colocados en la punta del endoscopio, se utilizan para evitar que fragmentos de tejido o cálculos entren en el sistema de iluminación y dañen el equipo.

Filtros de inhaladores: se utilizan para purificar el aire y reducir la propagación de microorganismos durante el uso de inhaladores.

Estos son solo algunos ejemplos de cómo se utilizan los filtros en medicina, existen otras aplicaciones y existirán muchas nuevas en el futuro, ya que la tecnología de filtración continúa avanzando y desarrollándose.

### **1.5.4 Filtros Millipore**

Los filtros Millipore se utilizan para purificar y separar moléculas en una solución. Son fabricados por la compañía Millipore Sigma.

Millipore fabrica distintos tipos de filtros:

Filtros de membrana: utilizan una membrana sintética para retener partículas y moléculas de un tamaño específico.

Filtros de centrifugado: utilizan la fuerza centrífuga para separar partículas de diferentes tamaños.

Filtros de intercambio iónico: Estos filtros utilizan una resina iónica cargada para atraer y retener iones de carga opuesta en una solución.

### **1.5.5 Polietersulfona**

La polietersulfona (PES) es un polímero termoplástico que pertenece a la familia de los poliésteres. La PES se caracteriza por su alta resistencia a la tracción y a la flexión, y su baja expansión térmica.

La PES se fabrica a través de una reacción de polimerización entre el diisocianato de 4,4'-difenilmetano y una base de polioliol, como el etilenglicol. Es un polímero termoestable, resistente a la humedad y al calor, y con una excelente estabilidad química que permite su utilización en una amplia variedad de aplicaciones. Uno de sus usos más comunes es la fabricación de filtros de membrana ya que la PES permite la fabricación de membranas con propiedades reproducibles y controlables en cuanto al tamaño del poro (hasta 40 nanómetros). Esto la convierte en un material idóneo para la fabricación de filtros para pequeñas moléculas, necesarias en la industria biotecnológica, farmacéutica y química (Fink, 2008).

## 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

## 2. Justificación, hipótesis y objetivos

El suero autólogo ha demostrado ser una terapia eficaz en el manejo de patologías de la superficie ocular con una alta prevalencia en nuestro entorno y cuyas complicaciones constituyen un importante problema sociosanitario.

Aunque la industria farmacéutica ha potenciado el desarrollo de sustitutos lagrimales artificiales basados en diversos compuestos, la terapia con suero autólogo sigue siendo uno de los mejores recursos disponibles para los casos en que las lágrimas artificiales no son suficientes para controlar la enfermedad. No obstante, el uso de esta terapia se encuentra limitado por las estrictas condiciones de preparación y almacenamiento que estos preparados precisan para mantener la funcionalidad de sus componentes.

Un conocimiento más profundo de los principios activos presentes en el suero autólogo, así como de su comportamiento en diferentes circunstancias, ayudaría a desarrollar preparados más eficientes y a optimizar su dosificación.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es optimizar el uso de la terapia con suero autólogo en la práctica clínica oftalmológica investigando, por un lado, nuevas formas de producción y almacenamiento como la liofilización y, por otro, el efecto esterilizante de los filtros integrados en el envase de dispensación.

Para ello estudiaremos la viabilidad de los factores tróficos presentes en el suero tras un proceso de liofilización y su posterior reconstitución. Estudios previos han demostrado que la liofilización es un método de conservación idóneo para la preservación de sustancias termosensibles, por lo que pensamos que puede ser un método adecuado para conservar el suero autólogo y facilitar su uso terapéutico.

Además, evaluaremos los efectos del uso de envases con filtro esterilizador adaptado sobre la contaminación de colirios de suero autólogo comparando el

grado de contaminación de estos envases con el encontrado en los envases convencionales sin filtro.

Nuestra primera hipótesis es que la liofilización y su posterior reconstitución no altera la concentración ni la actividad biológica de los factores de crecimiento presentes en el suero autólogo. Para demostrarlo, diseñamos un estudio prospectivo en el que determinamos la concentración de factores de crecimiento y los efectos biológicos en cultivos celulares de muestras de suero autólogo reconstituido tras liofilización en comparación con muestras de suero autólogo fresco.

Estos estudios in vitro serán la base para plantear futuros ensayos clínicos destinados a evaluar los efectos del suero liofilizado en comparación con la terapia convencional con suero autólogo, así como para proponer protocolos de liofilización del suero que optimicen el rendimiento de este proceso y simplifiquen la técnica con el fin de hacerla extensible al mayor número de centros posible.

Nuestra segunda hipótesis es que los envases con filtro adaptado proporcionan esterilización mecánica que disminuye el riesgo de contaminación y permiten alargar la vida útil de los colirios, con la ventaja adicional de reducir la frecuencia de extracciones y cantidad de sangre necesaria para su elaboración. Para demostrarlo, planteamos un estudio prospectivo en el que se analiza y compara la contaminación de envases de suero autólogo (con y sin filtro) empleados por pacientes en terapia domiciliaria.

## 2. Justificación, hipótesis y objetivos

No hemos encontrado en la literatura médica referencias al uso de la liofilización o al uso de filtros en los envases de dosificación de suero autólogo, lo que significaría que estos son los primeros estudios en estos campos.

Para cumplir el objetivo general de nuestro trabajo nos hemos planteado una serie de objetivos específicos:

1. Determinar la concentración de los factores epiteliotróficos del suero autólogo en muestras liofilizadas en comparación con muestras de suero fresco.
2. Definir la estabilidad de estos factores epiteliotróficos en el tiempo en comparación con muestras de suero fresco.
3. Determinar la estabilidad de estos factores epiteliotróficos en el tiempo en comparación con muestras de suero descongeladas.
4. Estudiar el efecto biológico del suero liofilizado inmediatamente tras la reconstitución en relación al suero autólogo fresco en cultivos celulares.
5. Evaluar el efecto de la liofilización sobre aspectos como pH y osmolaridad del suero autólogo en comparación con suero fresco.
6. Establecer y validar protocolos de liofilización adecuados para la preparación del colirio de suero autólogo.
7. Analizar la contaminación microbiológica en envases con filtro y sin filtro empleados en terapia domiciliaria.
8. Estudiar la contaminación microbiológica en envases convencionales usados en terapia hospitalaria.
9. Evaluar la contaminación microbiológica en envases preparados en farmacia hospitalaria y no empleados en ninguna terapia.

## 2. Justificación, hipótesis y objetivos

10. Estudiar los microorganismos implicados en la contaminación de los envases.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

---

En la selección de pacientes, técnicas aplicadas y manejo de las muestras de ambos trabajos se cumplieron las normas nacionales e internacionales para el estudio clínico (Declaración de Helsinki para investigaciones biomédicas en humanos), siendo estos avalados por el Comité Ético del hospital.

A todos los pacientes que, de forma voluntaria, participaron los estudios se les solicitó por escrito la aceptación de su participación después de recibir una explicación sobre los riesgos y posibles efectos adversos relacionados con el procedimiento. Sólo los pacientes que comprendieron y aceptaron los fines, únicamente científicos, del estudio fueron incluidos.

Para analizar los efectos de la liofilización en el suero autólogo planteamos un estudio experimental que se dividió en dos apartados: en el primero se determinó la concentración y estabilidad en el tiempo de factores epiteliotróficos como EGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB y albúmina en muestras de suero autólogo fresco diluido al 50% con solución salina y en muestras de suero autólogo diluido al 50% con solución salina reconstituido tras liofilización. En el segundo, y en paralelo, se estudió el efecto biológico de ambos preparados sobre cultivos celulares.

Para evaluar el efecto de la utilización de filtros sobre la contaminación de los envases de suero autólogo estudiamos la contaminación microbiológica de 176 envases de suero autólogo utilizados por pacientes en terapia domiciliaria; 48 de ellos incluían un filtro adaptado y los otros 128 eran envases convencionales. Además, se realizaron pruebas de contaminación en 14 envases convencionales utilizados en pacientes hospitalizados y estudiamos también la contaminación de envases preparados y no utilizados a nivel clínico.

### 3.1 Preparación del colirio de suero autólogo:

#### 3.1.1 Para el estudio de suero liofilizado

Para el estudio en el laboratorio (determinación de factores de crecimiento y estudios con cultivos celulares), el suero se obtuvo de la sangre procedente de 12 voluntarios sanos con edades comprendidas entre 39 y 64 años (media  $46 \pm 11.4$  años).

Se siguieron las reglas habituales para venopunción. La preparación del suero implicó la extracción de 30 ml de sangre empleando un tubo de extracción por vacío con gelosa y sin anticoagulante (Vacutainer; Becton Dickinson, Plymouth, United Kingdom). La sangre se repartió en tres tubos y se dejó reposar en posición vertical durante 2 horas para separar los factores hemostáticos mediante la coagulación de la sangre. Una vez coagulada la sangre, se procedió a su centrifugación, 1700 g (3000 rpm) durante 10 minutos, para separar el suero del resto de elementos formes de la sangre.

Por cada donante se obtuvieron 13 ml de suero autólogo. El suero se diluyó en 13 ml de solución salina para conseguir una concentración final del 50% (26 ml).

El suero diluido se dividió en 13 alícuotas de 2 ml cada una: 6 alícuotas fueron estudiadas como muestras frescas y otras 6 fueron liofilizadas. Tres alícuotas de suero fresco y tres alícuotas de suero liofilizado se usaron para el estudio de los factores de crecimiento. De las otras 6 alícuotas (3 de suero fresco y 3 de suero liofilizado), uno de los dos mililitros de cada alícuota fue usado para el estudio del pH, de la densidad y la osmolaridad. El otro mililitro de cada una de las 6 alícuotas

se diluyó con otros 4 ml de solución salina (resultando en suero autólogo concentrado al 10%) y se usó para el estudio de los cultivos celulares.

Las muestras se analizaron o usaron en los cultivos celulares según correspondiese inmediatamente tras su preparación, cuando se trataba de muestras frescas, o inmediatamente tras su reconstitución en el caso de las muestras liofilizadas. También se realizaron análisis cuantitativos de factores de crecimiento y estudios en cultivos celulares a los 15 y 30 días. Tanto las muestras frescas como las reconstituidas tras liofilización se mantuvieron a una temperatura de 4°C hasta que se completaron los estudios.

La liofilización del suero tuvo lugar inmediatamente tras su preparación en un liofilizador Liolabor (Telstar, Tarrasa, España) (figura 23). Las alícuotas de 2 ml de suero diluido al 50% se colocaron en las bandejas del liofilizador. Se usó una liofilización programada con un punto de congelación de -45°C y 72 horas con una presión de 0,1 mbar.

El material liofilizado resultante, un polvo de coloración amarillenta, se guardó a temperatura ambiente en envases de vidrio cerrados herméticamente para evitar su rehidratación y su oxidación hasta su posterior reconstitución (figura 24).

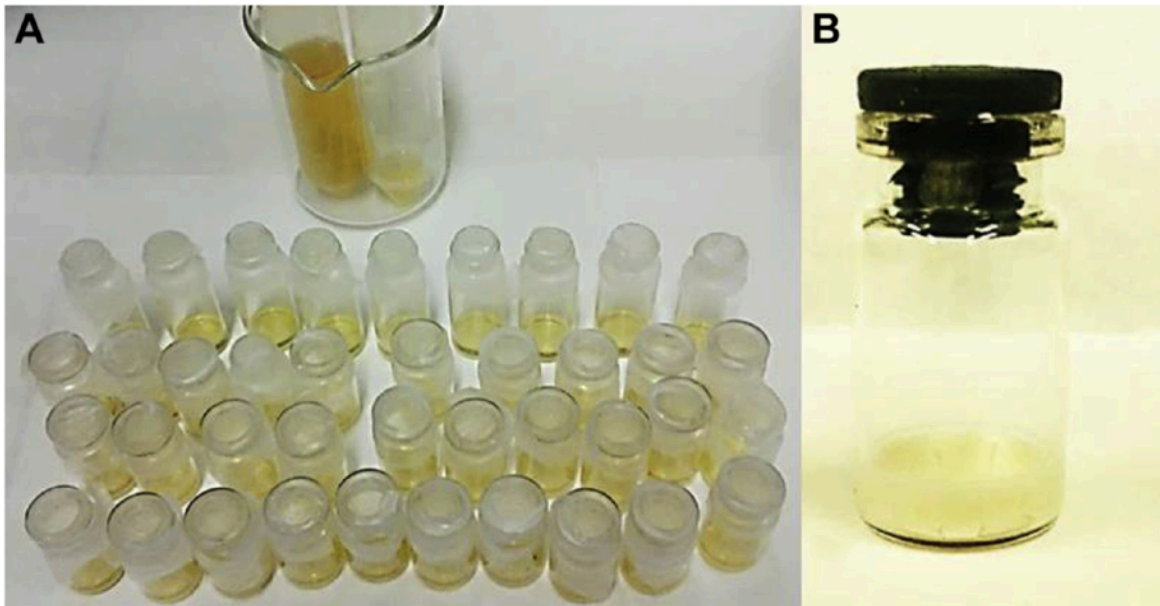
Tres meses después, las muestras fueron reconstituidas con solución salina hasta que se alcanzó su volumen original de 2 ml. El suero autólogo reconstituido mantuvo la apariencia amarillenta original del suero autólogo fresco. De igual forma que se realizó con el suero fresco, el suero reconstituido se guardó en un refrigerador a 4°C hasta que se realizaron los estudios correspondientes a los 15 y 30 días.

### 3. Material y métodos

La última alícuota de 2 ml se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante tres meses, estudiando la concentración de factores inmediatamente tras la descongelación y a los 15 y 30 días.



**Figura 23. Bandeja y cuadro de mandos del liofilizador.**



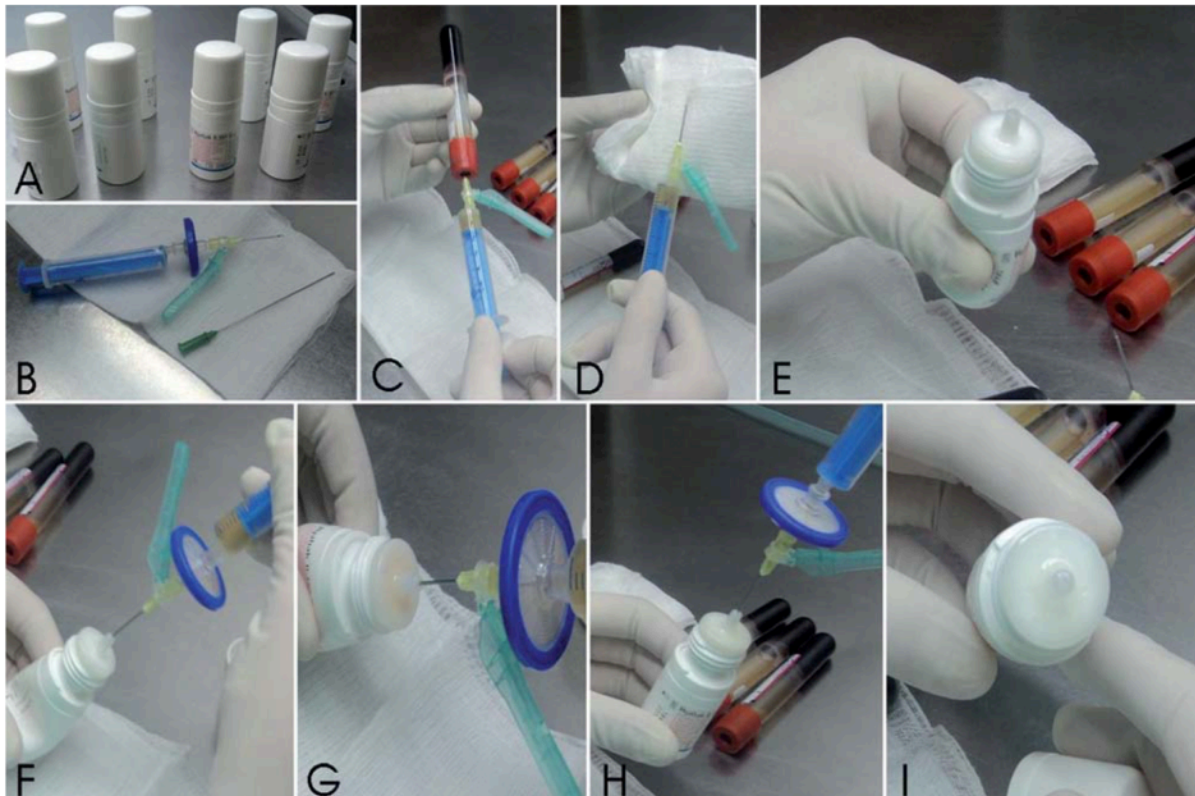
**Figura 24. Envases para liofilización. Para el proceso de liofilización se utilizaron recipientes de vidrio con 2 ml de suero autólogo diluido al 50% (A). Una vez completada la liofilización, estos envases deben cerrarse para evitar la rehidratación y oxidación de la forma liofilizada debido a su alta higroscopicidad (B).**

### **3.1.2 Para el estudio de los envases con filtro**

La preparación de suero autólogo implicó la extracción de entre 20 y 40 ml de sangre por punción venosa con un tubo de extracción al vacío con gelosa y sin anticoagulante (Vacutainer). La sangre se distribuyó en varios tubos y se dejó en posición vertical durante 2 horas para facilitar la coagulación, y posteriormente se

centrifugó a 3000 rpm (1700 g) durante 10 minutos para separar el suero del componente celular de la sangre. Los colirios se prepararon en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar situada en una sala aislada y especialmente preparada de la farmacia del hospital. Para evitar la contaminación cruzada, la preparación de estos productos se realizó de forma individual. Se extrajo un mililitro de suero del tubo y se introdujo a través de una unidad de filtración Millex (Durapore; Millipore, Madrid, España) dentro de un recipiente estéril adaptado para uso oftálmico. Luego se agregaron cuatro mililitros de solución salina para lograr una concentración final del 20%.

En el caso de los envases con filtro adaptado, el proceso de preparación fue idéntico al descrito anteriormente, con la única diferencia del uso del hialuronato de sodio incluido en el envase Hyabak (laboratorios Thea, Clermont Ferrand, Francia) (envases de muestra de 5 ml) para diluir el suero autólogo. Esto se logró generando presión negativa dentro del recipiente y extrayendo aire para introducir posteriormente 1,25 ml de suero de manera lenta y sostenida a través de una cánula de calibre 20 para obtener 6,25 ml de la preparación al 20% (figura 25).



**Figura 25: Preparación de colirios en envases con filtro. Envases de Hyabak (A). Aguja intravenosa y aguja roma de 20G, jeringa y filtro millipore (B). Extracción de 1,25 ml de suero (C y D). Para evitar reflujo de suero tras su introducción en el envase, se realiza una leve presión sobre el envase extrayendo aire del contenido y generando una presión negativa que facilita la entrada del suero dentro del envase (E). (F) Se introduce la aguja intravenosa, o la cánula roma, unos 5-6 mm con el fin de no perforar la membrana, introduciendo el suero muy lentamente y observando como el filtro y la luz del extremo dosificador adquieren un tono amarillento por la presencia del suero (G). Una vez introducido el suero, extraemos la aguja lentamente (H). La presión negativa del interior del frasco motiva la entrada de aire que empuja y mete el suero que queda en la luz y en el filtro hacia el interior del envase, no**

**dejando restos de suero en la luz del tubo por lo que el extremo dosificador muestra su habitual tonalidad blanca (I).**

## **3.2. Estudios de Laboratorio**

### **3.2.1 Concentración de los factores de crecimiento**

Se realizaron determinaciones cuantitativas de EGF, TGF- $\beta$ 1 y PDGF-AB mediante ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (técnica ELISA), usando kits de test específicos para EGF (Demeditec Diagnostics, Kiel, Alemania), TGF- $\beta$ 1 (Gen-probe diaclone, Besançon, Francia) y PDGF-AB (Demeditec Diagnostics, Kiel, Alemania).

La técnica ELISA permite la detección cuantitativa de los niveles de estos factores de crecimiento en sobrenadante de cultivos celulares, suero humano, plasma y otros fluidos corporales.

En estos kits una capa de anticuerpos monoclonales específicos anti-factor de crecimiento está adsorbida en la fase sólida de unos micropocillos. El suero se introdujo con una pipeta para que los antígenos específicos presentes en el suero se unan a los anticuerpos monoclonales correspondientes incluidos en los micropocillos y formen complejos antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se realizó una fase de lavado para eliminar toda sustancia no unida a estos complejos y se añadieron anticuerpos anti EGF, anti TGF- $\beta$ 1, o anti PDGF-AB (en función del kit

que fuese utilizado) conjugados con biotina para que se uniese al factor capturado en la primera fase del proceso.

El producto resultante se incubó durante dos horas y se procedió de nuevo a una segunda fase de lavado para eliminar los anticuerpos conjugados con biotina que no se habían unido a los complejos antígeno-anticuerpo formados en la primera fase.

Seguidamente se agregó Estreptavidina-HRP (*Horse Radish Peroxidase*, peroxidasa de rábano picante). La peroxidasa de rábano picante se une a los anticuerpos conjugados con biotina, dando como resultado un derivado coloreado, fluorimétrico o luminiscente, que permite su detección y cuantificación. Posteriormente, la mezcla se incubó durante una hora y se procedió después a una nueva etapa de lavado para eliminar la estreptavidina-HRP no unida a los complejos.

A continuación, se agregó a los pocillos una solución de TMB (tetrametilbenzidina). La TMB reacciona con la peroxidasa de rábano picante formando un producto coloreado cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de antígeno específico presente en el suero.

Las lecturas fueron procesadas usando un lector de microplacas MR-96 (Shenzhen Mindray Biomedical Electronics, Nanshan, Shenzhen, RP China) (figura 26).



**Figura 26: Microplate reader MR-96A (lectura de las placas) y Microplate washer MW-12A (fases de lavado).**

Los resultados se determinaron empleando una curva estándar. Para cada serie de ensayos, se preparó una curva de calibración con concentraciones conocidas que se empleó para extrapolar la absorbancia de las muestras y así obtener su concentración final.

Los kits se almacenaron a 4°C y todo el procedimiento se realizó a temperatura ambiente siguiendo los principios de las buenas prácticas de laboratorio y las pautas de seguridad apropiadas de acuerdo con la información proporcionada por el fabricante en el manual de usuario.

Todas las muestras, estándares y controles fueron analizados por triplicado. Para evitar resultados erróneos producidos por la contaminación bacteriana o fúngica de las muestras o la contaminación cruzada entre los reactivos, se extremaron las precauciones en cuanto a asepsia y utilización de material desechable.

La concentración de albúmina se determinó mediante colorimetría en un autoanalizador Cobas Integra 400 plus (Roche Diagnostics S.L, Barcelona. España) (figura 27).



**Figura 27: Cobas Integra 400 plus**

#### **3.2.2 Estudio de los cultivos celulares**

En cultivos celulares estudiamos la proliferación y diferenciación de células epiteliales corneales y células epiteliales conjuntivales. Para ello, se comparó el comportamiento de las células incubadas en un medio de cultivo específico para células epiteliales (CnT-50; CellnTec, Berna, Suiza) con el comportamiento de las células incubadas en ese mismo medio enriquecido con suero autólogo diluido al 10% o con suero autólogo al 10% reconstituido tras liofilización.

El suero fresco fue usado inmediatamente tras su preparación, y 15 y 30 días después. Durante este tiempo el suero estuvo conservado en un refrigerador a 4°C.

### 3. Material y métodos

El suero autólogo reconstituido a partir del liofilizado fue usado igualmente tras su reconstitución y a los 15 y 30 días (conservándose también durante este tiempo en el refrigerador a 4°C).

Para los cultivos de células corneales se emplearon los remanentes del anillo limbal desechado tras la preparación del botón corneal para queratoplastias, mientras que para la preparación de los cultivos de células conjuntivales se extrajeron células conjuntivales de la conjuntiva de esos mismos ojos procedentes de donante cadáver.

Las muestras conjuntivales, aproximadamente de 2x2 mm, fueron almacenadas hasta su posterior procesamiento en el laboratorio en un medio Eagle modificado por Dubelcco (DMED del Inglés Dulbecco's modified Eagle médium) (Life Technologies Ltd, Paisley, Reino Unido). En una primera fase, las muestras fueron lavadas con una mezcla de solución salina que contenía penicilina (100µm/ml) y estreptomycinina (2.5 µm/ml). Con el fin de eliminar el mayor número posible de fibroblastos y evitar su proliferación en los cultivos, el estroma conjuntival fue separado del epitelio.

Cada biopsia conjuntival fue dividida en 7-8 partes de tamaño similar y cada una de estas partes se colocó en el centro de placas de cultivo Falcon de 3 cm de diámetro (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire) con el epitelio mirando hacia arriba. Para el estudio comparativo, estos cultivos se dividieron en tres grupos: aquellos a los que se añadió solamente el medio de cultivo específico para células epiteliales CnT-50, y otros dos grupos en los que el medio de cultivo específico CnT-50 fue enriquecido con suero fresco o liofilizado.

En el caso de los cultivos de células corneales, las células epiteliales se separaron del resto del tejido corneal mediante digestión enzimática con una

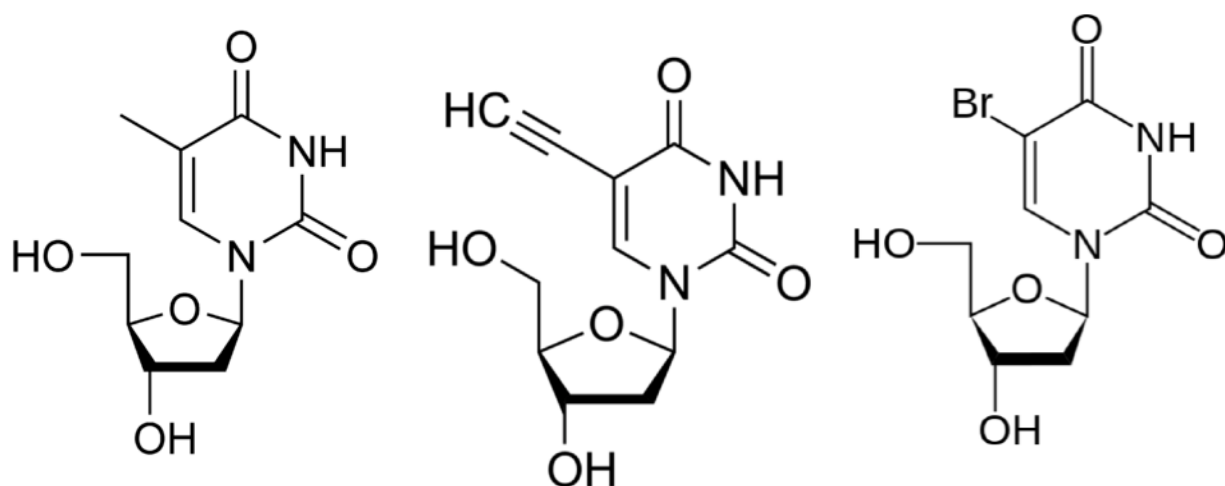
solución de tripsina recombinante y de EDTA durante 15 minutos. Las células aisladas se lavaron en solución salina tamponada con fosfatos y se recogieron por centrifugación (1000 g durante 5 minutos) a temperatura ambiente. Las células fueron sembradas con una densidad de  $3 \times 10^5$  células por mililitro en placas de cultivo de 24 pocillos con el medio CnT-50. Como en las células conjuntivales, los cultivos se dividieron en tres grupos, en función de si se usó el medio CnT-50 sólo o enriquecido con suero autólogo fresco o reconstituido tras la liofilización.

Los cultivos (tanto los de células corneales como los de células conjuntivales) fueron incubados a 37°C, con una humedad del 95% y una atmósfera que contenía un 5% de CO<sub>2</sub>. Los medios de cultivo fueron cambiados tres veces por semana y el crecimiento fue diariamente monitorizado mediante un microscopio de contraste de fase invertida.

La proliferación celular fue cuantificada por microscopía robotizada utilizando la fluorescencia de un marcador de proliferación como el EdU (un análogo del BrdU, que se incorpora al ADN de las células que están en la fase "S" del ciclo celular), así como mediante la observación directa de los pocillos de cultivo con un microscopio de contraste de fase invertida en el momento de la siembra (t=0) y a los 1, 3, 5 y 7 días de que las células fuesen sembradas. Los pocillos fueron fotografiados y se midieron las áreas cubiertas con células confluentes.

Tanto BrdU (Bromodesoxiuridina) como EdU (Etinildesoxiuridina) son nucleótidos sintéticos análogos de la timidina. Esta analogía (figura 28) permite una sustitución prácticamente total de los nucleótidos de timidina en las células que están en la fase de síntesis (fase S del ciclo celular) (Bick & Davidson, 1974), en la que ocurre la replicación del ADN. Es posible teñir las moléculas de BrdU con una

tinción fluorescente que las hace visible al microscopio y de esta forma cuantificar la proliferación celular (Rahiran et al, 2000).



**Figura 28: Estructura química de la Timidina, la Etinildesoxiuridina y de la Bromodesoxiuridina.**

Adaptado de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bromodeoxyuridine.svg>, [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DT\\_chemical\\_structure.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DT_chemical_structure.png), <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:5-ethynyl-2%27-deoxyuridine.png>

La diferenciación celular se evaluó por medio de estudios de inmunofluorescencia con citokeratina 19 (CK-19), que es específica para las células epiteliales conjuntivales, y citokeratina 3 (CK-3), específica de las células del epitelio corneal. Los estudios de inmunohistoquímica CK-3 y CK-19 se realizaron utilizando anticuerpos monoclonales de ratón (cepa 2F8 para la CK-3 y cepa Ab1 para la CK-19) a una dilución de 1:100 en solución salina tamponada con fosfatos (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EEUU).

Las muestras se fijaron en formol al 10% y se tiñeron con hematoxilina para aportar contraste. Más tarde fueron examinadas con un microscopio óptico

(Ophthiphot-2 microscope; Nikon, Tokio, Japón) y se tomaron fotografías con una cámara FX-35A (Nikon). La cuantificación de la tinción celular para CK-3 y para CK-19 se determinó utilizando fotografías de 10 por 15 centímetros, preparadas con una magnificación de 40 aumentos. Los estudios de diferenciación celular se realizaron a los 7 días de haber sembrado las células.

#### **3.2.3 Estudio del pH, osmolaridad y densidad**

El pH, la osmolaridad y la densidad fueron estudiados en muestras de suero fresco y en muestras de suero reconstituido tras la liofilización. El suero fresco fue estudiado inmediatamente tras su preparación, y 15 y 30 días después. Durante ese tiempo, las muestras se mantuvieron conservadas en un refrigerador a 4°C.

El suero autólogo liofilizado fue también estudiado inmediatamente tras su reconstitución y 15 y 30 días después, conservando durante este tiempo las muestras en el refrigerador a 4°C.

La osmolaridad mide la concentración total de sustancias en una disolución y se encuentra aumentada en los casos de ojo seco, jugando un papel muy importante en la patogenia del daño de la superficie ocular y la inestabilidad de la capa lagrimal que presentan los pacientes con ojo seco (Gilbard et al. 1984).

Las muestras fueron medidas en un aparato Micro Osmometer modelo-3MO (Advanced Instruments, Needham Heights, Massachusetts, EEUU), expresadas en mOsm/litro. El valor normal de osmolaridad está por debajo de 310 mOsm/l.

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución. Indica la concentración de iones de hidrógeno presentes en una disolución. Una disolución es ácida cuando presenta un pH menor de 7 y básica o alcalina cuando su pH es mayor de 7. El pH de la sangre se encuentra entre 7.35 y 7.45, y el pH de la lágrima se encuentra entre 6.5 y 7.6 (Abelson et al, 1981). El pH de las muestras se midió con un pHmetro (Mettler Toledo, Suiza).

La densidad mide la cantidad de masa que hay en un determinado volumen de una sustancia. La densidad de una sustancia varía con los cambios de presión y temperatura y con los cambios de estado. Para la medida de la densidad se empleó un densímetro portátil (Mettler Toledo, Suiza).

#### **3.2.4 Estudio de contaminación microbiológica**

Para el estudio de la contaminación microbiológica se diseñó un estudio prospectivo, consecutivo y aleatorizado sobre 176 envases de suero autólogo utilizados por pacientes en terapia domiciliaria: 48 de ellos incluían un filtro esterilizador adaptado (Hyabak; Thea, Clermont-Ferrand, Francia), y los 128 restantes eran envases convencionales opacos de polietileno blando (Bexen; Oiarso S. Coop, Guipúzcoa, España).

En todos los casos, el proceso de preparación del suero autólogo fue similar, con la única variación del tipo de envase utilizado para su dosificación y el vehículo de dilución: hialuronato de sodio al 0,15% en los envases con filtro y solución salina en el caso de los envases convencionales.

### 3. Material y métodos

En el estudio participaron 30 pacientes con síndrome de Sjögren con una edad media de  $46 \pm 12$  años (rango, 28 a 69 años). Los pacientes fueron instruidos en el uso correcto de estos preparados. Los envases se distribuyeron al azar entre los pacientes al inicio del tratamiento. Veinte pacientes fueron tratados con envases convencionales (6 a 8 envases para cada paciente) y 10 pacientes fueron tratados con envases con filtro (4 a 6 envases por paciente). Se distribuyeron un total de 192 envases y pudimos estudiar la contaminación en 176 de ellos.

Los envases con filtros adaptados se analizaron tras 28 días de utilización, mientras que los envases convencionales se analizaron a los 7 días de uso. En ambos casos, la aplicación del colirio se indicó a intervalos de 4 a 6 horas, y los envases se mantuvieron en refrigeración a 4°C entre aplicaciones.

Los envases que no se estaban usando se mantuvieron congelados a -20°C. Los pacientes tratados con envases convencionales escribieron la fecha de finalización del tratamiento en cada envase, manteniéndolos en nevera a 4°C a la espera de análisis microbiológicos.

También se analizaron 14 envases convencionales utilizados en entorno hospitalario en estricto cumplimiento de las normas de aplicación y tratando de reproducir condiciones de uso estándar. El análisis microbiológico se realizó cada semana durante un mes completo, suspendiendo el uso de colirio cuando se objetivaba contaminación.

Además, se estudiaron 10 envases inmediatamente después de la preparación en la farmacia y a intervalos de 15 días durante 2 meses. Estos envases permanecieron en el frigorífico y no se utilizaron con fines terapéuticos.

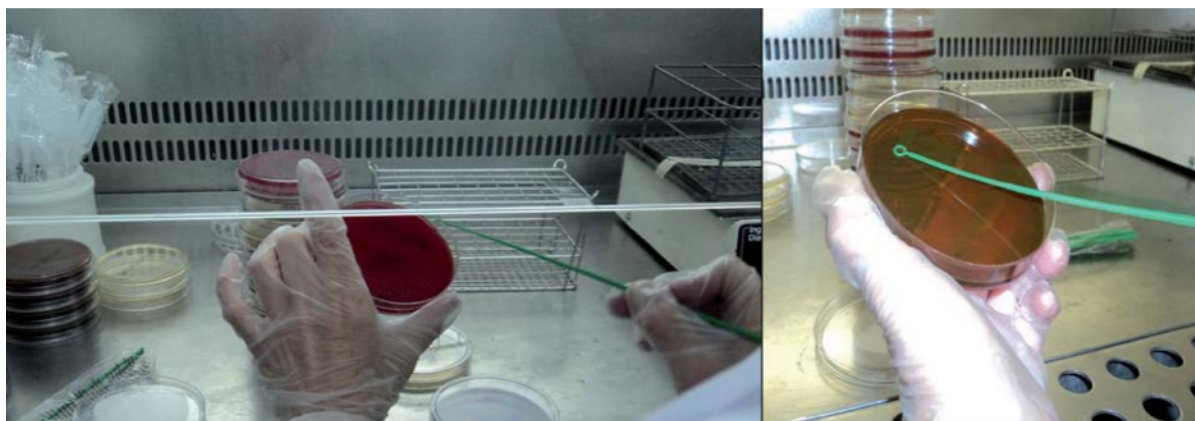
Para el análisis microbiológico de bacterias se utilizaron medios de cultivo de rutina, como agar sangre (donde se desarrollan la mayoría de los microorganismos

aerobios y anaerobios: *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, además de hongos) y agar chocolate (más específico para *Haemophilus*, *Bartonella*, *Brucella* y gérmenes anaerobios). Para el análisis microbiológico de hongos se utilizó agar Sabouraud con cloranfenicol, medio que no facilita el crecimiento de bacterias contaminantes (figura 29).



**Figura 29: Medios de cultivo. Agar sangre, agar chocolate y agar sabouraud.**

Las placas se sembraron en una cabina de flujo laminar en condiciones estériles y extremando las precauciones para evitar la contaminación de la muestra (figura 30). Se añadieron a las placas 3 o 4 gotas del colirio de suero autólogo y se extendieron sobre ellas con un asa calibrada. Las placas de agar sangre y agar chocolate se leyeron a las 48 horas, y las placas de agar Sabouraud se leyeron a los 5 días; en los 2 primeros de ellos la temperatura se mantuvo a 37°C, bajando a temperatura ambiente los 3 últimos días para facilitar el crecimiento de *Aspergillus*. Aunque en muchos casos se sospechó la identidad del microorganismo por su patrón de crecimiento y por el aspecto y tamaño de sus colonias en medios sólidos, estas se identificaron posteriormente con el analizador Vitek 2 Compac (Biomerioux, Marcy L'Etoile, Francia). La persona que analizó las placas en busca de contaminación desconocía la identidad de las muestras.



**Figura 30: Siembra y preparación de las placas en campana de flujo laminar.**

#### **3.3 Estudio estadístico.**

Los resultados de las diferentes pruebas para el estudio estadístico se recogieron y almacenaron en una base de datos. El estudio estadístico se realizó usando el programa informático SPSS (IBM, Armonk, New York, EEUU), en su versión 11.0 para Windows (Microsoft, Redmond, Washington, EEUU).

La descripción de los datos finales se realizó usando la media y la desviación estándar. Se emplearon test no paramétricos para comparar las variables cuantitativas. Se usaron los test de Wilcoxon y Friedman para analizar la evolución de los parámetros a lo largo del estudio. La prueba de la U de Mann-Whitney y el análisis de la varianza (ANOVA) se utilizaron para comparar parámetros entre muestras de suero fresco y liofilizado, y el test de Kruskal-Wallis se usó específicamente para comparar la concentración de los factores de crecimiento entre ambas muestras.

Las diferencias entre envases con y sin filtro en terapia ambulatoria se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado. Para analizar la contaminación de

los envases en el ámbito hospitalario, así como la relación entre la contaminación y el tiempo que los envases permanecieron en los frigoríficos esperando el análisis se utilizaron pruebas no paramétricas (pruebas de Wilcoxon y Friedman).

Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza del 95% ( $P < 0.05$ ).

## 4. RESULTADOS

---

#### **4.1. Concentración de los factores de crecimiento**

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de EGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB y albúmina entre las muestras de suero autólogo fresco y las muestras de suero autólogo reconstituido tras liofilización ( $p < 0.05$ ).

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la concentración de cada uno de los factores de crecimiento en las muestras estudiadas a los 15 y 30 días desde su obtención o desde su reconstitución respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Tabla 5).

De igual forma tampoco se observaron diferencias significativas al comparar la concentración de los factores de crecimiento de la muestra que permaneció congelada durante tres meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  ( $P < 0.05$ ).

	Suero fresco			Suero liofilizado			Suero descongelado		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
<b>EGF, pg/mL</b>	151 ± 8.2	146 ± 7.2	149 ± 7.6	147 ± 9.5	140 ± 7.2	135 ± 8.9	145 ± 7.1	146 ± 7.5	145 ± 8.2
<b>TGF-β1, ng/mL</b>	8.33 ± 0.8	8.12 ± 0.7	8.26 ± 0.8	9.09 ± 1.4	8.19 ± 1.1	8.22 ± 0.9	8.4 ± 1.1	8.8 ± 0.8	8.5 ± 1.2
<b>PDGF-AB, ng/mL</b>	8.41 ± 0.9	8.52 ± 0.8	8.30 ± 0.9	8.29 ± 1.2	8.03 ± 0.8	7.85 ± 0.6	7.7 ± 0.8	8.0 ± 0.9	7.9 ± 1.1
<b>Albumin, g/dL</b>	3.65 ± 0.28	3.58 ± 0.33	3.61 ± 0.39	3.68 ± 0.35	3.76 ± 0.32	3.78 ± 0.31	3.8 ± 0.32	3.6 ± 0.27	3.8 ± 0.28

**Tabla 5. Concentración de factores de crecimiento medido a los 0, 15 y 30 días tras la preparación del suero fresco, la reconstitución a partir de suero liofilizado y la descongelación tras 3 meses congelado.**

#### **4.2. Estudio del pH, osmolaridad y densidad.**

No encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la densidad, la osmolaridad y el pH, entre muestras de suero fresco y suero liofilizado estudiado inmediatamente tras la reconstitución. Tampoco hubo diferencias significativas en estos parámetros entre las determinaciones realizadas inmediatamente tras su preparación o reconstitución y las obtenidas a los 15 y 30 días en ambos tipos de suero ( $P < 0.05$ ) (Tabla 6).

	Tiempo (días)	pH	Osmolaridad (mOsm/L)	Densidad (g/m <sup>3</sup> )
<b>Suero fresco</b>	0	7.42 ± 0.4	286 ± 3.8	1.035 ± 5.5
	15	7.40 ± 0.3	288 ± 3.4	1.032 ± 5.1
	30	7.41 ± 0.4	285 ± 4.2	1.065 ± 5.3
<b>Suero reconstituido tras liofilización</b>	0	7.43 ± 0.3	282 ± 4.1	1.032 ± 4.4
	15	7.42 ± 0.4	285 ± 3.7	1.035 ± 5.0
	30	7.43 ± 0.4	286 ± 3.4	1.033 ± 5.1

**Tabla 6. Características químicas y reológicas de las muestras de suero autólogo fresco y liofilizado**

Además de los resultados similares en las variables de laboratorio estudiadas, el aspecto externo tanto del suero fresco como el suero reconstituido a partir de liofilizado fue similar, presentando una apariencia amarilla clara con baja viscosidad.

### **4.3. Estudio de cultivos celulares**

#### 4.3.1 Proliferación celular

Encontramos un aumento significativo tanto en la proliferación como en la diferenciación de las células epiteliales corneales y conjuntivales en los medios de cultivo enriquecidos con suero autólogo, ya fuera suero fresco o suero reconstituido tras liofilización, en comparación con los cultivos estudiados en medios de cultivo convencionales ( $p=0.003$ ).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a proliferación y diferenciación celular entre las muestras cultivadas con suero fresco y las muestras cultivadas con suero liofilizado ni inmediatamente tras su preparación o reconstitución ni en los estudios realizados 15 y 30 días después.

La proliferación de las células corneales epiteliales, determinada mediante ensayo de inmunofluorescencia con el marcador EdU, fue significativamente mayor en el caso de los cultivos enriquecidos con suero autólogo en relación a los cultivos en los que sólo se utilizaron medios convencionales. En los medios enriquecidos con suero fresco, la proliferación celular fue un  $16.2 \pm 2.5\%$  mayor que la proliferación media estimada en los cultivos no enriquecidos, mientras que con los medios enriquecidos con suero liofilizado ésta fue un  $15.4 \pm 2.3\%$  mayor (Figura 31).

Resultados similares encontramos en cuanto a la proliferación en cultivos de células epiteliales conjuntivales. En comparación con los medios de cultivo convencionales, la adición de suero autólogo produjo un aumento significativo de la proliferación celular que fue de  $17.4 \pm 3.1\%$  en el caso del suero fresco y  $18.1 \pm 2.5\%$  para el suero liofilizado (tabla 7).

De igual forma, los resultados obtenidos en cuanto a proliferación celular usando suero fresco y suero liofilizado 15 y 30 días tras su preparación o reconstitución mostraron un incremento significativo de la proliferación celular en comparación a los obtenidos con medios de cultivo convencionales no enriquecidos, sin que hubiese diferencias estadísticamente significativas al comparar la proliferación entre el medio enriquecido con suero fresco y el medio

enriquecido con suero liofilizado tanto para células epiteliales corneales como conjuntivales ( $P < 0.05$ ) (tabla 7).

	Proliferación células corneales			Proliferación células conjuntivales		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
Suero autólogo fresco	16.2 ± 2.5%	14.3 ± 2.2%	14.6 ± 2.0%	17.4 ± 3.1%	16.7 ± 3.5%	17.2 ± 2.8%
Suero autólogo liofilizado	15.4 ± 2.3%	14.8 ± 2.5%	14.4 ± 2.1%	18.1 ± 2.5%	17.7 ± 2.3%	18.2 ± 2.2%

**Tabla 7. Incremento de la proliferación de células corneales y conjuntivales determinada por ensayo EdU en medios enriquecidos con suero autólogo fresco y liofilizado, inmediatamente tras su preparación o reconstitución (0 días), 15 y 30 días después de éstas, en comparación con la proliferación obtenida con medios de cultivo no enriquecidos tras 7 días de estudio. Los cultivos se examinaron en el momento de la siembra y tras 1, 3, 5 y 7 días.**

La adición al medio de cultivo convencional de ambas formas de suero mostró una mejoría in vitro de la dispersión y la proliferación de las células conjuntivales y corneales, (figura 31).

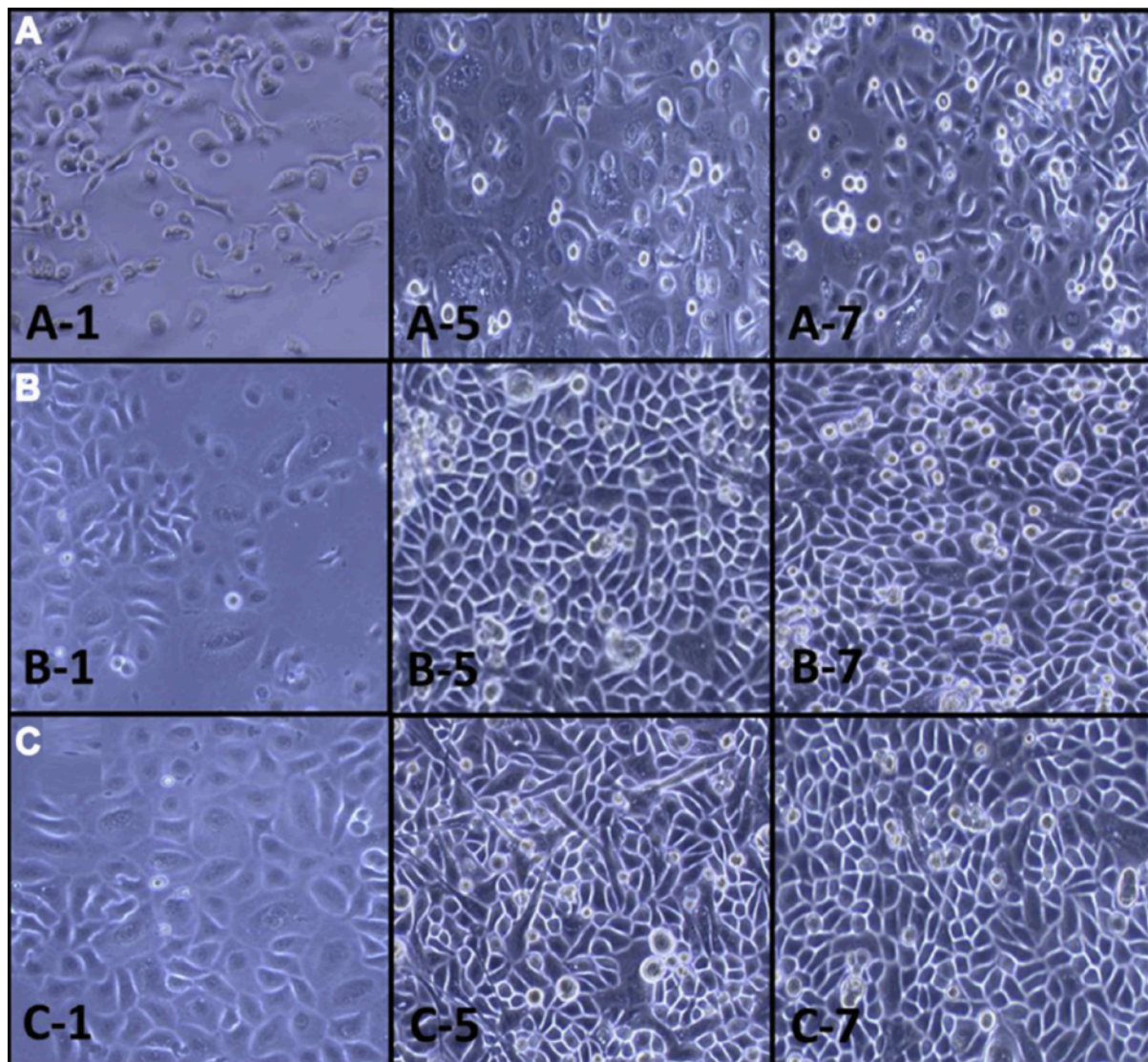


Figura 31. La proliferación celular se incrementó en cultivos enriquecidos con suero autólogo (B, C) en comparación con el medio de cultivo convencional (A), como puede verse en las fotos tomadas a 1, 5 y 7 días de diferencia. No se encontraron diferencias significativas en la proliferación de células entre cultivos enriquecidos con suero fresco (B) o liofilizado (C). Los cultivos se mantuvieron a 37°C, con 95% de humedad y 5% de Co<sub>2</sub>.

El área de células epiteliales mostró un incremento estadísticamente significativo en los cultivos enriquecidos con suero autólogo en comparación con los cultivos convencionales, sin encontrar diferencias significativas en el incremento del área de crecimiento celular entre cultivos enriquecidos con suero fresco o liofilizado en ninguna fase del estudio ( $P < 0.05$ ) (Tabla 8).

	Área células corneales			Área células conjuntivales		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
Suero autólogo fresco	19.5 ± 3.0%	18.6 ± 2.8%	19.1 ± 3.2%	22.5 ± 3.5%	21.6 ± 3.2%	21.5 ± 3.7%
Suero autólogo liofilizado	20.3 ± 2.7%	19.2 ± 2.9%	19.5 ± 3.1%	23.5 ± 3.1%	23.2 ± 3.0%	22.4 ± 3.1%

**Tabla 8. Incremento del área de ocupación celular en medios enriquecidos con suero autólogo fresco y liofilizado inmediatamente tras su preparación o reconstitución (0 días), 15 y 30 días después de éstas, en comparación con el área de expansión obtenida con medios de cultivo no enriquecidos tras 7 días de estudio. Los cultivos se examinaron en el momento de la siembra y tras 1, 3, 5 y 7 días.**

#### 4.3.2 Diferenciación celular

En cuanto a la diferenciación celular, los cultivos enriquecidos con suero mostraron un aumento significativo en la inmunotinción de CK-19 y CK-3 en comparación con los cultivos en medio de cultivo convencional no suplementado. ( $P = 0.002$  y  $P = 0.001$  para cultivos conjuntivales y corneales, respectivamente).

En los cultivos conjuntivales encontramos un incremento de la inmunotinción de  $18.4 \pm 2.1\%$  y  $17.6 \pm 1.8\%$  para el suero fresco y el liofilizado respectivamente comparado con el medio de cultivo convencional (muestras de suero utilizadas inmediatamente tras la preparación o reconstitución ( $t = 0$ )).

En el caso de los cultivos de células corneales encontramos un incremento de la inmunotinción de  $17.1 \pm 2.0\%$  y  $16.6 \pm 1.6\%$  para el suero fresco y el liofilizado (Tabla 9).

No encontramos diferencias significativas entre los resultados relativos a la diferenciación celular obtenidos inmediatamente tras la preparación o reconstitución del suero ( $t = 0$ ) y los obtenidos 15 y 30 días después ( $t = 15$  y  $t = 30$ ) ( $P < 0.05$ ).

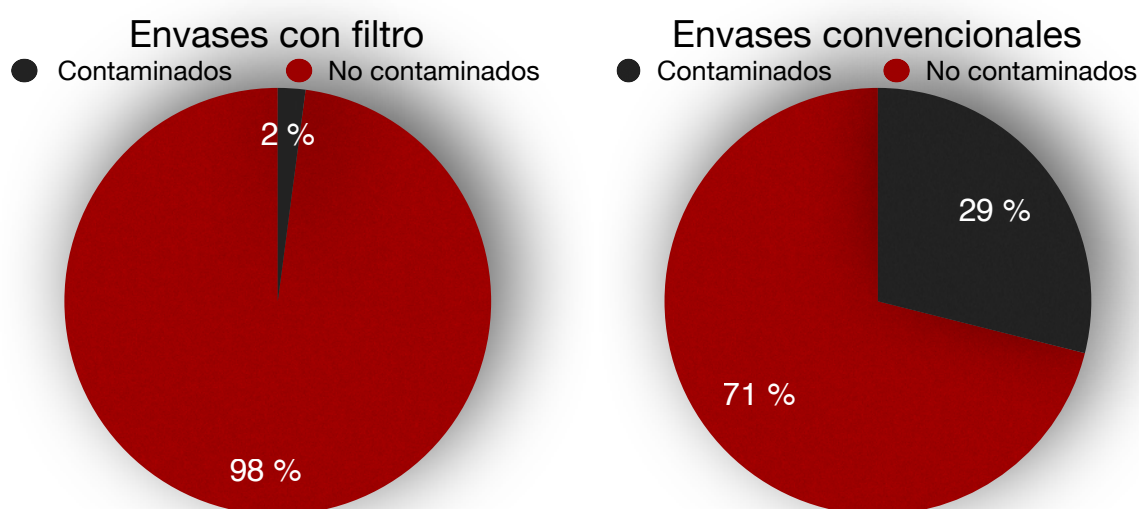
	Inmunotinción CK-19 (células conjuntivales)			Inmunotinción CK-3 (células corneales)		
	0 días	15 días	30 días	0 días	15 días	30 días
Suero autólogo fresco	$18.4 \pm 2.1\%$	$18.6 \pm 2.8\%$	$19.1 \pm 3.2\%$	$17.1 \pm 2.0\%$	$17.5 \pm 2.2\%$	$17.0 \pm 2.2\%$
Suero autólogo liofilizado	$17.6 \pm 1.8\%$	$17.8 \pm 2.2\%$	$17.3 \pm 2.0\%$	$16.6 \pm 1.6\%$	$16.9 \pm 1.9\%$	$16.4 \pm 2.1\%$

**Tabla 9. Incremento en la inmunotinción con CK-19 (específica para células conjuntivales) y con CK-3 (específica para células corneales) en medios enriquecidos con suero autólogo fresco y liofilizado inmediatamente tras su preparación o reconstitución (0 días), y 15 y 30 días después, en comparación con la inmunotinción obtenida con medios de cultivo no enriquecidos después de 7 días.**

#### 4.4. Contaminación microbiológica

Sólo uno de los 48 envases con filtro esterilizador adaptado (2,1%) se contaminó por *Staphylococcus epidermidis* tras 1 mes de tratamiento.

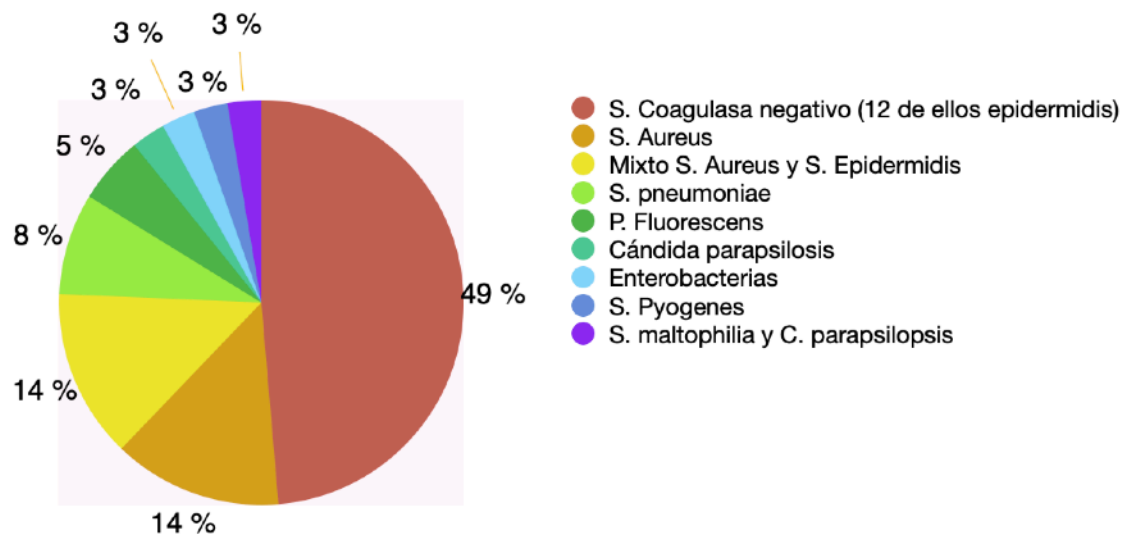
En cambio, de los 128 envases convencionales analizados, 37 (28,9%) se contaminaron tras 7 días de tratamiento. (Gráfica 1)



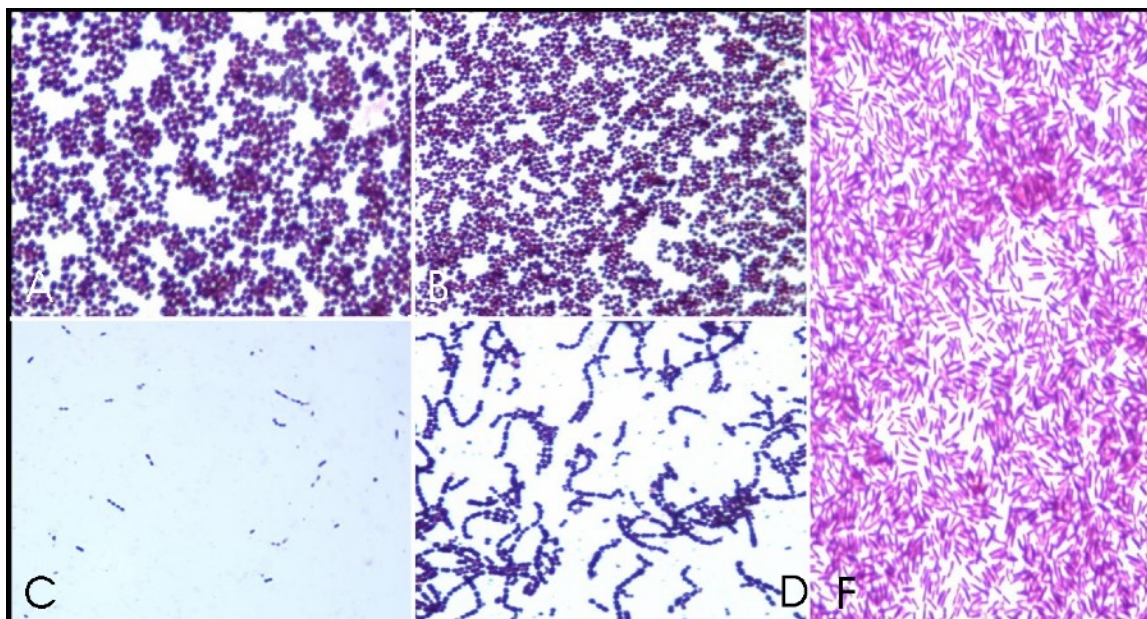
**Gráfica 1: comparación de la contaminación microbiológica entre envases con filtro adaptado (estudiados tras un mes de tratamiento) y envases convencionales (estudiados tras una semana de tratamiento).**

De los envases contaminados, 18 (48,6%) lo estaban por *Staphylococcus coagulasa negativos* (12 de ellos eran *Staphylococcus epidermidis*), 5 (13,5%) por *Staphylococcus aureus*, otros 5 (13,5%) por cultivos mixtos de *S. aureus* y *S. epidermidis*, 3 por *Streptococcus pneumoniae* (8,1%), 2 por *Pseudomonas fluorescens* (5,4%), 1 (2,7%) presentaba contaminación por *Candida parapsilosis*, 1

contaminación por enterobacterias (especies de *Pantoea*), 1 por *Streptococcus pyogenes* y 1 por una flora mixta de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Cándida parapsilosis* (Gráfica 2) (figuras 32 y 33).



**Gráfica 2: agentes causantes de contaminación en envases convencionales.**



**Figura 32: tinción con Gram. (A) Estafilococos epidermidis y (B) estafilococo aureus. La tinción con Gram no permite diferenciar entre estos dos gérmenes. Ambos crecen en varias direcciones formando racimos. Los estreptococos**

son gérmenes Gram + que se dividen en torno a un eje formando parejas o grupos de tres o cuatro gérmenes como los neumococos (C) o en cadenas como el estreptococo beta hemolítico (D). (F) Pseudomonas. Son bacilos rectos o ligeramente curvados Gram -.

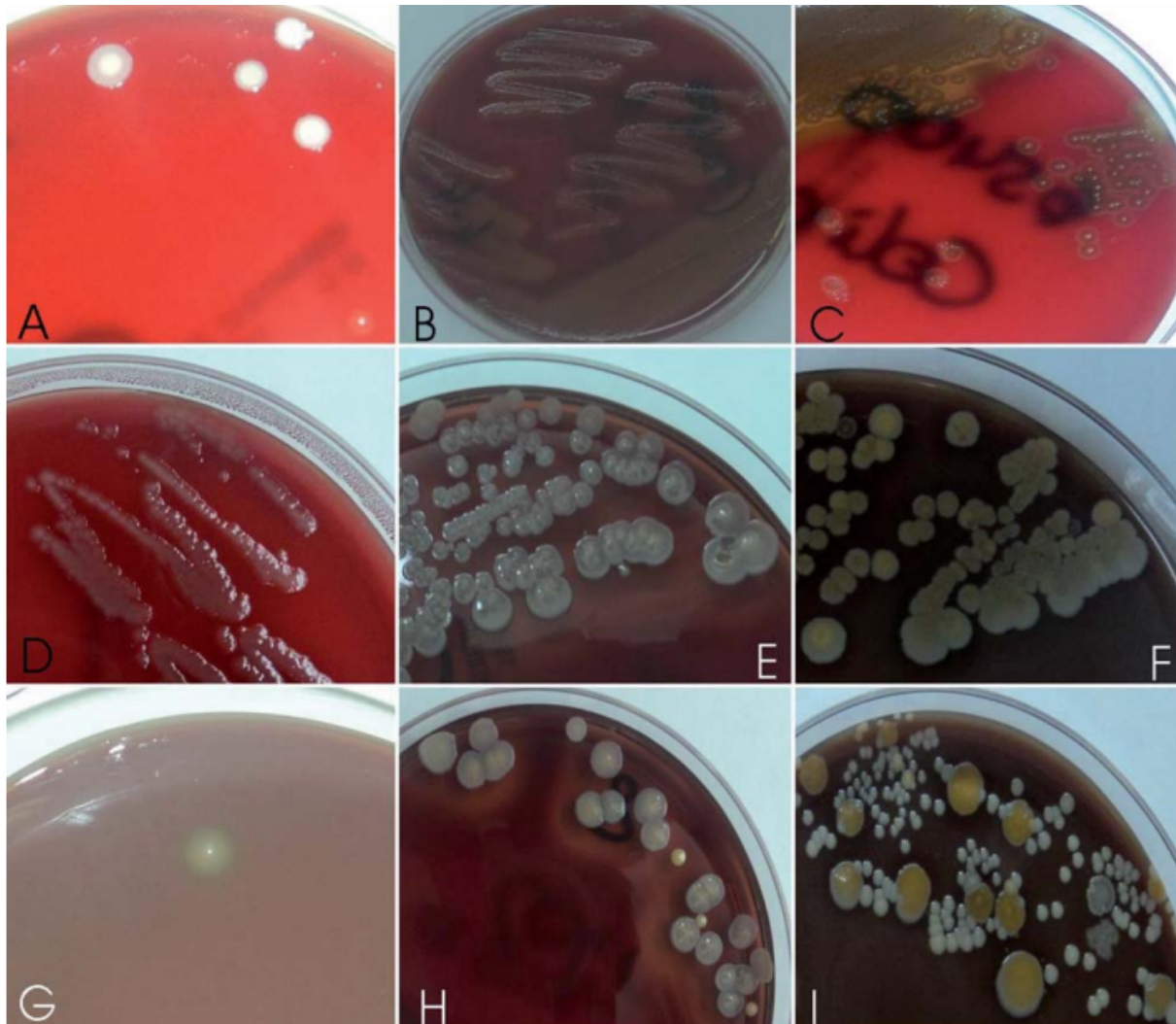
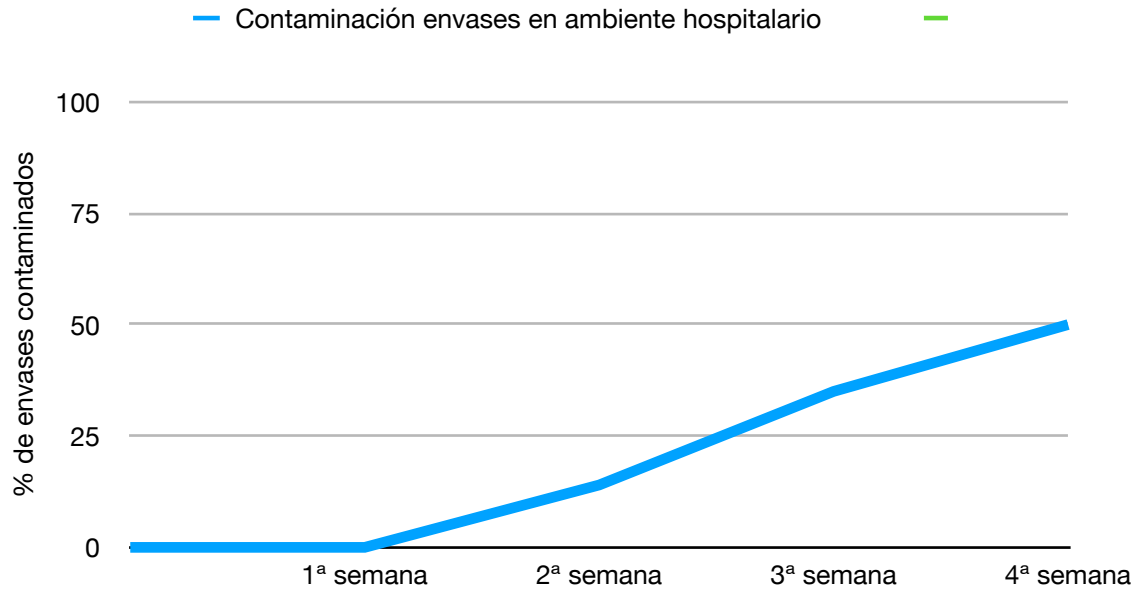


Figura 33: crecimiento de colonias en placas de cultivo: (A) Estafilococo epidermidis en agar sangre. Se aprecia un pequeño número de colonias grandes, cremosas y de bordes lisos. (B) Estreptococo beta hemolítico en agar sangre. (C) Colonias de neumococo creciendo en agar sangre. Se puede apreciar el halo de hemólisis en torno a las colonias. (D) Pseudomonas en agar

**sangre. Tiende a formar colonias brillantes, confluentes, de bordes continuos y centro opaco. S. Aureus creciendo en agar sangre (E) y agar chocolate (F). Obsérvese el halo de hemólisis en torno a las colonias en la placa de agar sangre que lo diferencia de las colonias de S. Epidermidis. (G) Colonia aislada de Estafilococos coagulasa negativo en agar chocolate. Flora mixta de S. Aureus y S. Epidermidis creciendo en agar sangre (H) y agar chocolate donde las colonias de S. Aureus adoptan un aspecto más dorado (I)**

No se encontró ningún caso de contaminación en las muestras analizadas inmediatamente después de su preparación por la farmacia del hospital, ni en las pruebas realizadas a intervalos de 15 días durante los 2 meses de seguimiento de las muestras que no se utilizaron en terapia.

El estudio microbiológico de los 14 envases utilizados en el ambiente hospitalario mostró que la contaminación se produjo por S. epidermidis y otras especies de Staphylococcus coagulasa-negativos. No se encontró ningún caso de contaminación después de 1 semana de tratamiento y 7 envases (50%) no estaban contaminados después de 1 mes; 2 envases (14,3 %) se contaminaron después de 2 semanas, 3 envases (21,4%) se contaminaron después de 3 semanas y otros 2 envases (14,3 %) se contaminaron tras 4 semanas de utilización (Gráfica 3).



**Gráfica 3: Contaminación de los envases convencionales en ambiente hospitalario.**

## 5. DISCUSIÓN

---

### **5.1. Utilidad del suero autólogo**

El tratamiento con suero autólogo y otros derivados hemáticos ha demostrado ser un método eficaz para estimular la viabilidad de las células del epitelio corneal y conjuntival al aportar factores de crecimiento necesarios para la epitelización que se encuentran en situación deficitaria en muchos de los trastornos de la superficie ocular.

Las alteraciones de la superficie ocular representan una importante proporción de las consultas atendidas en los centros oftalmológicos. Aunque muchas se pueden considerar de carácter leve y se resuelven sin dificultades, otras conllevan una considerable morbilidad y generan importantes repercusiones sociosanitarias.

En los casos graves de afectación de la superficie ocular, la terapia con preparados hemáticos ha mostrado ser más eficaz que otras terapias acelerando la regeneración del epitelio, estabilizando la lágrima y, en definitiva, acortando el periodo de cicatrización de úlceras y defectos epiteliales (López-García et al 2007).

### **5.2 Dificultades con la terapia convencional**

Sin embargo, la utilización de preparados hemáticos como colirio presenta una serie de inconvenientes que nos obligan a replantearnos su modo de aplicación con el fin de facilitar su posología y disminuir las frecuentes extracciones de sangre que necesitan los pacientes en terapia crónica y que, en algunas ocasiones, pueden llevar al paciente a rechazar el tratamiento. Además, el suero autólogo

diluido en suero fisiológico precisa instilaciones frecuentes (cada 2 o 3 horas) ya que su permanencia en la superficie ocular es menor a 5 minutos. Por otro lado, al no tener conservantes, los colirios deben permanecer en nevera para disminuir la contaminación y preservar el efecto de los factores de crecimiento, lo que supone un importante problema cuando el paciente tiene un estilo de vida activo.

### **5.3 Mejorando los sistemas de producción del suero autólogo**

Un mayor conocimiento de los principios activos de estos preparados y su comportamiento en diferentes situaciones nos ha permitido desarrollar preparados más eficaces y con una posología optimizada y más cómoda para el paciente. En ese sentido, nuestro grupo ha dirigido su línea de investigación hacia el estudio de nuevas vías de producción y de presentación del colirio de suero autólogo. Siguiendo esta idea de optimizar la terapia con estos preparados, hemos estudiado vehículos que aumentasen el tiempo de contacto de los factores de crecimiento con la superficie ocular permitiendo una mejor biodisponibilidad, así como la utilización de filtros incluidos en el envase que disminuyan el riesgo de contaminación y aumenten el tiempo de utilización. (López García et al, 2014) (López García et al, 2012)

La opción de incluir en el vehículo agentes viscosantes que aumenten la permanencia de los factores epiteliotróficos del suero sobre la superficie ocular y disminuyan el número de instilaciones resulta muy atractiva. Sin embargo, no todos los sustitutos lagrimales con estas características son de utilidad en la práctica

clínica ya que pueden ocasionar visión borrosa y discomfort cuando se secan sobre los párpados.

### 5.3.1. Vehiculización con ácido hialurónico

El ácido hialurónico resulta una opción muy interesante, ya que se comporta como un fluido no Newtoniano, es decir, su viscosidad depende del movimiento al que es sometido. La orientación al azar de sus moléculas y la interacción entre ellas hace que tenga alta resistencia y viscosidad a bajas tasas de cizallamiento, aportando propiedades protectoras; sin embargo, a altas tasas de cizallamiento, como ocurre durante el parpadeo, las moléculas se alinean en la dirección del movimiento ofreciendo menos resistencia y viscosidad, extendiéndose con facilidad en la superficie ocular. Esta pseudoplasticidad hace que las soluciones de ácido hialurónico sean confortables para el ojo a la vez que presentan una gran estabilidad y adhesión al epitelio corneal, simulando las características mucomiméticas de la lágrima y aumentando el tiempo de permanencia sobre la superficie ocular.

La solución de hialuronato de sodio se adhiere muy bien a la fracción de mucina de la lágrima precorneal debido a sus propiedades mucoadhesivas que, junto con su capacidad de retención de agua, hacen que actúe como un complejo estable en la superficie ocular. Esta capacidad de cobertura tiene un efecto protector que, combinado con un efecto directo, regulado por los receptores CD44, sobre la migración y proliferación celular, potencia los procesos de cicatrización (Miyachi et al. 1990; Alio et al. 2001; Aragona et al. 2002; Gomes et al. 2004). Por otro lado, el ácido hialurónico ha demostrado efectos antiangiogénicos, inmunosupresores, antiinflamatorios y antiapoptóticos a nivel tisular. La molécula de

hialuronato es principalmente hidrófila y muestra una fuerte afinidad con el agua, aunque también presenta áreas no polares que facilitan la unión con los lípidos. Las áreas polares y no polares se repelen entre sí, lo que hace que la molécula se expanda y ocupe un gran espacio tridimensional en forma de un ovillo flexible. Este espacio o “dominio” es de gran importancia en su comportamiento fisiológico. Las moléculas pequeñas, como el agua, los electrolitos y los nutrientes, pueden difundir libremente dentro de este dominio, pero las moléculas más grandes, como las proteínas o los factores de crecimiento, difunden de manera mucho más lenta. Esto permite su uso como sistema de liberación retardada de fármacos (Weindl et al. 2004; De la Fuente et al. 2008; Lajavardi et al. 2009). Esta propiedad del hialuronato de sodio lo hace muy útil como vehículo de los factores epiteliotróficos presentes en el suero autólogo, extendiendo la disponibilidad de los mismos y potenciando su efecto. Esto unido a su mayor estabilidad y persistencia en la superficie ocular en comparación con el suero fisiológico, permite reducir el número de instilaciones diarias del colirio.

Nuestro grupo ha estudiado cómo el ácido hialurónico puede actuar como agente viscosizante para el tratamiento con suero autólogo (López-García et al, 2014). En este estudio, se comprobó como la dilución del suero con hialuronato sódico no alteró la concentración de factores epiteliotróficos como EGF, TGF- $\beta$ , PDGF-AB y la albúmina, ni la viabilidad del suero en cultivos celulares, demostrando, por otro lado, que estos preparados eran mejor tolerados por los pacientes y tenían un mayor efecto a nivel de la superficie ocular que los preparados convencionales.

En este trabajo y para evidenciar esta propiedad del hialuronato de sodio, los pacientes instilaban gotas cada 8 horas, y solo tres pacientes (11,5%) tratados con

el preparado diluido con hialuronato mostraron la necesidad de administrar colirios con mayor frecuencia. En cambio, esta necesidad era la norma en los ojos tratados con el preparado diluido en solución salina. La dilución de suero autólogo con hialuronato de sodio se puede instilar cada 6 a 8 horas según la gravedad de la patología de base. Esta posología es compatible con estilos de vida activos y productivos, ya que permite que la mayoría de los pacientes se apliquen las gotas para los ojos en casa sin tener que hacer grandes esfuerzos para mantener las muestras a baja temperatura. El suero autólogo diluido con hialuronato de sodio era mejor tolerado por los pacientes. La mayoría prefirió continuar el tratamiento con esta preparación y su efecto sobre la estabilidad de la película lagrimal, la tinción con fluoresceína y rosa de bengala, BUT y metaplasia escamosa de la córnea y conjuntiva fueron significativamente mejores que los obtenidos con las preparaciones diluidas con solución salina.

Aunque son necesarios más estudios prospectivos, a la luz de los datos obtenidos en este trabajo, se puede afirmar que el suero autólogo mejora objetiva y subjetivamente los resultados clínicos de los pacientes con sequedad ocular. Esta mejora fue más evidente y significativa en los pacientes que utilizaron suero autólogo diluido con hialuronato de sodio. Por tanto, el hialuronato de sodio es un excelente vehículo para diluir el suero autólogo ya que proporciona un efecto directo sobre la superficie ocular y potencia la acción de los factores epiteliotróficos presentes en el suero, liberándolos gradualmente y aumentando su persistencia y efecto sobre la superficie ocular. Desde un punto de vista práctico, esto se traduce en un menor número de instilaciones, mejor efecto clínico y cumplimiento y menor interferencia de estos tratamientos con un estilo de vida activo.

### 5.3.2 Envases con filtros

La terapia con suero autólogo es muy bien tolerada por los pacientes. La aparición de complicaciones derivadas de su uso es excepcional (del Castillo et al, 2002) (Poon et al, 2001). Su principal inconveniente deriva de sus cualidades como fluido corporal y la necesidad de una preparación individualizada por tratarse de un producto autólogo. Para evitar la toxicidad en la superficie ocular, estas preparaciones no contienen conservantes, lo que conlleva riesgos potenciales de infección por contaminación microbiológica de la preparación (Lee & Chen, 2008).

Aunque la contaminación puede ocurrir en cualquier momento durante la preparación, lo más frecuente es que se deba a una manipulación incorrecta por parte de los pacientes o del responsable de la administración. Por lo tanto, estas muestras suelen estar contaminadas con bacterias oculares y perioculares, como *S. epidermidis* y otras especies de *Staphylococcus* coagulasa-negativas (Sauer et al, 2004) (García Jiménez et al, 2003) (Lagnado et al, 2004)

En el trabajo de Sauer et al. se estudió la contaminación de envases de colirio de suero autólogo en un entorno hospitalario y encontraron que 3 de 40 envases (7,5%) se contaminaron con *S. epidermidis* después de 7 días. Estos autores no encontraron ninguna contaminación de las muestras en el momento de la preparación ni en los colirios analizados 4 días después.

De igual forma, García Jiménez et al. no reportaron contaminación de las muestras obtenidas durante la preparación del colirio en medios de cultivo convencionales como agar sangre, agar chocolate y tioglicato; sin embargo, si informaron de tasas de contaminación cercanas al 30% en las muestras obtenidas tras 5 días de tratamiento domiciliario por parte de los pacientes.

Lagnado et al. en su estudio realizado en ambiente hospitalario, encontraron contaminación en 13 de 134 muestras (8,8%), 11 de las cuales (84,6%) se contaminaron por *S. epidermidis*.

Leite et al. reportaron contaminación en 6 de las 11 muestras estudiadas después de 30 días de uso (Leite et al, 2006), mientras que otros autores no encontraron contaminación en los envases devueltos por los pacientes (Creuzot-Garcher et al, 2004).

La inadecuada manipulación y el tiempo de uso de los envases son los principales factores implicados en la contaminación microbiológica de las muestras, aunque la contaminación disminuye considerablemente tras educar a los pacientes sobre el manejo adecuado de los envases. A pesar de esto, e independientemente de la frecuencia con la que se contaminan los envases de suero autólogo, el desarrollo de complicaciones oculares infecciosas es raro. El suero autólogo tiene un efecto beneficioso en la prevención de infecciones de la superficie ocular porque contribuye al desarrollo de los sistemas de barrera frente a los patógenos, al mejorar la estabilidad de la película lagrimal, la integridad epitelial de la superficie ocular y la expresión de mucina, y porque contiene componentes como inmunoglobulinas, factores del complemento y enzimas como la lactoferrina y lisozima que tienen una acción directa sobre los gérmenes o sus mecanismos de invasión (Geerling et al, 2004) (López-García et al, 2007). La mayoría de los microorganismos responsables de la contaminación de los colirios tienen un bajo poder patógeno a nivel de la superficie ocular, aunque si se pueden comportar como importantes patógenos intraoculares. Por esta razón, se debe tener cuidado en el uso de estos preparados después de procedimientos quirúrgicos como trasplante de córnea o cirugía de cataratas (Poon et al, 2001).

En concordancia con otros autores (García Jiménez et al, 2003) (Lagnado et al, 2004), nuestro estudio no encontró contaminación en las muestras estudiadas inmediatamente después de la preparación del colirio en la farmacia del hospital ni durante el seguimiento de las muestras no utilizadas en terapia, mantenidas en el frigorífico a 4°C durante 2 meses. Esto confirma que la contaminación ocurre raramente durante la preparación de los colirios o durante el almacenamiento refrigerado.

De los 128 envases utilizados durante una semana en terapia domiciliaria, 37 (28,9%) estaban contaminados en el momento del análisis, siendo los *Staphylococcus coagulasa* negativos los gérmenes más frecuentemente encontrados (48,6%). Es importante recalcar que la mayoría de las muestras contaminadas pertenecían a sólo 3 pacientes; de sus 26 envases, 22 estaban contaminados por gérmenes como *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Candida*, *Pseudomonas* y *Enterobacterias*. En los 102 envases restantes, se encontró contaminación por *S. aureus* en sólo 1 caso; el resto de las muestras contaminadas, lo estaban por *Staphylococcus coagulasa*-negativos, habitual en la flora saprófita. Si se excluyen estos 3 pacientes, la tasa de contaminación disminuye al 14,7%, resultado mucho mejor que lo reportado previamente con respecto a las terapias domiciliarias con suero autólogo (García Jiménez et al, 2003). No se encontraron diferencias en cuanto a la contaminación en función del tiempo de permanencia de los envases en el frigorífico después de su uso, relacionándose dicha contaminación únicamente con el tiempo de uso y manipulación.

El estudio microbiológico de los 14 envases convencionales utilizados en el hospital mostró una tasa de contaminación menor que la encontrada en los

envases de pacientes ambulatorios. Ninguno de los envases se contaminó tras 1 semana de tratamiento, 2 envases (14,3%) se contaminaron tras 2 semanas y 7 envases (50%) permanecieron sin contaminar tras 1 mes de tratamiento. En todos los casos, la contaminación fue resultado de gérmenes saprofitos y aumentó con el tiempo de uso, independientemente del manejo adecuado de los envases.

Nuestro estudio encontró una tasa de contaminación del 2,1% después de 1 mes de tratamiento con envases con filtros adaptados. No se han encontrado referencias en la literatura publicada con respecto a la contaminación de este tipo de envase; por tanto, estos resultados serían los primeros recogidos en este campo. Si se comparan estos resultados con los obtenidos con envases convencionales, la contaminación disminuye notablemente al utilizar filtros adaptados ( $P = 0,002$ ). En el caso de los envases convencionales, la tasa de contaminación fue del 28,9% de las muestras estudiadas a los 7 días de uso (14,7% si se excluyen los 3 pacientes mencionados anteriormente), mientras que solo el 2,1% de las muestras de envases con filtros adaptados presentaron contaminación después de 1 mes de tratamiento.

Es posible adaptar diferentes tipos de filtros según el envase empleado en la preparación del suero autólogo. Nuestro grupo ha utilizado filtros tipo membrana (millipore GVWP) y filtros Millex-GV con membrana durapore introducidos en el interior del dispositivo de salida del envase dosificador; sin embargo, en la práctica estos filtros no han resultado muy útiles dada la poca superficie de contacto que ofrecen, teniendo que ejercer mucha presión sobre el envase para poder extraer el contenido.

Más práctica resulta la utilización de colirios comercializados que llevan adaptados filtros, como el envase abak patentado por Laboratorios Thea. Estos filtros evitan la contaminación retrógrada del contenido del envase por lo que, a pesar de no llevar conservantes, estos preparados pueden ser utilizados hasta 8 semanas después de su apertura sin riesgo de contaminación (información del fabricante). Nosotros hemos utilizado los envases de Hyabak® (hialuronato sódico al 0,15%, Thea, Clermont-Ferrand, France) para preparar el suero autólogo.

El proceso de elaboración y preparación es similar al del suero autólogo convencional, con la diferencia de que utilizamos el hialuronato sódico contenido en el envase de hyabak (5 ml en envases promocionales) para diluir el suero autólogo. Para prepararlo se introducen 1,25 ml de suero dentro del envase de hyabak, obteniendo 6,25 ml de suero autólogo diluido al 20%.

Introducir suero autólogo en un recipiente Abak sin dañar el filtro resulta fácil si se toman unas sencillas precauciones. En tanto que el suero tiene que ser introducido a presión dentro del envase, es importante utilizar una cánula que ocupe toda la luz del dispositivo de salida, pero que no penetre más 6-7 mm de la longitud del extremo aplicador con el fin de no perforar el filtro e invalidar el efecto del mismo. Las agujas intravenosas (20 G) son útiles para este fin, pudiendo utilizar también unas cánulas romas del mismo grosor que evitan el riesgo de pinchazos accidentales del personal que manipula y prepara estos colirios (Medtronic Xomed, Inc. Jacksonville, FL 3221. USA).

La introducción del suero ha de realizarse de forma lenta y aplicando una presión mantenida con el fin de no saturar el filtro. Para evitar cierto reflujo de suero que se produce tras su introducción y que podría alterar la concentración del preparado, conviene realizar antes de la introducción de éste una leve presión

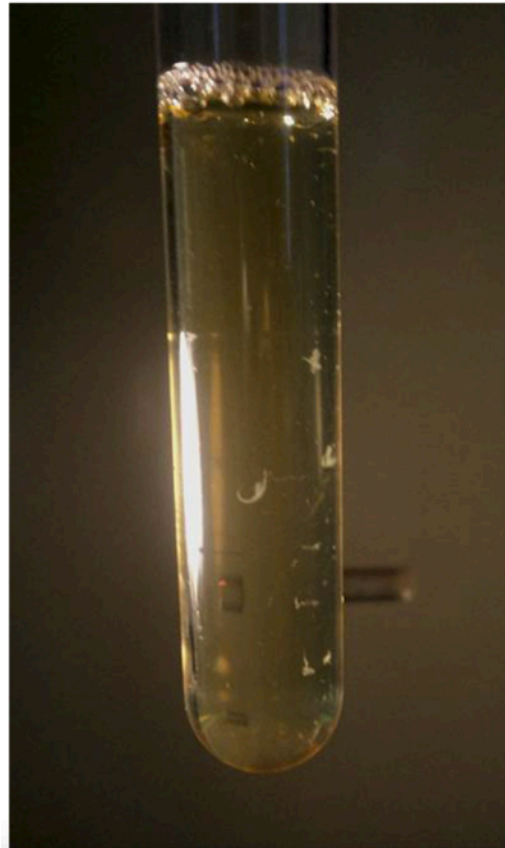
sobre el envase extrayendo aire del contenido y generando una presión negativa que, además, facilita la entrada del suero dentro del envase.

El juego de presiones en estos envases es muy importante, siendo ésta similar a ambos lados del filtro. El sistema de filtración de este envase consta de 2 estructuras: una interna microporosa y una membrana más externa tipo millipore con un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , hecha de polietersulfona.

La estructura interna microporosa es hidrófoba e impide que la solución empape y atraviese la membrana. El tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  de la membrana externa impide el paso de bacterias (su tamaño oscila entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ ), a la vez que permite el paso de gases incluso cuando está húmeda. Esto facilita la entrada de aire para compensar la pérdida de presión dentro del envase cuando se aplica el colirio. Cuando las paredes del recipiente se comprimen, la presión en su interior aumenta y la solución pasa por el sistema de filtración, formando gotas. Cuando se retira la presión, las paredes del recipiente tienden a volver a su posición original, generando una presión negativa que facilita el acceso del aire y la reabsorción de la solución que queda en la luz del tubo y en el filtro. Este mecanismo minimiza el riesgo de contaminación ya que las bacterias no pueden atravesar el filtro externo y se quedan en un área que se seca tan pronto como el aire regresa.

Por otro lado, la utilización de filtros evita el paso de pequeños precipitados (probablemente de fibrina) que en ocasiones encontramos tras la descongelación o refrigeración de las muestras. Estos precipitados son más llamativos en muestras descongeladas que en refrigeradas, siendo menos evidentes cuando utilizamos filtros millipore en la preparación e imperceptibles en muestras frescas. En condiciones normales, estos precipitados son muy finos, casi indetectables,

estando en relación con un menor tiempo de coagulación que podría explicar la presencia de fibrinógeno u otras proteínas plasmáticas que precipitan por el efecto del frío (figura 34).



**Figura 34. Precipitados en solución de suero autólogo diluido con hialuronato de sodio después de la descongelación.**

Por otra parte, el uso de los filtros Millipore disminuye la concentración de factores de crecimiento de tamaño grande, como el TFG- $\beta$ , con acciones inhibitoras, sin ningún efecto sobre el resto de factores de crecimiento de menor tamaño. Estos filtros tienen una baja capacidad de adsorción de proteínas, es decir, retienen muy pocas moléculas después del filtrado. Por tanto, son útiles para filtrar

productos biológicos, al no provocar variaciones en la concentración de factores de crecimiento u otras proteínas esenciales. En nuestra experiencia, el uso de filtros no reduce la concentración de EGF ni de PDGF, pero sí disminuye la concentración del TFG- $\beta$  (López-García JS, datos no publicados, septiembre de 2011).

Nuestro estudio se hizo utilizando envases de Hyabak de 5 ml (envases promocionales suministrados por el fabricante). Estos envases dispensan gotas de 30 microlitros, lo que supone obtener aproximadamente 200 gotas de 6,25 ml del preparado. Si la instilación se realiza cada 6 o 8 horas en ambos ojos, se puede cubrir un mes de tratamiento con cada envase. De esta forma se mejora la dosificación y se reducen los riesgos de contaminación.

Con los envases comerciales Hyabak (10 ml), se podría utilizar una mayor cantidad de la preparación. Aun así, no es conveniente utilizar estos productos durante más de 1 mes, ya que ese es el período de estabilidad de los componentes epiteliotróficos del suero autólogo a 4°C (Tsubota et al, 1999b).

En resumen, los envases con filtros adaptados disminuyen significativamente los índices de contaminación y permiten el uso de estos colirios hasta 4 semanas, asumiendo un menor riesgo de contaminación que con la terapia convencional. La vehiculización del suero autólogo en ácido hialurónico y el empleo de envases con filtros que eviten la contaminación del preparado optimizan de forma significativa el tratamiento con suero autólogo respecto a la terapia tradicional con estos preparados disminuyendo el número de extracciones y cantidad de sangre necesaria para su preparación.

#### 5.4. Condiciones de almacenamiento

Ambos procedimientos (vehiculización con ácido hialurónico y envases con filtro) mejoran la vida útil de estos preparados al tiempo que reducen la cantidad de suero necesaria para el tratamiento. Sin embargo, estos buenos resultados, también plantearon varias preguntas sobre cuánto tiempo permanecen estables los factores epiteliotróficos en diferentes condiciones como congelación, refrigeración y si existen diferencias entre el suero autólogo diluido con solución salina o hialuronato de sodio.

##### 5.4.1 Congelación

Actualmente, se considera la congelación como la mejor manera de conservar los hemoderivados.

Trabajos anteriores han demostrado que algunos de estos factores permanecen estables a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 6 meses (Fischer et al, 2012), sin embargo, otros estudios han objetivado una disminución leve de los niveles de TFG- $\beta$ 1 tras 6 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Phasukkijwatana et al, 2011). Nuestro grupo demostró como factores epiteliotróficos como el EGF, TGF-beta, PDGF y albúmina permanecían estables tras 9 meses de congelación (López-García et al, 2016).

En la práctica clínica habitual, se proporciona a los pacientes un número adecuado de envases que deben conservar en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ , mientras el envase que tienen en uso se debe mantener en el frigorífico a  $4^{\circ}\text{C}$ . En este sentido, es muy interesante investigar cuánto tiempo permanecen estables los factores

epiteliotróficos bajo diferentes condiciones de almacenamiento y evaluar si el almacenamiento a largo plazo a  $-20^{\circ}\text{C}$  puede terminar reduciendo la eficacia de la terapia con colirios de suero autólogo.

Extender el intervalo de almacenamiento simplifica la logística y reduce el costo de producción para el proveedor de atención médica que prepara y dispensa las gotas de suero autólogo a pacientes con patologías que requieren tratamientos crónicos.

En este trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de EGF, TFG- $\beta$ 1, PDGF-AB y albúmina entre las muestras frescas analizadas inmediatamente tras su preparación y la muestra analizada tras estar congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 3 meses. En trabajos previos, y siguiendo la misma metodología de preparación y conservación del suero autólogo, hemos encontrado como la concentración de los factores de crecimiento no se altera de forma estadísticamente significativa tras permanecer la muestra congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 9 meses, ni en muestras estudiadas inmediatamente tras la descongelación ni durante un mes tras la descongelación, manteniendo el suero en el frigorífico a  $4^{\circ}\text{C}$ . En todas estas determinaciones, las concentraciones de los factores de crecimiento fueron similares a las reportadas previamente, además de estar dentro del rango de valores esperados proporcionados por el fabricante.

Estos resultados son difíciles de comparar con otros trabajos publicados porque la dilución del suero y el método para medir la concentración de los factores de crecimiento varían según el estudio específico. Sin embargo, la concentración de albúmina, que actúa como control interno, se mantuvo estable durante todo el estudio, siendo indicativo de la integridad de las muestras. De esta manera, estamos de acuerdo con Fischer et al. en que la concentración de albúmina puede

ser un buen marcador para validar la calidad del suero después del almacenamiento (Fischer et al, 2012).

En cuanto a la actividad sobre la proliferación y diferenciación de células epiteliales corneales y conjuntivales del suero descongelado, en el trabajo actual es un elemento que no se ha estudiado y por ello no se deben obtener conclusiones. No obstante, en nuestro estudio de 2016 no se objetivaron diferencias respecto a los cultivos tratados con suero fresco por lo que, cabría esperar, que tampoco existiesen diferencias en la comparación con liofilizado (López García et al., 2016).

En resumen, el almacenamiento a largo plazo a  $-20^{\circ}\text{C}$  permite optimizar la producción de suero autólogo al reducir la frecuencia y cantidad de sangre necesaria para su preparación sin que se aprecie una disminución en la eficacia de esta terapia.

En nuestra práctica clínica habitual, 40ml de sangre extraída nos permiten obtener entre 18 y 20ml de suero, con los que se pueden preparar de 8 a 9 envases con filtro (10 ml) con suero autólogo al 20% diluido con hialuronato de sodio. Cada uno de estos envases se puede guardar congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 9 meses. Y el envase que está en uso se puede usar durante un mes si se mantiene refrigerado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Por lo que, si utilizamos una gota cada 4 a 6 horas, el contenido del envase debe durar un mes completo, y de esta forma podemos tratar a un paciente durante 8 a 9 meses con una única extracción de sangre de 40 ml.

Esto supone una optimización muy importante de la terapia. Aun así, no siempre es fácil mantener el producto a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Si por alguna causa se pierde la

cadena del frío y el suero autólogo se descongela, no se puede volver a congelar y por lo tanto se pierde todo el tratamiento correspondiente a 8 o 9 meses.

Además, no en todos los ámbitos se puede tener acceso a las estrictas condiciones de almacenamiento que requiere el suero autólogo congelado.

### 5.4.2 Liofilización

En la búsqueda de nuevos sistemas de almacenamiento, resulta interesante investigar si procesos como la liofilización, que no requiere unas estrictas condiciones de almacenamiento, pueden mantener estables las concentraciones y las propiedades biológicas de los factores de crecimiento contenidos en el suero.

La liofilización es un método de deshidratación por congelación que se utiliza en una amplia variedad de aplicaciones en la industria alimentaria, tecnológica y farmacéutica. Consiste en congelar el producto y bajar la presión circundante, eliminando el agua congelada contenida en el producto mediante sublimación. Es una forma excelente de conservar elementos sensibles al calor como proteínas, enzimas, tejidos y componentes sanguíneos. Las bajas temperaturas utilizadas en el proceso preservan las propiedades químicas y minimizan el daño a estos productos.

La liofilización es un método eficaz para mejorar la estabilidad de las proteínas en los productos que requieren un almacenamiento prolongado. No precisa condiciones estrictas de almacenamiento y resulta fácil de usar después de la reconstitución. En estudios previos ha demostrado su efectividad y es habitualmente utilizada para conservar numerosos hemoderivados (Li et al, 2000) (Chen et al, 2018) (Acker et al, 2016).

En 2018, Chen et al. informaron sobre cómo la liofilización del lisado de plaquetas humanas no sólo permite mantener la concentración de sus factores de crecimiento, sino que también permite que éstos conserven sus propiedades bioquímicas.

En nuestro estudio, hemos encontrado unos resultados similares con el suero autólogo liofilizado.

No hemos apreciado diferencias significativas en las concentraciones de EGF, TGF- $\beta$ , PDGF-AB o albúmina en las muestras frescas estudiadas inmediatamente tras la preparación comparándolas con las concentraciones de los mismos factores de crecimiento en el suero estudiado inmediatamente tras la reconstitución a partir de suero liofilizado. Además, encontramos que, al igual que en las muestras de suero fresco, la concentración de estos factores de crecimiento permaneció estable durante 4 semanas tras la reconstitución manteniendo estas muestras refrigeradas a 4°C.

En nuestro trabajo la concentración de los factores de crecimiento fue similar a las reportadas previamente por nuestro grupo de trabajo y en todos los casos dentro de los rangos de los valores esperados proporcionados por los fabricantes.

En la misma línea, nuestro estudio mostró estabilidad en la concentración de albúmina tras la liofilización. Estudios previos han mostrado cómo la concentración de albúmina puede servir como marcador para validar la calidad del suero autólogo tras su procesamiento, ya que actúa como un óptimo control interno que indica integridad de las muestras (López-García et al, 2016). En la práctica clínica, la transparencia y el aspecto amarillento del suero líquido después de la rehidratación pueden servir como indicador de la calidad del suero.

No hemos encontrado diferencias significativas en los efectos epiteliotróficos del suero liofilizado sobre cultivos de células corneales y conjuntivales comparados con los obtenidos con suero fresco. Sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la proliferación y diferenciación de células epiteliales entre cultivos enriquecidos con suero (fresco o liofilizado) y cultivos convencionales no enriquecidos con suero. En este trabajo, las células epiteliales cultivadas en medio enriquecido con suero mostraron un aumento de aproximadamente 15-20% en la diferenciación y proliferación celular comparado con el cultivo celular en medio convencional no enriquecido. Estudios previos ya habían demostrado como el suero autólogo mejora la diferenciación y la proliferación de células epiteliales cultivadas (López-García et al, 2016) (Tsubota et al, 1999a y 1999b) (Phasukkijwatana et al, 2011).

Por otra parte, no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la densidad, pH y osmolaridad entre el suero fresco y el liofilizado. De acuerdo con estos resultados, el proceso de liofilización no altera las propiedades reológicas y químicas del suero. Se debe ser cuidadoso en el almacenamiento del suero liofilizado, colocándolo en recipientes cerrados para evitar la rehidratación y oxidación del producto debido a su alta higroscopicidad.

La liofilización es ampliamente reconocida como una forma excelente de preservar productos biológicos. Sin embargo, no existe un método universal válido para todo producto. La liofilización de cada preparado requiere el diseño de un proceso de trabajo, o ciclo de liofilización, diferente según sus características. El ciclo ideal debe determinarse experimentalmente para caso. En general, podemos

actuar sobre tres parámetros: temperatura, presión y tiempo. La modificación de cualquiera de estos parámetros afecta a los otros dos, por lo que han de tenerse en consideración de forma conjunta para modificar u optimizar el proceso de trabajo.

Hay 2 fases fundamentales en la liofilización: la congelación y el secado primario.

El paso de la congelación es muy importante y determina significativamente la calidad del producto final. La temperatura óptima de congelación debe establecerse empíricamente para cada producto y la velocidad a la que se alcance la temperatura determinará el tamaño de los cristales. Una congelación lenta produce cristales grandes mientras que una congelación rápida produce cristales pequeños. Los cristales grandes son más fáciles de secar, pero con ellos es más fácil que se dañen las membranas celulares.

En el caso del suero autólogo, al no contener células, esto no suponía un problema, por lo que el producto se congeló lentamente a una temperatura previamente determinada de  $-45^{\circ}\text{C}$ . Habitualmente, la temperatura de congelación varía entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ . Chen y sus colaboradores (Chen et al, 2018) congelaron los lisados de plaquetas a  $-60^{\circ}\text{C}$ , mientras que otros autores como Zhang y colaboradores (Zhang et al, 2017) congelaron la fibrina rica en plaquetas a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

En el paso de secado primario, la baja presión facilita la sublimación del agua. Aunque Chen y colaboradores usaron fases de secado de 10-12 horas (Chen et al, 2018), en nuestro trabajo se usó un programa de secado muy lento (72 horas).

Es conocido que el estrés generado durante los procesos de congelación y deshidratación puede provocar cambios en la estructura de las proteínas (Griebenow & Klibanov, 1995). Para evitarlo, se ha propuesto el uso de diferentes

disacáridos como estabilizadores para prevenir la desnaturalización proteica (Zhao et al, 2013) (Kasper et al, 2011). La Trehalosa es el disacárido más utilizado como estabilizador en la práctica habitual por sus excelentes propiedades protectoras (Lins et al, 2004) (Ohtake & Wang, 2011).

En nuestro trabajo no se empleó ningún estabilizador ya que usamos una baja temperatura de congelación (-45°C) y una baja presión durante el proceso de secado (0,1 mbar) lo que conllevaba un proceso de secado muy lento (72 horas) y con mínimos efectos sobre la estructura de las proteínas, como se objetivó en las pruebas preliminares realizadas en el laboratorio (Resultados no publicados).

### 5.4.3 Comparación congelación / liofilización

Actualmente la congelación es el Gold estándar en la conservación del suero autólogo. En este trabajo, y aunque no era uno de nuestros objetivos principales, podemos hacer una comparación diferida entre ambos tipos de conservación. Para ello, una de las alícuotas fue congelada 3 meses y posteriormente descongelada y estudiada su concentración inmediatamente tras la descongelación, así como 15 y 30 días después. Con esto, pretendimos estudiar la concentración de factores y sus efectos biológicos con la misma muestra de sangre con la que hacíamos el estudio del suero liofilizado. Al ser los resultados obtenidos similares en ambos tipos de preparados, podemos hacer extensible estos datos a los obtenidos por nuestro grupo en trabajos previos en los que el procedimiento de preparación del suero autólogo fue exactamente el mismo y en donde estudiamos durante un periodo más largo los efectos de la congelación sobre el suero autólogo.

Para la comparación con muestras de suero descongelado se emplearon datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo en estudios previos (López-García et

al, 2016). En ambos trabajos, la preparación del colirio de suero autólogo se realizó de forma similar siguiendo los protocolos descritos de venopunción y de preparación del colirio, obteniéndose alícuotas de colirio de suero autólogo diluido al 50% con solución salina, que en un caso fueron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1,3,6 y 9 meses y analizadas inmediatamente tras la descongelación, y en el otro caso fueron liofilizadas y estudiadas inmediatamente tras la reconstitución del preparado. En el trabajo del año 2016, se compararon las concentraciones de factores de crecimiento y sus efectos biológicos entre muestras en fresco y muestras descongeladas sin encontrar diferencias significativas. En este trabajo, la comparación la hacemos entre muestras frescas y muestras de suero reconstituidas tras liofilización. Como punto de unión con el trabajo anterior, una de las alícuotas se congeló durante tres meses y en ellas se determinaron las concentraciones de factores de crecimiento inmediatamente tras la descongelación y 15 y 30 días después. Como era de esperar, no encontramos diferencias significativas en las concentraciones de los factores determinados entre las muestras estudiadas en el anterior y en el presente estudio, lo que nos permite poder establecer paralelismos entre muestras de suero fresco, suero descongelado y suero liofilizado

En ambos casos, las determinaciones cuantitativas de EGF, TGF- $\beta$ 1 y PDGF-AB se realizaron mediante ELISA, usando los mismos test específicos para cada factor de crecimiento. De la misma forma, la concentración de albúmina se determinó mediante colorimetría en un autoanalizador Cobas Integra 400 plus.

En paralelo se estudiaron la proliferación y la diferenciación de cultivos de células epiteliales corneales y conjuntivales, de forma similar a la realizada en el estudio del suero liofilizado, comparando el comportamiento de las células

incubadas en un medio de cultivo específico para células epiteliales con el comportamiento de las células incubadas en ese mismo medio enriquecido con suero autólogo descongelado. En el estudio del suero liofilizado se empleó una dilución del 10% mientras que en el del suero descongelado la concentración del suero fue del 20%. En estudios previos, no encontramos diferencias significativas en cuanto a la proliferación, migración y diferenciación en cultivos celulares entre suplementaciones de suero autólogo al 10 o 20% (estudios no publicados). Las muestras corneales y conjuntivales fueron obtenidas, procesadas, preparadas e incubadas de la misma manera a las descritas en el estudio del suero liofilizado.

El análisis de la proliferación celular fue cuantificada mediante microscopía robotizada por fluorescencia de EdU y por observación directa con el microscopio de fase invertida, en los días 0, 1, 3 5 y 7 tras la siembra de las células en los cultivos y la diferenciación celular se evaluó con estudio de la inmunofluorescencia de CK-19 para células conjuntivales y CK-3 para células corneales, de la misma manera en la que se procedió en el estudio del suero liofilizado.

Además de todas estas similitudes en la preparación de ambos trabajos, el procedimiento fue realizado por las mismas personas y en el mismo laboratorio, por lo que se puede concluir que los datos obtenidos de ambos estudios son perfectamente comparables.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de EGF, TGF- $\beta$ 1, PDGF-AB y albúmina entre las muestras de suero autólogo descongelado y las muestras de suero autólogo reconstituido tras liofilización.

Tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar la concentración de cada uno de los factores de crecimiento en las muestras estudiadas a los 15 y 30 días desde su descongelación o desde su reconstitución respectivamente.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la densidad, la osmolaridad y el pH, entre muestras de suero descongelado y suero liofilizado estudiado inmediatamente tras la reconstitución ni a los 15 y 30 días.

En cuanto a la proliferación y la diferenciación celular los resultados fueron similares tanto para cultivos enriquecidos con suero autólogo descongelado como con suero reconstituido tras la liofilización.

El aumento de la proliferación celular determinado por EdU en el cultivo enriquecido con suero autólogo descongelado fue del  $18,5 \pm 2,7\%$  en comparación con el medio no suplementado. En el caso del suero autólogo liofilizado, este aumento fue del  $15,4 \pm 2,3\%$  para la proliferación de las células corneales y del  $18,1 \pm 2,5\%$  para las células conjuntivales. La adición de ambos tipos de suero mejoró la proliferación y dispersión de las células epiteliales corneales y conjuntivales in vitro.

El área de células epiteliales mostró un incremento en los cultivos enriquecidos con suero autólogo congelado y suero autólogo liofilizado en comparación con los cultivos convencionales no enriquecidos, sin que hubiese diferencias estadísticamente significativas entre suero descongelado y liofilizado. En el caso de las células corneales este incremento sobre los cultivos convencionales fue de  $21,5 \pm 3,2\%$  en el caso del suero descongelado y de  $20,3 \pm 2,7\%$  en el caso del suero liofilizado. En el caso de los cultivos de células

conjuntivales, estos incrementos fueron del  $24.3 \pm 3.4\%$  para el suero descongelado y de  $23.5 \pm 3.1\%$  en el caso del suero liofilizado.

En cuanto a la diferenciación celular, los cultivos enriquecidos con suero descongelado mostraron un aumento en la inmunotinción de CK-3 y CK-19 frente a cultivos convencionales de  $16,4 \pm 1,8\%$  y  $18,4 \pm 1,6\%$  respectivamente. Mientras que los cultivos enriquecidos con suero liofilizado mostraron un aumento de  $16.6 \pm 1.6\%$  (CK-3) y  $17.6 \pm 1.8\%$  (CK-19) frente a medios convencionales.

Esta similitud entre las concentraciones de los diferentes factores de crecimiento presentes en el suero, así como la estabilidad que muestran dichos factores a lo largo del mes tras su descongelación o su reconstitución, nos permiten concluir que la liofilización preserva los factores de una forma similar a la congelación, actual Gold estándar en la conservación del suero autólogo.

En cuanto al efecto biológico, también encontramos datos de proliferación y diferenciación de las células epiteliales corneales y conjuntivales similares entre ambos tipos de suero, pese a que la dilución del suero descongelado era del 20% y la del suero liofilizado era del 10%. Sí encontramos un mayor crecimiento de fibroblastos en las muestras cuando la concentración del suero era del 20%. El hecho de que en la práctica clínica habitual se utilice una concentración de suero autólogo del 20% es algo empírico, pues en realidad no se han encontrado diferencias significativas entre la migración de células epiteliales en cultivos in vitro entre preparados al 10 o al 20% (Tsubota et al, 1999b). Algunos otros autores sí han reportado mayores efectos sobre la superficie ocular al aumentar la concentración del suero (Noble et al, 2004) (Poon et al, 2001), llegando a usar concentraciones del

50% y del 100%. En cualquier caso, lo más estandarizado es la utilización del suero autólogo a una concentración del 20%, ya que esta parece suficiente y evita las molestias derivadas de la mayor viscosidad de preparados más concentrados y disminuye considerablemente el número de extracciones de sangre.

Podemos concluir que la liofilización puede ser un método de conservación tan válido como la congelación para el colirio de suero autólogo, permitiendo además unas condiciones sencillas de mantenimiento y siendo fácil de reconstituir por el propio paciente.

Aunque serán necesarios más estudios prospectivos para optimizar los ciclos de liofilización, pensamos que la liofilización facilita la gestión logística de esta terapia y podría potencialmente ser utilizada en la práctica clínica estándar, especialmente en pacientes en los que existen dificultades en la extracción de sangre o en aquellos casos en los que no se puedan garantizar las condiciones óptimas de almacenamiento térmico.

Este trabajo muestra que las propiedades del suero autólogo permanecen inalteradas con la liofilización, presentando una concentración similar de factores de crecimiento y efectos biológicos similares a los del suero fresco. El suero liofilizado se puede almacenar y reconstituir fácilmente manteniendo las propiedades químicas, biológicas, físicas y organolépticas del suero autólogo convencional.

## 6. CONCLUSIONES

---

Teniendo en cuenta los objetivos específicos que nos planteamos al inicio de nuestro trabajo, podemos concluir que:

1. No hay diferencias estadísticamente significativas en la concentración de los factores de crecimiento estudiados entre las muestras de suero fresco y muestras de suero liofilizado.

2. La concentración de factores de crecimiento permaneció estable durante el tiempo del estudio tanto en muestras de suero liofilizado como en muestras de suero fresco.

3. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la concentración de los factores de crecimiento estudiados entre muestras de suero liofilizado y muestras de suero congelado.

4. No encontramos diferencias significativas entre los efectos biológicos en cultivos celulares entre muestras de suero autólogo fresco y suero reconstituido tras la liofilización.

5. Los valores de pH y osmolaridad no presentaron diferencias significativas entre muestras de suero autólogo fresco y liofilizado.

6. Los resultados óptimos de liofilización del suero los conseguimos con una congelación lenta a  $-45^{\circ}\text{C}$ , una baja presión de 0.1mBar y un programa de secado lento de 72 horas.

7. La utilización de filtros esterilizantes en los colirios redujo considerablemente la contaminación de estos envases en relación con los envases convencionales. Sólo un 2.1% de los envases con filtro estuvieron contaminados tras un mes de uso frente al 29% de contaminación que encontramos en los envases convencionales tras sólo una semana de utilización.

8. La contaminación de envases convencionales en terapia hospitalaria fue significativamente menor que en el caso de la terapia domiciliaria. No hubo ningún envase contaminado tras una semana de uso, mientras el 50% de estos mostró contaminación tras un mes de utilización.

9. No encontramos ningún caso de contaminación en envases preparados en farmacia y no utilizados en clínica, ni en el momento de la preparación ni tras dos meses de su preparación.

10. Los principales microorganismos implicados en la contaminación de los envases fueron *Staphylococcus coagulasa negativos* (48,6%), siendo el principal de ellos el *Staphylococcus epidermidis*.

Los resultados obtenidos en nuestros estudios nos permiten confirmar tanto nuestra primera hipótesis, la liofilización y posterior reconstitución no alteran la concentración ni la actividad biológica de los factores de crecimiento presentes en el suero autólogo, como la segunda, pues los envases con filtro adaptado disminuyen el riesgo de contaminación y permite alargar la vida útil del colirio de suero autólogo.

De esta forma creemos cumplido el objetivo general de la presente tesis doctoral que era optimizar la terapia con suero autólogo.



**Bibliografía:**

---

(Abelson et al, 1981) Abelson MB, Udell IJ, Weston JH. Normal Human Tear pH by Direct Measurement. *Arch Ophthalmol*. 1981;99(2):301.

(Acker et al, 2016) Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality assessment of established and emerging blood components for transfusion. *J Blood Transfus* 2016 ;2016:4860284

(Alió et al, 2001) Alió JL, Belda JL, Shalaby A. Correction of irregular astigmatism with excimer laser assisted by sodium hyaluronate. *Ophthalmology*. 2001;108: 1246–1260.

(Alió et al, 2012) Alió JL, Arnalich-Montiel F, Rodriguez AE. The role of “eye platelet rich plasma” (E-PRP) for wound healing in ophthalmology. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13:1257–1265.

(Anderson & Regillo, 2004) Anderson G, Regillo C. Ocular manifestations of graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2004; 15: 503-507

(Alvarado et al, 2004) Alvarado MC, Martinez JJ, Borrás J, et al. Tratamiento de defectos epiteliales persistentes mediante suero autólogo. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2004; 79:537-42.

(Aragona et al, 2002) Aragona P, Di Stefano G, Ferreri F, Spinella R, Stilo A. Sodium hyaluronate eye drops of different osmolarity for the treatment of dry eye in Sjogren’s syndrome patients. *Br J Ophthalmol* 2002;86: 879–884.

- (Argueso, 2013) Argueso, P. Glycobiology of the ocular surface: mucins and lectins. *Jpn J Ophthalmol*, 2013 57(2):p. 150-155.
- (Baker, 1981) Baker, MN. *The Quest for Pure Water: the History of Water Purification from the Earliest Records to the Twentieth Century*. 2nd Edition. 1981;Vol. 1. Denver, Co.: American Water Works Association.
- (Beebe & Masters, 1996) Beebe Dc, Masters B. Cell lineage and the differentiation of corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. 37: p. 1815-1825.
- (Bell et al, 1986) Bell GI, Fong NM, Wornstead MA, et al. Human epidermal growth factor precursor: cDNA sequence, expression in vitro and gene organization. *Nucleic Acid Res*. 1986;14:8427-46
- (Benedict & Manning, 1905) Benedict, F. G., Manning, C. R. The determination of water in foods and physiological preparations. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1905; 13(3), 309–329.
- (Benítez del Castillo et al, 2001) Benítez del Castillo JM, del Río T, Iradier MT, Hernández JL, Castillo A, García-Sánchez J. Decrease in tear secretion and corneal sensitivity after LASIK. *Cornea* 2001; 20: 30- 2.
- (Benítez del Castillo et al, 2002) Benítez del Castillo JM, de la Casa JM, Sardina RC, Fernandez RM, Feijoo JG, Gomez AC, et al. Treatment of recurrent corneal erosions using autologous serum. *Cornea* 2002; 21: 781-783.
- (Bergsten et al, 2001) Bergsten E, Uutela M, Li X, et al. PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF-beta receptor. *Nat Cell Biol*. 2001;3:512-6.

(Berlau et al, 2002) Berlau J, Stave J, Oriwol C, et al. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas: a study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg*, 2002. 28: p. 611-616.

(Bick & Davidson, 1974) Bick MD, Davidson RK. Total substitution on Bromodeoxyuridine for Thymidine in the DNA of a Bromodeoxyuridine-Dependent Cell Line (mammalian cells). *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. 1974;71(5):2082-2086

(Bradley et al, 2009) Bradley JC, Simoni J, Bradley RH, McCartney DL, Brown SM. Time and temperature-dependent stability of growth factor peptides in human autologous serum eye drops. *Cornea* 2009;28:200–205.

(Bode & Fischer, 2007) Bode AP, Fischer TH. Lyophilized platelets: fifty years in the making. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007;35: 125–133.

(Borderie et al, 1999) Borderie VM, Mourra N, Laroche L. Influence of fetal calf serum, fibroblast growth factors, and hepatocyte growth factor on three-dimensional cultures of human keratocytes in collagen gel matrix. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237: 861-869.

(Botelho, 1964) Botelho SY. Tears and the lacrimal gland. *Sci Am* 1964;211:78–86.

(Can et al, 2002) Cao R, Brakenhielm E, Li X, et al. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR- $\alpha\alpha$  and  $\alpha\beta$  receptors. *FASEB J*. 2002;16:1575-83.

(Cavanagh & Colley, 1989) Cavanagh HD, Colley AM. The molecular basis of neurotrophic keratitis. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989; 192: 115-34.

(Chen et al, 2003) Chen W, Yamaki K, Sakuragi S, et al. Wistar rat palpebral conjunctiva contains more slow-cycling stem cells that have larger proliferative capacity: implication for conjunctival epithelial homeostasis. *Jpn J Ophthalmol*, 2003. 47: p. 119-128.

(Chen et al, 2018) Chen LW, Huang CJ, Tu WH, et al. The corneal epitheliotropic abilities of lyophilized powder form human platelet lysates. *PLoS One* 2018;13:e0194345.

(Cher, 2008) Cher I. A new look at lubrication of the ocular surface: fluid mechanics behind the blinking eyelids. *Ocul Surf* 2008;6:79–86.

(Choi et al, 2001) Choi CW, Kim BS, Seo JH, Shin SW, Kim YH, Kim JS. Long-term engraftment stability of peripheral blood stem cells cryopreserved using the dump-freezing methods in a 80 °C mechanical freezer with 10% dimethyl sulfoxide. *Int J Hematol* 2001;73:245–250.

(Clark et al, 1994) Clark JB., Hastie, JW, Kihlborg, LE, Metselaar, R, Thackeray, MM. Definitions of terms relating to phase transitions of the solid state (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*. 1994; 66(3), 577-594.

(Collins et al, 1994) Collins MK, Perkins GR, Rodriguez-Tarduchy G, Nieto MA, Lopez-Rivas A. Growth factors as survival factors : regulation of apoptosis. *Bioessays* 1994; 16: 133-138

(Corner, 2009) Corver, J. The evolution of freeze-drying. *Innovations in Pharmaceutical Technology*. 2009; 66-70.

(Corwin, 1968) Corwin ME. Superior limbic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1968; 66: 338-40.

(Craig et al, 2013) Craig JP, Willcox MD, Argueso P, Maissa C, Stahl U, Tomlinson A, et al. The TFOS International Workshop on Contact Lens Discomfort: report of the contact lens interactions with the tear film subcommittee. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54: TFOS123–56.

(Creuzot-Garcher et al, 2004) Creuzot-Garcher C, Lafontaine PO, Brignole F, et al. Treating severe dry eye syndromes with autologous serum [in French]. *J Fr Ophthalmol* 2004;27:346–51.

(Cullinane et al, 2002) Cullinane AB, O'Callaghan P, McDermott K, Keohane C, Cleary PE. Effects of autologous platelet concentrate and serum on retinal wound healing in an animal model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2002; 240: 35-41.

(De la Fuente et al, 2008) De la Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49: 2016–2020.

(dos Santos et al, 2015) dos Santos VA, Schmetterer L, Groschl M, Garhofer G, Schmidl D, Kucera M, et al. In vivo tear film thickness measurement and tear film dynamics visualization using spectral domain optical coherence tomography. *Opt Express* 2015;23:21043–21063

(Eberle et al, 2000) Eberle J, Habermann J, Gurtler LG. HIV-1 infection transmitted by serum droplets into the eye: a case report. *AIDS*. 2000;14:206-7.

- (España, 2002) España EM, et al. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*, 2002. 109(11): p. 2004-2010.
- (Fellows, 2009) Fellows, P. Freeze drying and freeze concentration. *Food processing technology*. 2009; 687-699
- (Ferreira de Souza et al, 2001) Ferreira de Souza R, Kruse FE, Seitz B. Autologous serum for otherwise therapy resistant corneal epithelial defects - Prospective report on the first 70 eyes. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001; 218: 720-6.
- (Flosdorf & Mudd, 1935) Flosdorf EW, Mudd S. Procedure and Apparatus for Preservation in “Lyophile” form of Serum and Other Biological Substances. *The Journal of Immunology* 1935; 29 (5) 389-425
- (Freegard, 1997) Freegard T. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye* 1997. 11: p. 465-471.
- (Fink, 2008) Fink JK. High performance polymers. Norwich, NY: William Andrew. 2008;pp. 453–481.
- (Fischer et al, 2012) Fischer KR, Opitz A, Boëck M, Geerling G. Stability of serum eye drops after storage of 6 months. *Cornea* 2012;31: 1313–1318.
- (Fox et al, 1984) 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.

(García Jiménez et al, 2003) Garcia Jimenez V, Veiga Villaverde B, Baamonde Arbaiza B, et al. The elaboration, use and evaluation of eye-drops with autologous serum in corneal lesions [in Spanish]. *Farm Hosp* 2003;27:21–5.

(Geerling et al, 2001) 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. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 948-956.

(Geerling et al, 2004) Geerling G, Maclellan S, Hartwig D. Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004;88(11):1467-1474.

(Gil Rosendo, 2017) Gil Rosendo I. Chuño, el secreto milenario de los Andes para lograr que una papa dure 20 años. 13 de junio de 2017. [bbc.com](http://bbc.com). Consultado el 2 de junio de 2020.

(Gilbard et al, 1984) Gilbard JP, Carter JB, Sang DN, Refojo MF, Hanninen LA, Kenyon KR. Morphologic effect of hyper-osmolarity on rabbit corneal epithelium. *Ophthalmology*. 1984;91: 1205–1212.

(Gipson & Anderson, 1980) Gipson IK, Anderson RA. Effect of lectins on migration of the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980. 19(4): p. 341-349.

(Gomes et al, 2004) Gomes JAP, Amankwah R, Powell Richards A, Dua HS. Sodium hyaluronate (hyaluronic acid) promotes migration of human corneal epithelial cells in vitro. *Br J Ophthalmol* 2004;88: 821–825.

(Goto et al, 2001) Goto E, Shimmura S, Shimazaki J, Tsubota K. Treatment of superior limbic keratoconjunctivitis by application of autologous serum. *Cornea* 2001 Nov;20(8):807-10.

(Griebenow & Klibanov, 1995) Griebenow K, Klibanov AM. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10969–10976.

(Gupta et al, 1996) Gupta A, Monroy D, Ji Z, Yoshino K, Huang A, Pflugfelder SC. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. *Curr Eye Res* 1996; 15: 605-614.

(Haddad, 2000) Haddad A. Renewal of the rabbit corneal epithelium as investigated by autoradiography after intravitreal injection of 3H-thymidine. *Cornea*, 2000. 19(3): p. 378-383.

(Holzer et al, 2005) Holzer MP, Auffarth GU, Specht H, Kruse FE. Combination of transepithelial phototherapeutic keratectomy and autologous serum eyedrops for treatment of recurrent corneal erosions. *J Cataract Refractive Surg.* 2005; 31(8): 1603-6.

(Huang et al, 2008) Huang W, Chiang C, Tsai Y. Autologous serum eye drops for treating persistent corneal epithelial defect after vitreoretinal surgery. *Cornea*; 2008; 1097.

(Ilhan, 2015) Ilhan A. Autologous Serum Eye Drops Accelerate Epithelial Healing After LASEK. *Curr Eye Res.* 2016 Jun;41(6):872. doi: 10.3109/02713683.2015.1056377. Epub 2015 Aug 19. PMID: 26287453.

(Jester et al, 2002) Jester JV, Huang J, Petroll WH, et al. TGFbeta induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGFbeta, PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002;75:645-57

(Jester & Ho-Chang, 2003) Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res.* 2003;77:581-92

(Kasper et al, 2011) Kasper JC, Schaffert D, Ogris M, Wagner E, Friess W. Development of a lyophilized plasmid/LPEI polyplex formulation with long-term stability. A step closer from promising technology to application. *J Control Release* 2011;151: 246 –255.

(Klenkler et al, 2007) Klenkler B, Sherardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing and, ocular pathology. *The Ocular Surface* 2007; 5(3): p228-239

(Knop et al, 2011) Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA. The International workshop on Meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the Meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(4):1938-1978.

(Kojima et al, 2008) Kojima T, Higuchi A, Goto E, Matsumoto Y, Dogru M, Tsubota K. Autologous serum eye drops for the treatment of dry eye diseases. *Cornea.* 2008 Sep; 27 Suppl 1: S25-30.

(Kruse, 1994) Kruse FE. Stem cell and corneal epithelial regeneration. *Eye,* 1994. 8: p. 170- 187.

(Kruse & Tseng, 1994) Kruse FE, Tseng SC. Retinoic acid regulated clonal growth and differentiation of cultured limbal and peripheral corneal epithelium. 35, 1994: p. 2405-2420.

(Kung & Wu, 2013) Kung YH, Wu TT. The effect of autologous serum on vitrectomy with internal limiting membrane peeling for idiopathic macular hole. J Ocul Pharmacol Ther. 2013;29(5):508-511.

(Lagnado et al, 2004) Lagnado R, King AJ, Donald F, Dua HS. A protocol for low contamination risk of autologous serum drops in the management of ocular surface disorders. Br J Ophthalmol 2004;88:464 –5.

(Lajavardi et al, 2009) Lajavardi L, Camelo S, Agnely F et al. New formulation of vasoactive intestinal peptide using liposomes in hyaluronic acid gel for uveitis. J Control Release 2009;139: 22–30.

(Lee & Chen, 2008) Lee GA, Chen SX. Autologous serum in the management of recalcitrant dry eye syndrome. Clin Experiment Ophthalmol 2008;36:119 –22.

(Li et al, 2014) Li Q, Reed DA, Min L, et al. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. Int J Mol Sci 2014;15:8509–8525.

(Lins et al, 2004) Lins RD, Pereira CS, Hünenberger PH. Trehalose-protein interaction in aqueous solution. Proteins 2004;55:177 –186 .

(Lite et al, 2006) Leite SC, de Castro RS, Alves M, et al. Risk factors and characteristics of ocular complications, and efficacy of autologous serum tears after haematopoietic progenitor cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2006;38:223–7.

(Ljubimov et al, 1995) Ljubimov AV, Burgueson RE, Butkowski RJ, et al. Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest*, 1995. 72: p. 461-473.

(Llovet et al, 2017) Llovet F, Alonso F, Bilbao R, Calvo MA, González F, Javaloy J, Maldonado MJ, Mompeán B, Ortega J. Protocolo de práctica clínica preferente sociedad española de oftalmología (SEO/AAO). *Defectos refractados y cirugía refractiva*. 2017.

(Lombraña, 2008) Lombraña JI. Fundamentals and tendencies in freeze-drying of foods. Ratti C, *Advances in food dehydration*, Boca Raton, FL, Taylor & Francis Group, LLC. 2008; 209-236

(López-García et al 2003) López-García JS, García Lozano I, Martínez Garchitorena J. Estudio de los pliegues lacunares en el diagnóstico de ojo seco. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2003; 78:21-28.

(López-García et al 2007) López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Martínez-Garchitorena J. Aplicaciones del suero autólogo en Oftalmología. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2007;82(1):9-20.

(López-García et al, 2008) López-García JS, Rivas L, García-Lozano I, et al. Autologous serum eyedrops in the treatment of aniridic keratopathy. *Ophthalmology*, 2008. 115(2): p. 262- 267.

(López-García & García-Lozano, 2012) López-García JS, García-Lozano I. Use of containers with sterilizing filter in autologous serum eyedrops. *Ophthalmology* 2012;119:2225–2230.

(López-García et al, 2014) López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Ramírez N, Raposo R, Méndez MT. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: clinical and experimental comparative study. *Acta Ophthalmol.* 2014 Feb;92(1):e22-9.

(López-García et al, 2016) López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Ramírez N, Méndez MT, Raposo R. Stability of growth factors in autologous serum eyedrops after long-term storage. *Curr Eye Res* 2016 ;41:292–298.

(Matsuo et al, 2005) Matsuo H, Tomidokoro A, Tomita G, Araie M. Topical application of autologous serum for the treatment of late-onset aqueous oozing or point-leak through filtering bleb. *Eye* 2005; 19: 23-28.

(Maugey et al, 2007) Maugey M, Neri W, Zakri C, et al. Substantial improvement of nanotube processability by freeze-drying. *J Nanosci Nanotechnol.* 2007;7(8):2633-2639.

(Mavrakanas et al, 2007) Mavrakanas NA, Kiel R, Dosso AA. Autologous serum application in the treatment of Mooren's ulcer. *Klin Monatsbl Augenheilkd.*2007; 224(4): 300-2.

(Madder et al, 2009) Madduri S, Papaloizos M, Gander B. Synergistic effect of GDNF and NGF on axonal branching and elongation in vivo. *Neurosci Res.* 2009;65:88-97.

(Matsumoto et al, 2004) 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: 1115-1120.

(McClellan, 1997) McClellan, KA. Mucosal defense of the outer eye. *Surv Ophthalmol,* 1997. 42(3): p. 233-246.

(Ming et al, 2010) Ming Y Ch, Fung-Rong Hu, Huang Y, Shen Ep, Tshai I, Tz The  
Effect of Topical Autologous Serum on Graft Re-epithelialization after Penetrating  
keratoplasty Am J. Ophthalmol. 2010; 150: 352-359.

(Miyachi et al, 1990) Miyachi S, Sugiyama T, Machida A, Sekiguchi T, Miyazaki K,  
Tokuyasu K & Nakazawa K (1990): The effect of sodium hyaluronate on the migration of  
rabbit corneal epithelium I. An in vitro studio. J Ocul Pharmacol 6: 91-99.

(Murphy & Koop, 2005) Murphy DM, Koop T. Review of the vapor pressures of ice  
and supercooled water for atmospheric applications. Q. J. R. Meteorol. Soc. 2005; 131,  
1539-1565

(Murube & Rivas, 2003) Murube J, Rivas L. Biopsy of the conjunctiva in dry eye  
patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity.  
Eur J Ophthalmol, 2003. 13(3): p. 246-256.

(NASA, 2004) NASA. Food for Space Flight. Feb. 26, 2004. nasa.gov. Consultado el 4  
de junio de 2020

(Nadeau et al, 2008) Nadeau AE, Bauer RJ, Gallagher K, et al. A CXCL5- and bFGF-  
dependent effect of PDGF-B-activated fibroblasts in promoting trafficking and differentiation  
of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Exp Cell Rex. 2008;314:2176-86.

(Nghiem-Buffer et al, 2003) Nghiem-Buffer MH, Gatinel D, Jacquot F, et al. Limbal  
stem cell deficiency following phototherapeutic keratectomy. Cornea, 2003. 22(5): p.  
482-484.

(Newsome et al, 1981) Newsome DA, Hassell JR, Krachmer JH, et al. Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1981. 20: p. 738-750.

(Nichols et al, 1983) Nichols B, Dawson CR, Togni B. Surface features of the conjunctiva and cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. 24(5): p. 570-576.

(Nishida et al, 1983) Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. Arch Ophthalmol 1983; 101:1046-1048.

(Nishida et al, 1996) Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, et al. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. J Cell Physiol. 1996; 169:159-66

(Nishida et al, 1997) Nishida T, Nakamura M, Konma T, et al. Neurotrophic keratopathy studies on substance P and the clinical significance of corneal sensation. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1997;101:948-74.

(Noble et al, 2004) 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

(Noda-Tsuruya et al, 2006) Noda-Tsuruya T, Asano-Kato N, Toda I, Tsubota K. Autologous serum eye drops for dry eye after LASIK. J Refract Surg. 2006 Jan-Feb;22(1):61-6. PMID: 16447938.

(Ogawa et al, 2003) 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.

(Ohashi et al, 1989) Ohashi Y, Motokura M, Kinoshita Y, Mano T, Watanabe H, Kinoshita S, et al. Presence of epidermal growth factor in human tears. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 1879-1882.

(Ohtake & Wang, 2011) Ohtake S, Wang YJ. Trehalose: current use and future applications. *J Pharm Sci* 2011;100:2020–2053.

(Partal & Scott, 2011) Partal A, Scott E. Low-cost protocol for the production of autologous serum eye drops by blood collection and processing centers for the treatment of ocular surface diseases. *Transfus Med* 2011;21:271–277.

(Pastor & Calonge, 1992) Pastor JC, Calonge M. Epidermal growth factor and corneal wound healing. A multicenter study. *Cornea*. 1992;11:311-4.

(Pellegrini et al, 1999) Pellegrini G, Paterna P, Lambiase A, et al. Location and clonal analysis of stem cells and their differentiated progeny in the human ocular surface. *J Cell Biol*, 1999. 17(145(4)): p. 769-782.

(Phan et al, 1991) Phan TM, Foster CS, Shaw CD, et al. Topical fibronectin in an alkali burn model of corneal ulceration in rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1991;109:414-9.

(Phasukkijwatana et al, 2011) Phasukkijwatana N, Lertrit P, Liammongkolkui S, Prabhasawat P. Stability of epitheliotrophic factors in autologous serum eye drops from

chronic Stevens– Johnson syndrome dry eye compared to non-autoimmune dry eye. *Curr Eye Res* 2011;36:775–781

(Poon et al, 2001) 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: 1188-1197.

(Preciado & Arellanes-García, 2006) Preciado M, Arellanes–García L. Efficacy of Autologous Serum as an Adjuvant in the Treatment of Peripheral Ulcerative Keratitis . *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(13):3583

(Quinto et al, 2008) Quinto GG, Campos M, Behrens A. Autologous serum for ocular surface diseases. *Arq Bras Oftalmol* 2008;71(6 suppl): 47–54.

(Rahiran et al, 2000) Rahiran S, Garavito Z, Hurtado H. Técnica inmunohistoquímica para evaluar la proliferación de células en cultivo por la incorporación de bromodeoxiuridina. *Biomédica* 2000;20:144-150

(Rao et al, 2006) Rao N. et al. Efficacy of topical cyclosporine 0.05% in the treatment of dry eye associated with graft versus host disease. *Cornea* 2006; 25: 674-678.

(Rey, 2010) Rey L. Glimpses into the Realm of Freeze-Drying: Classical Issues and New Ventures. Rey L, May CJ. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*. (3rd ed.) London, Informa Healthcare, 2010; 1-28

(Rodríguez Calvo-de-Mora et al, 2022) Rodríguez Calvo-de-Mora M, Domínguez-Ruiz C, Barrero-Sojo F, Rodríguez-Moreno G, Antúnez Rodríguez C, Ponce Verdugo L, Hernández Lamas MDC, Hernández-Guijarro L, Villalvilla Castillo J, Fernández-Baca

Casares I, Prat Arrojo I, Borroni D, Alba-Linero C, Zamorano-Martín F, Moreno-Guerrero A, Rocha-de-Lossada C. Autologous versus allogeneic versus umbilical cord sera for the treatment of severe dry eye disease: a double-blind randomized clinical trial. *Acta Ophthalmol.* 2022 Mar;100(2):e396-e408.

(Rosenfeld & Fuller, 2012) Rosenfeld L, Fuller GG. Consequences of interfacial viscoelasticity on thin film stability. *Langmuir.* 2012;28(40):14238-14244.

(Sauer et al, 2004) Sauer R, Bluthner K, Seitz B. Sterility of non-preserved autologous serum drops for treatment of persistent corneal epithelial defects. *Ophthalmologe.* 2004;101:705-9.

(Schwegman, 2009) Schwegman JJ. Basic Cycle Development Techniques for Lyophilized Products. SP Scientific 2009.

(Shackell, 1909) Shackell, L. F. . An improved method of desiccation, with some applications to biological problems. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 1909; 24(3), 325–340.

(Schrader et al, 2006) Schrader S, Wedel T, Moll R, Geerling G. Combination of serum eye drops with hydrogel bandage contact lenses in the treatment of persistent epithelial defects. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006; 244: 1345-9.

(Shimmer et al, 2003) Shimmura S, Ueno R, Matsumoto Y, Goto E, Higuchi A, Shimazaki J, et al. Albumin as a tear supplement in the treatment of severe dry eye. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 1279-1283.

- (Sparks & Chase. 2015) Sparks T, Chase G. *Filters and Filtration Handbook* (6th ed.). Butterworth-Heinemann 2015
- (Sul et al, 2018) Sul S, Korkmaz S, Alacamli G, Ozyol P, Ozyol, E. Application of autologous serum eye drops after pterygium surgery: A prospective study. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2018; 256: 1939–1943
- (Sullivan et al, 2000) Sullivan DA, Sullivan BD, Ullman MD, et al. Androgen influence on the meibomian gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(12):3732-3742
- (Thoft & Friend, 1983) Thoft RA, Friend J. The X,Y,Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983. 24: p. 1442-1443.
- (Toda, 2018) Toda I. Dry Eye After LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018 Nov 1;59(14):DES109-DES115. doi: 10.1167/iovs.17-23538. PMID: 30481814.
- (Troiano & Monaco, 2008) Troiano P, Monaco G. Effect of hypotonic 0.4% hyaluronic acid drops in dry eye patients: a cross-over study. *Cornea* 2008;27: 1126–1130.
- (Tsai & Tseng, 1995) Tsai RJ, Tseng RC. Effect of stromal inflammation on the outcome of limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea*, 1995. 14(5): p. 439-449.
- (Tseng & Tsubota, 1997) Tseng SC, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol* 1997;124: 825-835.

(Tsubota et al, 1996) Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, Ono M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996; 122: 38-52.

(Tsubota et al, 1999a) Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjogren`s syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; 83: 390- 395.

(Tsubota et al, 1999b) Tsubota K, Goto E, Shimmura S, et al. Treatment of persistent corneal epithelial defect by autologous serum application. *Ophthalmology* 1999; 106:1984-9.

(Vajpayee et al, 2003) Vajpayee RB, Mukerji N, Tandon R, Sharma N, Pandey RM, Biswas NR, et al. Evaluation of umbilical cord serum therapy for persistent corneal epithelial defects. *Br J Ophthalmol* 2003; 87: 1312-1316.

(Van Setten et al, 1992) Van Setten GB, Tervo T, Tervo K, Tarkkanen A. Epidermal growth factor (EGF) in ocular fluids: presence, origin and therapeutical considerations. *Acta Ophthalmol Suppl* 1992; 202: 54-59

(Von Hofsten et al, 2016) Von Hofsten J, Egardt M, Zetterberg M. The use of autologous serum for the treatment of ocular surface disease at a Swedish tertiary referral center. *Int Med Case Rep J*. 2016;9:47-54.

(Wang et al, 2019) Wang L, Cao K, Wei Z, Baudouin C, Labbé A, Liang Q. Autologous serum eye drops versus artificial tear drops for dry eye disease: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ophthalmic Res* 2019 Dec. DOI: 10.1159/000505630

(Waring, 1982) Waring GO. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology*, 1982. 89(6): p. 531-590.

(Watson et al, 2008) Watson SL, Secker GA, Daniels JT. The effect of therapeutic human serum drops on corneal stromal wound- healing activity. *Curr Eye Res* 2008; 33: 641-52.

(Weindl et al, 2004) Weindl G, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Hyaluronic acid in the treatment and prevention of skin disease: molecular biological, pharmaceutical and clinical aspects. *Skin Pharmacol Physiol* 2004;17:207–213.

(Wells & Gregor, 1996) Wells JA, Gregor ZJ. Surgical treatment of full-thickness macular holes using autologous serum. *Eye (Lond)*. 1996;10 ( Pt 5):593-9. doi: 10.1038/eye.1996.136. PMID: 8977788

(Werkmeister et al, 2013) Werkmeister RM, Alex A, Kaya S, Unterhuber A, Hofer B, Riedl J, et al. Measurement of tear film thickness using ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:5578–5583

(Whitten et al, 1992) Whitten, KW, Gailey, KD, Davis RE, General chemistry (4th ed.). Saunders College Publishing. 1992; 475.

(Willcox et al, 2017) Willcox MDP, Argüeso P, Georgiev GA, et al. TFOS DEWS II Tear Film Report. *Ocul Surf*. 2017;15(3):366-403

(Wilson et al, 1994) Wilson SE, Schultz GS, Chegini N, et al. Epidermal growth factor, transforming growth factor alpha, transforming growth factor beta, acidic fibroblast growth

factor, basis fibroblast growth factor, and interleukin-1 proteins in the cornea. *Exp Eye Res.* 1994;59:63-71

(Wilson et al, 1999) Wilson SE, Liang Q, Kim WJ. Lacrimal gland HGF, KGF and EGF mRNA levels increase after corneal epithelial wounding. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2185-2190.

(Xaymardan et al, 2004) Xaymardan M, Tang L, Zagreda L, et al. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult bone marrow-derived cardiac myocytes. *Circ Res.* 2004;94:E39-45.

(Yingling et al, 1995) Yingling JM, Wang XF, Bassing CH. Signaling by the transforming growth factor-beta receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1242:115-36)

(Yokoi et al, 2014) Yokoi N, Bron AJ, Georgiev GA. The precorneal tear film as a fluid shell: the effect of blinking and saccades on tear film distribution and dynamics. *Ocul Surf.* 2014;12(4):252-266.

(Yoon et al, 2006) Yoon KC, Im SK, Park YG, Jung YD, Yang SY, Choi J. Application of umbilical cord serum eyedrops for the treatment of dry eye syndrome. *Cornea.* 2006;25:268–272

(Yoshino et al, 1996) 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: 615-624.

(You et al, 1999) You L, Pohl J, Volcker HE, et al. Bone morphogenetic proteins and growth and differentiation factors in the human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999. 40: p. 296-311.

(You et al, 2001) 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.

(Zhang et al, 2017) Zhang J, Qi X, Luo X, Li D, Wang H, Li T. Clinical and immunohistochemical performance of lyophilized platelet- rich fibrin (Ly-PRF) on tissue regeneration. *Clin Implant Dent Relat Res* 2017;19:466–477.

(Zhao et al, 2013) Zhao J, Wang S, Bao J, et al. Trehalose maintains bioactivity and promotes sustained release of BMP-2 from lyophilized CDHA scaffolds for enhanced osteogenesis in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013;8 :e546 45

(Zieske et al, 1992) Zieske JD, Bukusoglu G, Yankauckas MA. Characterization of a potential marker of corneal epithelial stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. 33(1): p. 143-152.



