



Colirio de suero autólogo

Dra. Silvia Amado^a, Dr. Santiago Pérez^b, Dr. Wilson Franca^c, Tec. Karina Vidiñapin^d,
Tec. Diego Lasserre^e

a) Médico Oftalmólogo, Jefa del Servicio de Oftalmología de Médica Uruguaya.

b) Médico Oftalmólogo del Servicio de Oftalmología de Médica Uruguaya.

c) Médico Hemoterapeuta, Jefe del Servicio de Hemoterapia de Médica Uruguaya, Médico Hemot. G° III de Casmu, Médico Hemot. Hospital Maciel y miembro del Equipo de TMO de Hospital Maciel.

d) Tecnóloga en Hemoterapia, Especialista en Gestión de la Calidad en Servicios de Salud, Unidad de Control de Calidad de Hemoterapia Médica Uruguaya, Tecnóloga en Hemoterapia en Servicio Nacional de Sangre.

e) Tecnólogo en Hemoterapia, Unidad de Control de Calidad de Hemoterapia Médica Uruguaya, Tecnólogo en Hemot. Hospital Maciel

RESUMEN

El uso del Colirio de Suero Autólogo en Oftalmología se ha implementado por la necesidad de encontrar un sustituto de la lágrima que además de humidificar aporte otros factores fundamentales en el tratamiento de diferentes trastornos de la superficie ocular, como lo son el Síndrome de Ojo Seco o Queratoconjuntivitis Seca y los Defectos Epiteliales Persistentes. El Colirio de Suero Autólogo presenta características muy similares a las de la lágrima en cuanto a su PH y osmolaridad, aportando factores nutricionales y de crecimiento necesarios para mantener la viabilidad celular en los procesos de reparación epitelial. Posee además sustancias bactericidas que reducen el riesgo de contaminación e infección. Para su elaboración en condiciones asépticas se requiere equipamiento adecuado: cámara de flujo laminar, material estéril; y personal debidamente capacitado. Se utiliza el Suero extraído de la sangre del propio paciente, por eso se denomina Autólogo, no existiendo riesgo de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas.

PALABRAS CLAVE: Oftalmología, Trasplante de córnea, Síndromes de ojo seco, Anomalías del Ojo

SUMMARY

The use of autologous serum eye drops in Ophthalmology has been implemented due to the need to find a substitute for tears that, apart from moisturizing, adds other fundamental factors for the treatment of different disorders of the ocular surface, such as the Dry Eye Syndrome, or Dry Keratoconjunctivitis, as well as Persistent Epithelial Defects. Autologous Serum Eye Drops show characteristics very similar to those of tears, in terms of their PH and osmolality, providing nutritional

and growth factors, necessary in order to keep cell viability in epithelial repair processes. In addition, they have bactericidal substances which reduce the risk of contamination and infection. In order to be prepared in aseptic conditions, it is necessary to have the proper equipments: laminar flow chamber, sterile material; and duly trained staff. It is used sera taken from the patient's own blood, this is why it is called Autologous; therefore, there is no risk for the transmission of infectious-contagious diseases.

KEY WORDS: Ophthalmology, Corneal Transplantation, Dry Eye Syndromes, Eye Abnormalities

INTRODUCCIÓN

La lágrima natural es una película fluida que recubre toda la superficie ocular (córnea y conjuntiva), está constituida por agua, iones y macromoléculas. Dentro de éstas últimas tenemos proteínas, glicoproteínas, mucinas y lípidos.

El volumen total de la lágrima es 5 a 15 µl con una tasa de recambio de 1 µl/minuto. Esta se produce por secreción basal y refleja.

Componentes de la película lagrimal y glándulas o células que le dan origen:

1. Componente Mucinoso (0.2 %), producido por las células caliciformes, las criptas de Henle y las glándulas de Manz, forma la capa interna y su función es convertir el epitelio corneal en una superficie hidrofílica y permitir así su humectación.

Recibido: Febrero 2016

Aceptado: Abril 2016

Correspondencia: Ruta N° 1, Km 61, C.P. 80006, San José, Uruguay. Tel: (+598) 24876666, int. 2144.

E-mail: diegolasserre@gmail.com

Salud Militar 2016; 35(1):47-55

2. Componente Acuoso (99.78 %), producido por la glándula lagrimal principal y las glándulas lagrimales accesorias (Krause y Wolfring), forma la capa media y su función es aportar oxígeno atmosférico al epitelio corneal avascular, acción antibacteriana, reduce las irregularidades de la córnea y elimina sustancias de desecho.

3. Componente Lipídico (0.02%), producido por las glándulas de Meibomio y las glándulas de Zeis y Moll, forma la capa externa y su función es retrasar la evaporación de la capa acuosa de la película lacrimal, aumentar la tensión superficial para darle estabilidad a la misma y lubricar los párpados en su paso por la superficie del globo ocular (1).

El Colirio de Suero Autólogo (CSA) en Oftalmología se ha implementado por la necesidad de encontrar sustitutos lagrimales que, además de humidificar aporten otros componentes presentes en la lágrima (2).

En 1975, Ralph presenta un estudio con una bomba de perfusión continua de fluidos en la superficie ocular, ensayando con diversos sustitutos lagrimales, entre ellos el suero y el plasma homólogos y autólogos (3). En 1984, Fox et al presentan otro estudio donde se muestra la eficacia del Suero Autólogo en el tratamiento del Ojo Seco en pacientes que no mejoraban con el uso de lágrimas artificiales (4). En 1996, en el Japón, Kazuo Tsubota publica sus trabajos donde se describe el potencial epiteliotrófico del suero autólogo sobre la superficie ocular (5,6).

Las patologías que ocasionan desórdenes en la película lacrimal produciendo daño en la superficie interpalpebral y provocando síntomas de incomodidad ocular son muy diversas. Entre estas patologías se destaca la Queratoconjuntivitis seca (QCS), desde el año 2007, el Dry Eye Workshop (DEWS, 'grupo de trabajo internacional de ojo seco') define el ojo seco como una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que provoca síntomas de incomodidad o molestias, alteración de la agudeza visual e inestabilidad de la película lacrimal con daño potencial de la superficie ocular. Se acompaña de incremento de la osmolaridad de la lágrima e inflamación de la superficie ocular (7).

La prevalencia de esta enfermedad oscila entre el 10-20% de la población, aunque en poblaciones orientales puede llegar al 33% (8). Esta patología puede estar asociada al síndrome de Sjögren, patología sistémica de origen autoinmune que afecta principalmente a las

glándulas exócrinas, presentando los pacientes xeroftalmia y xerostomía persistentes debido a la alteración funcional de las glándulas lacrimales y salivares. También en la forma crónica de la enfermedad de injerto contra huésped, los defectos epiteliales persistentes, las erosiones corneales recurrentes causadas por distrofias corneales o por queratitis herpéticas previas se produce una inestabilidad del epitelio con sequedad exócrina que facilita la aparición del ojo seco.

Entre los componentes del suero con mayor importancia están el EGF, el factor transformante de crecimiento beta (TGF- β), la vitamina A, la fibronectina, la albúmina, la α 2 macroglobulina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-AB), neuropéptidos como la sustancia P y el factor de crecimiento tipo insulina 1. Estos factores tienen efecto trófico sobre la dinámica epitelial, tal es el caso del EGF que acelera el proceso de migración de las células epiteliales (11) y tiene efectos antiapoptóticos (12); está presente tanto en la secreción lagrimal basal como en la refleja (13) en concentración inferior a la que se encuentra en el suero autólogo. La concentración en suero de TGF- β , implicado en los procesos de reparación epitelial y estromal (14-17), es casi tres veces mayor que la encontrada en lágrima. La vitamina A parece prevenir los procesos de metaplasia escamosa de los epitelios (10); su concentración en suero es superior a la encontrada en lágrima.

La albúmina ha demostrado actividad antiapoptótica (18); mientras que la α 2 macroglobulina presenta actividad de anticlagenasa (19). La fibronectina es sin duda uno de los factores más importantes en la migración celular (20,21) y su concentración en el suero es también mayor que la encontrada en lágrima. Además, la sustancia P y el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) presentes en el suero autólogo y ampliamente producidos en el organismo parecen estar implicados en la migración y adhesión celular del epitelio corneal (22). El PDGF-AB, una de las cinco isoformas de PDGF, se activa intracelularmente mientras es secretado por los gránulos alfa de las plaquetas activadas, favorece la mitosis y la cicatrización. Más aún, el suero autólogo contiene IgG, lisozima y factores del complemento que aportan efecto bactericida y bacteriostático, por lo que sus efectos sobre la superficie ocular están determinados por sus numerosas propiedades.

El suero presenta características similares a las de la lágrima (pH y osmolaridad); al igual que ésta, contiene abundantes factores de crecimiento y bactericidas que hacen que el tratamiento con suero autólogo tópico no sólo humidifique la superficie ocular, sino que también

aporte factores nutricionales y de crecimiento, necesarios para mantener la viabilidad celular en los procesos de reparación epitelial, y componentes bactericidas que reducen el riesgo de contaminación e infección.

Tabla 1. Comparación entre los componentes de la lágrima (basal) y el suero autólogo.

Componentes	Lágrima (basal)	Suero
Proteínas		
Total	7,35 g/l	62-82 g/l
Lisozima	2,39 g/l	4-15 mg/l
Lactoferrina	1,51 g/l	--
Albúmina	54 mg/l	35-55 mg/l
$\alpha 2$ macroglobulina		
Fibronectina	21 μ g/ml	205 μ g/ml
IgG	32 mg/l	8-18 g/l
IgA	411 mg/l	0,9-4,5 g/l
IgM	--	0,37-2,8 mg/l
IgE	--	0,25-0,7 mg/l
IgD	--	3-300 mg/l
Factores de crecimiento		
EFG	1,66 ng/ml	0,72 ng/ml
TGF- α	180-247 pg/ml	147 pg/ml
TGF- $\beta 1$	--	140,3 ng/ml
TGF- $\beta 2$	55 pg/ml	--
PDGF-AB	presente	presente
IGF-1	presente	presente
Vitaminas		
Vit. A	16 ng/ml	883 ng/ml
Vit. C	117 μ g/ml	7-20 μ g/ml
Electrolitos		
Sodio	145 mEq/l	135-146 mEq/l
Potasio	24,1 mEq/l	3,5-5 mEq/l
Calcio	1,5 mM	1,1 mM
Cloro	128 mM	96-108 mM
Bicarbonato	26 mM	21-29 mM

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es mostrar en qué consiste la Terapia Regenerativa de la Superficie Ocular con Colirio de Suero Autólogo al 20%, describir los pasos de la elaboración del mismo, hacer referencia a las diferentes patologías de los pacientes que llegan a nuestro Servicio de Hemoterapia y evaluar la efectividad de dicho tratamiento.

METODOLOGÍA

Dicha evaluación en nuestros pacientes se realizó mediante la valoración de la desaparición o mejoría de

sus síntomas oculares. Para ello se definieron previamente los síntomas o los aspectos por evaluar utilizando el cuestionario publicado por Donate en 2002 (23). Estas preguntas se realizaron a los pacientes antes de iniciar el tratamiento, a los 30 días de iniciado y a los 60 días, de forma que pudiéramos observar la evolución de los síntomas.

Por otra parte, el Oftalmólogo tratante valora a los pacientes de acuerdo a los criterios propios de su especialidad, la evolución de las lesiones, la sintomatología y la recuperación de la funcionalidad de la córnea en los pacientes trasplantados.

Descripción de los procesos

Al Servicio de Hemoterapia de Médica Uruguay han concurrido desde setiembre del año 2012 a marzo del 2016 un total de 58 pacientes para realizar tratamiento con Colirio de Suero Autólogo (CSA); concurren con pase del Oftalmólogo tratante donde constan los datos patronímicos y diagnóstico. El paciente es entrevistado por el Médico Hemoterapeuta acompañado por los Tecnólogos en Hemoterapia del equipo de CSA. Se le informa en que consiste el tratamiento, los estudios que le realizarán a su sangre, como debe aplicarse el colirio y

su conservación. Se informa además sobre la seguridad del producto, dado que los procesos están protocolizados, las muestras extraídas son correctamente identificadas, al igual que el CSA que es elaborado de forma individual.

El médico evalúa las condiciones generales del paciente y le realiza una serie de preguntas que apuntan a su sintomatología ocular (tabla 2), se ingresan los datos al sistema informático y se abre una Historia. Antes de comenzar el procedimiento el paciente debe firmar un Consentimiento informado.

Tabla 2. Distribución de los pacientes según síntomas oculares referidos al inicio del tratamiento (Set.2012 - Mar.2016.)

Síntomas oculares	%
Enrojecimiento ocular	39.6
Sequedad del ojo	43.1
Sensación de arenilla y cuerpo extraño	34.5
Ardor	69.0
Picor	44.8
Dolor o malestar ocular	51.7
Cansancio y pesadez en los ojos	25.8
Lagrimio	34.5
Escamas o costras en los párpados	17.2
Dificultad para abrir los ojos al levantarse	15.5
Sensibilidad a la luz (fotofobia)	68.9
Visión disminuida	67.2

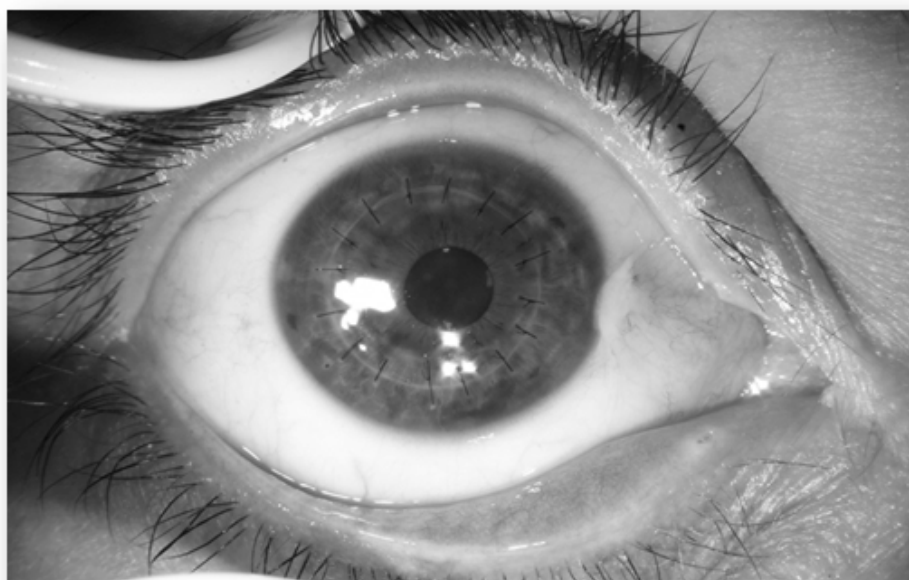
Las patologías de los pacientes tratados son muy diversas (tabla 3) y de ellos al 43 % se les ha realizado trasplante de córnea (figura 1).

Tabla 3. Diagnósticos oftalmológicos.

Diagnósticos	n
Queratitis herpética	14
Pterigion	03
Queratitis filamentosa	01
Síndrome de ojo seco (QCS)	06
Abseso estéril de OD	01
Queratitis punctata	01
Traumatismo OI	04
Traumatismo OD	03
Queratocono	08
Úlcera de córnea OI	01
Glaucoma congénito	01
Defecto epitelial persistente por traumatismo	02
Quemadura por HCL	01
Úlcera trófica OD	01
Queratopatía por Amiodarona	01
Distrofia corneal aguda bilateral	03
Quemadura por Soda Cáustica	01
Queratitis por Acanthamoeba	03
Queratopatía diabética	01
Queratitis ulcerativa	01
Postoperatorio de cataratas	01

Tabla 4. Enfermedades asociadas.

Enfermedades	n
Artrosis	02
Hipotiroidismo	03
Hemocromatosis	01
Colagenopatía (LES)	02
HTA	10
Alergia severa a medicamentos	02
Glaucoma congénito	03
TEC con pérdida de visión.	01
Diabetes Mellitus	03
Cardiopatía isquémica	01
Hemangiomas cerebrales	01
Asma	02
IRC	02
Neo de Colon	01
ACV	01
Poliartritis reumatoidea	02
Dislipemia	01
Síndrome de Sjogren	04
Hashimoto	02
No presenta	04

**Figura 1.** Paciente con trasplante de córnea en OD:

El paciente concurre con un ayuno de 4 horas, se selecciona la vena más adecuada en MMSS y se realiza la asepsia de la zona de punción utilizando Clorhexidina al 2 % y alcohol 70°.

El tecnólogo debe utilizar sobretúnica, tapaboca y guantes estériles (figura 2), se extraen 60 ml de sangre que deben dispensarse en 8 tubos secos estériles (sin anticoagulante), un tubo con gel separador y un tubo con anticoagulante (edta). Cada tubo se identifica con una etiqueta que posee los datos del paciente (nombre, apellido y cédula de identidad), el número del producto y un código de barras.



Figura 2. Extracción de la muestra de sangre al paciente.

Los tubos secos deben colocarse en posición vertical dentro de un incubador a 37°C durante dos horas donde se producirá la retracción del coágulo.

La muestra colocada en el tubo con gel separador se utiliza para la realización de estudios serológicos: HIV, HCV, AgsHB, Anti HBc (core), Chagas, HTLV y VDRL, que deben dar negativos para que el paciente quede incluido en protocolo de tratamiento con CSA.

Con la muestra en tubo con anticoagulante se realiza el estudio de grupo sanguíneo (ABO y RH) y anticuerpos irregulares por técnicas en Gel.

Luego de dos horas de incubación a 37°C los tubos se centrifugan 10 minutos a 2500 rpm, finalizada la misma se constata la correcta separación del suero, el mismo debe ser límpido, transparente y sin evidencia de hemólisis.

La preparación del colirio se realiza en Cámara de Flujo Laminar (figura 3), donde el Tecnólogo separa el suero de las muestras del paciente y realiza una dilución al 20 % en solución salina fisiológica (SSF).

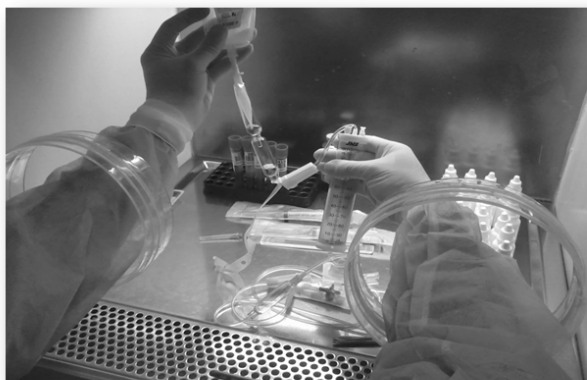


Figura 3. Preparación del CSA en cámara de flujo laminar.

Posteriormente se procede a dispensar el colirio en 30 frascos goteros opacos (figura 4), cada uno de ellos se identificará con la misma etiqueta que identifica los tubos con la sangre del paciente.

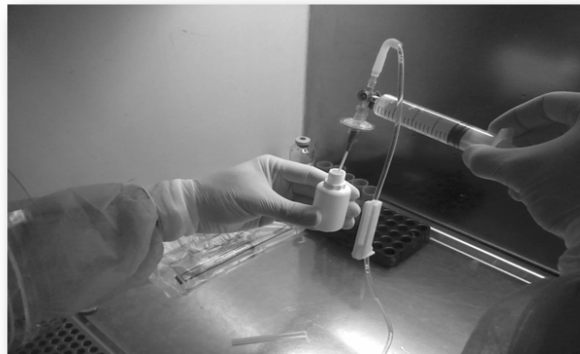


Figura 4. Llenado de los frascos goteros con el CSA.

Una vez finalizada la preparación del CSA se le realiza un control bacteriológico para asegurarnos que no hay contaminación (figura 5), el producto se le entrega al paciente teniendo un resultado negativo después de 48 hs. de incubación.

Una vez etiquetados los 30 frascos goteros (figura 6) se congelan en freezer a -20°C en packs debidamente identificados con los datos del paciente, fecha de envasado, número del producto y la leyenda: "Colirio de Suero Autólogo, conservar en freezer".

Todos los pacientes son instruidos sobre el correcto uso y manejo del CSA, sobre todo en lo referente a las medidas de conservación e higiene al aplicar las instilaciones. Se le explica que es un producto biológico y que es de uso personal.

El producto se entrega al paciente en una conservadora equipada con sachets de gel congelado para mantener la temperatura, un instructivo para uso del colirio y copia del resultado del control bacteriológico.

Según nuestro protocolo de trabajo el CSA se mantiene en perfectas condiciones congelado a -20°C en freezer por dos meses, una vez descongelado, el frasco gotero en uso se conservará en heladera y deberá descartarse luego de 48 hs.

Generalmente la indicación es de dos gotas en el ojo afectado cada tres o cuatro horas, esto depende de la patología del paciente y del Oftalmólogo tratante.



Figura 5. Control bacteriológico del producto.



Figura 6. Frascos goteros conteniendo el Colirio de Suero Autólogo.

DISCUSIÓN

La Terapia Regenerativa de la superficie ocular con Colirio de Suero Autólogo al 20% se ha convertido en el tratamiento estándar de diversas patologías debido a su efectividad, a su facilidad de preparación y a la inocuidad para el paciente.

De los 58 pacientes tratados un 70 % manifestaron mejoría de sus síntomas en el primer mes de tratamiento, a los dos meses de tratamiento un 95 % manifestaron mejoría, teniendo como referencia el cuestionario realizado en su primer consulta.

La evolución favorable de las úlceras corneales (disminución y cierre de las mismas) y la recuperación de la funcionalidad de las córneas trasplantadas es evidenciado en los estudios realizados por el Oftalmólogo tratante, quién registra los resultados del tratamiento en la Historia Clínica del paciente.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con Colirio de Suero Autólogo acelera y favorece el crecimiento y trofismo celular, facilitando la cicatrización a través de la acción de los múltiples factores que contiene. Los pacientes con patologías de la superficie ocular que no responden a tratamientos convencionales han tenido una muy buena evolución clínica, superando a las lágrimas artificiales que proporcionan solo lubricación, pero no nutren ni contienen factores de crecimiento, bactericidas y bacteriostáticos.

Desde setiembre del año 2012 hemos realizado más de 500 procedimientos teniendo un 100% de resultados negativos en los controles bacteriológicos de los productos.

Todos nuestros procedimientos cumplen con los requisitos legales y reglamentarios que rigen nuestra especialidad (decreto del Poder Ejecutivo N° 385/000, 26 de diciembre del 2000). El Servicio de Hemoterapia de Médica Uruguaya está certificado por la norma UNIT/ISO 9001-2008.

CONCLUSIÓN

Dados los resultados favorables obtenidos con el uso del Colirio de Suero Autólogo al 20 %, evidenciado por la mejoría manifestada por los pacientes y por la satisfacción de los médicos integrantes del Servicio de Oftalmología con dicho tratamiento, podemos asegurar que es un tratamiento efectivo y seguro ya que el CSA se obtiene a partir de la sangre del propio paciente, no existiendo riesgo de transmisión de enfermedades infecto-contagiosas, además no posee conservantes por lo que es totalmente inocuo.

La elaboración del CSA al 20 % no presenta dificultades técnicas siempre que se disponga del equipamiento adecuado para su realización en condiciones asépticas, (cámara de flujo laminar, material estéril) y profesionales debidamente capacitados.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kanski J. Oftalmología Clínica. 3a. ed. Barcelona : Doyma, 1996, 73-6.
- (2) López-García J, García Lozano I, Martínez-Garchitorena J. Use of autologous serum in ophthalmic practice. Arch Soc Esp Ophthalmol 2007; 82(1): 9-20.
- (3) Ralph R, Doane M, Dohlman C. Clinical experience with a mobile ocular perfusion pump. Arch Ophthalmol 1975; 93(10):1039-43.
- (4) Fox R, Chan R, Michelson J, Belmont J, Michelson P. Beneficial effect of artificial tears, made with autologous serum in patients with Keratoconjunctivitis sicca. Arthritis Rheum 1984; 27(4):459-61.
- (5) Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, Toda I, Takano Y, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. Am J Ophthalmol 1996; 122(1):38-52.
- (6) Tsubota K, Goto E, Shimura S, Shimazaki J. Treatment of persistent epithelial defect by autologous serum application. Ophthalmology 1999; 106(10):1984-9.
- (7) Pflugfelder S, Geerling G, Kinoshita S, Lemp M, McCulley J, Nelson D, et al. Manejo y tratamiento de la enfermedad de ojo seco: informe del Subcomité para Manejo y Tratamiento del Ojo Seco. Ocul Surf 2007; 5(2):168-83.
- (8) Mathers W. Why the eye becomes dry: A cornea and lacrimal gland feedback model. CLAO J 2000; 26(3):159-65.
- (9) Krause F, Tseng S. Serum differentially modulates the clonal growth and differentiation of cultured limbal and corneal epithelium. Invest Ophthalmol Vis Sci 1993; 34(10):2976-89.
- (10) 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(4):390-395.
- (11) Van Setten G, Tervo T, Tervo K, Tarkkanen A. Epidermal growth factor (EGF) in ocular fluids: presence, origin and therapeutical considerations. Acta Ophthalmol Suppl 1992; 202: 54-9.
- (12) Collins M, Perkins G, Rodríguez-Tarduchy G, Nieto M, López-Rivas A. Growth factors as survival factors: Regulation of apoptosis. Bioessays 1994; 16(2):133-38.
- (13) 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(8):1879-82.
- (14) Gupta A, Monroy D, Ji Z, Yoshino K, Huang A, Pflugfelder S. Transforming growth factor beta-1 and beta-2 in human tear fluid. Curr Eye Res 1996; 15(6): 605-14.
- (15) Fredj-Reygrobelle D, Plouet J, Delayre T, Baudouin C, Bourret F, Lapalus P. Effects of aFGF and bFGF on wound healing in rabbit corneas. Curr Eye Res 1987; 6(10):1205-9.
- (16) Yoshino K, Garg R, Monroy D, Ji Z, Pflugfelder S. Production and secretion of transforming growth factor beta (TGF-beta) by the human lacrimal gland. Curr Eye Res 1996; 15(6):615-24.

- (17) Wilson S, Lloyd S, Kennedy R. Basic fibroblast growth factor (FGFb) and epidermal growth factor (EGF) receptor messenger RNA production in human lacrimal gland. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991; 32(10):2816-20.
- (18) 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(10):1279-83.
- (19) Poon A, Geerling G, Dart J, Fraenkel G, Daniels J. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001; 85(10):1188-97.
- (20) Nishida T, Ohashi Y, Awata T, Manabe R. Fibronectin. A new therapy for corneal trophic ulcer. *Arch Ophthalmol* 1983; 101(7):1046-48.
- (21) Phan T, Foster C, Shaw C, Zagachin L, Colvin R. Topical fibronectin in an alkali burn model of corneal ulceration in rabbits. *Arch Ophthalmol* 1991; 109(3):414-19.
- (22) Nishida T, Nakamura M, Ofuji K, Reid T, Mannis M, Murphy C. Synergistic effects of substance P with insulin-like growth factor-1 on epithelial migration of the cornea. *J Cell Physiol* 1996; 169(1):159-66.
- (23) Donate J, Benítez del Castillo J, Fernández C, García Sánchez J. Validation of a questionnaire for the diagnosis of dry eye. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002; 77(9):493-500.