



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA

Instituto de Oftalmología

“Fundación Conde de Valenciana”

**ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN PROTEICA Y  
DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS  
CONTAMINANTES DEL SUERO AUTÓLOGO**

Para obtener el diplomado de especialidad en

**OFTALMOLOGÍA**

Presenta

Dr. Mauricio Rivera Narváez

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Yonathan Garfias Becerra



# **Análisis de la degradación proteica y determinación de microorganismos contaminantes del suero autólogo.**

## **Introducción**

La composición de la película lagrimal tiene una gran importancia en la estabilidad y viabilidad del epitelio corneal y conjuntival. El suero autólogo es un preparado a base de la propia sangre del paciente, la cual es centrifugada y posteriormente diluida con suero fisiológico. Cuando el suero que se administra es del propio individuo se denomina suero autólogo (SA). La utilización del suero autólogo en el tratamiento del ojo seco severo ha ganado una gran popularidad en los últimos 10 años. No obstante sigue siendo un área restringida ya que su preparación tiene que ser llevada a cabo por personal especializado. En determinados casos se ha recurrido al empleo de suero fetal bovino y suero extraído del cordón umbilical aunque estos dos fluidos no tienen la ventaja de carecer de antigenicidad como es el caso del suero autólogo <sup>(1)</sup>.

Los efectos beneficiosos de la aplicación de suero autólogo en el tratamiento de pacientes con ojo seco se conoce desde 1984 gracias a los trabajos de Fox *et al* <sup>(2)</sup>. Sin embargo, el relativo desconocimiento de su mecanismo de acción, a nivel de la superficie ocular, hizo que su utilización en la práctica clínica fuese muy reducida hasta finales de la última década.

Son muchos los componentes del suero que se piensa tienen algún efecto trófico sobre los epitelios de la superficie ocular al actuar sobre la dinámica epitelial modelando la proliferación de células epiteliales del limbo y córnea <sup>(1)</sup> incluso, en estudios *in vitro* con células del epitelio conjuntival, se ha demostrado un efecto dosis dependiente del suero autólogo sobre la

expresión de mucinas, sobre todo de mucina 1, mediado por receptores para EGF presentes en las células caliciformes.

La mayoría de pacientes con síndrome de ojo seco responden a tratamiento convencional dirigido a optimizar el ambiente de la superficie ocular. Este sistema depende de las interacciones dinámicas de anexos sanos, reflejo palpebral íntegro, producción normal de lágrimas y tejido corneal y conjuntival adecuado<sup>(2)</sup>.

A pesar de terapia convencional, existe un número importante de pacientes que persisten con sintomatología y signos de irritación ocular. Esto representa un mayor desorden de superficie ocular con discapacidad visual.

El componente final de la sangre privado de sus entidades celulares y factores de coagulación es denominado suero autólogo. A través de los años se han utilizado sus componentes tales como inmunoglobulinas y factores de crecimiento en ensayos clínicos oftalmológicos con resultados favorables en la clínica de patologías oculares<sup>(3)</sup>.

Diversos estudios afirman que al carecer de conservantes, el suero autólogo, tiene un alto riesgo de contaminación<sup>(1)</sup>,

En la tabla 1 se muestra una relación comparada de algunas concentraciones de los principales factores epiteliotróficos encontrados en la lágrima y el suero autólogo<sup>(3)</sup>

Las lágrimas naturales cuentan con diversas propiedades antibacterianas, nutritivas, mecánicas y de lubricación constante que proveen al epitelio corneal de nutrientes esenciales para su funcionamiento<sup>(4)</sup>.

Éstas contienen componentes como factor de crecimiento, fibronectina y vitaminas que permiten proliferación, migración y diferenciación del epitelio conjuntival y corneal <sup>(5)</sup>.

	Lágrimas	Suero Autólogo
pH	7.4	7.4
Osmolaridad	298	296
EGF	0.2-3.0	0.5
TGF alfa	2-10	6-33
Vitamina A	0.02	46
Lysozimas	1.4	6
IgA	1190	2
Fibronectina	21	205

**TABLA 1.** TABLA DE CONCENTRACIONES DE DIVERSOS FACTORES ENTRE EL SUERO AUTOLOGO Y LAS LAGRIMAS NATURALES <sup>(3)</sup>.

Recientemente se ha demostrado mejoría clínica, subjetiva y objetiva, con el uso de suero autólogo en forma de gotas en pruebas clínicas aleatorizadas. En las cuales diversas patologías corneales con deficiencia de lágrimas naturales

como la queratoconjuntivitis seca y defectos corneales epiteliales persistentes presentaron mejoría después de la terapia con suero autólogo. <sup>(3, 5, 6)</sup>.

La preparación de suero autólogo ha sido diversa en distintos estudios controlados y no controlados. Poon *et al* utilizaron diluciones al 100 % y al 50% combinadas con cloranfenicol como medio preservante mientras que Gerling *et al* utilizaron solución salina balanceada con una dilución de 1:5. El suero autólogo se considera una fórmula magistral y debe prepararse de acuerdo a protocolos estrictos. Además, debe incluir condiciones específicas de almacenamiento ya que se trata de un preparado altamente inestable.

Resulta, por tanto, de gran utilidad el desarrollo de normas de buena fabricación para su producción que, a su vez, deben ajustarse a la regulación propia de los preparados sanguíneos.

En este apartado es fundamental tener en cuenta aquellos factores tecnológicos que pueden repercutir en la calidad y propiedades del preparado.

La utilización del suero autólogo en oftalmología viene marcada por la necesidad de encontrar sustitutos lagrimales que, además de humidificar, aporten otros componentes presentes en la lágrima y que se encuentran disminuidos en casos de ojo seco. Con igual finalidad, han sido utilizados el suero fetal bovino y el suero extraído del cordón umbilical. Del suero fetal bovino se extraen numerosos factores de crecimiento utilizados para cultivos celulares *in vitro* <sup>(1)</sup>, además ha sido utilizado para el tratamiento de úlceras corneales en perros <sup>(2)</sup>. En cuanto al suero extraído del cordón umbilical, se piensa que presenta una concentración mayor de factores de crecimiento pero, al igual que con el empleo de suero fetal bovino, hemos de tener en cuenta las posibles alergias así como los riesgos de transmisión de

enfermedades infecciosas. La mayor parte de los estudios cuentan con una consecución de mejoría en las patologías tratadas en cada estudio <sup>(1,3, 5)</sup>.

Son múltiples los beneficios del SA, sin embargo hay un caso reportado en la literatura de efectos tóxicos por depósitos de inmunoglobulina corneales en un paciente con defecto epitelial persistente (tras la aplicación horaria de SA al 100% se detectó la aparición de infiltrados corneales periféricos ulcerados a las 24 horas de iniciar el tratamiento). En pacientes con artritis reumatoide parece que existe alguna relación entre el factor reumatoide y otros antígenos los cuales en presencia de los anticuerpos existentes en el suero autólogo, podrían teóricamente causar depósitos por inmunocomplejos y éstos generar una reacción inflamatoria secundaria. En este tipo de pacientes también podríamos detectar casos de vasculitis escleral y melting corneal <sup>(3)</sup>

### **Objetivos del estudio**

- Determinar el período de degradación de proteínas del suero autólogo.
- Determinar el tiempo de contaminación del suero autólogo e identificación de microorganismos patógenos.

### **Materiales y Métodos**

#### **Obtención de Suero Autólogo**

Se eligieron 20 sujetos sanos de los cuales se obtiene por medio de venopunción y previa técnica aséptica dos tubos (12 ml) de sangre para la elaboración de suero. Posteriormente se procedió a centrifugar todas las muestras a 10.000 rpm (revoluciones por minuto) y se dejaron reposar durante 5 minutos para obtener así la mayor cantidad de suero.

Se procesaron en condiciones de asepsia 20 muestras de las cuales obtuvimos 2 goteros estériles de cada muestra resultando en 40 goteros con muestras de cada paciente, con una dilución en PBS (Phosphate Buffer Saline; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM fosfato de sodio dibásico, 2 mM fosfato de potasio monobásico y pH de 7.4) estéril de 1:4.

Posteriormente se refrigeraron la mitad de las muestras (n=20) y se mantuvieron a temperatura ambiente las 20 botellas restantes, por lo que cada sujeto contaría con una muestra refrigerada a 4°C y otra muestra a temperatura ambiente aproximadamente 27°C, controlada en cuarto cerrado de laboratorio y cuantificada con termómetro c/12hrs.

### **Criterios de Inclusión**

- Pacientes sanos, sin patología crónica o degenerativa (Diabetes Mellitus, Hipertensión arterial sistémica)
- Ayuno de al menos 8 horas al momento de la toma de muestra
- Ausencia de patologías oculares subyacentes

### **Criterios de Exclusión**

- Pacientes con enfermedades de superficie ocular subyacente
- Pacientes en desacuerdo con el consentimiento informado
- Pacientes inmunocomprometidos ( HIV, Hepatitis, SIDA)
- Pacientes con uso de algún tipo de antibiótico, ya sea tópico o sistémico.

## **Criterios de Eliminación**

- Perdida de muestras durante la realización del estudio
- Muestras insuficientes al momento de la toma inicial

## **Estudios Microbiológicos**

Para la determinación de las cualidades bacteriológicas y pruebas de esterilidad del suero, se obtuvieron muestras directamente desde los goteros a los días 0, 3, 7, 10, 15, 20 y 1 mes. Posteriormente se realizó cultivo de cada muestra en medio BHI (Brain Heart Infusion). De esta forma determinar grados de contaminación por medio de turbidez de muestra, a criterio del investigador.

Los cultivos se revisaron al completar 24 horas, y aquellos con características de contaminación (turbidez) se sometían a tres de medios de cultivo distintos: Agar Chocolate, Agar Sangre y McConckey. Mediante lectura a las 48 horas utilizando la prueba Api® (Biomériux) se determinó el germen colonizador de cada muestra.

## **Determinación de Proteínas**

Se obtuvieron alícuotas de 30 microlitros provenientes de cada gotero de suero autólogo (refrigerado y a temperatura ambiente) en cada día de prueba de esterilidad, las cuales fueron congeladas a  $-37^{\circ}\text{C}$  para la determinación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se determinó por medio de dos técnicas, una de tipo cualitativa y otra de tipo cuantitativa.

De manera inicial con el gel de poliacrilamida, se estableció una dilución de las muestras de suero autólogo de 1:200 con PBS, determinada por un marcador molecular para estimar una concentración adecuada para su lectura.

Las pruebas de electroforesis fueron realizadas a los días 0 y 30, a valorar cambios en el patrón proteico, de observar cambios en esos días, se realizarían pruebas en los días 3, 7, 10, 15 y 20.

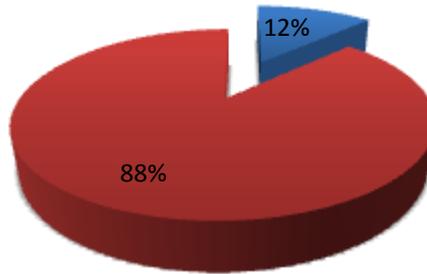
## **Resultados**

### **Estudios Microbiológicos**

Los goteros fueron manipulados de manera aséptica al momento de tomar muestras para las pruebas de esterilidad. Se demostró contaminación al día 13 en 3 goteros (n=11, 15 y 19) representando un 15% de las 20 muestras que se encontraban a temperatura ambiente positivos para *Staphylococcus epidermidis*, los cuales persistieron contaminados hasta el día 30 (última prueba de esterilidad). Una única muestra (#4) demostró contaminación con el mismo germen al día 6, sin embargo en las siguientes pruebas de esterilidad no persistió contaminada. De los 20 goteros de suero autólogo mantenidos bajo refrigeración, en ninguno se encontraron datos de contaminación (Gráfico 1).

## Prueba de Esterilidad

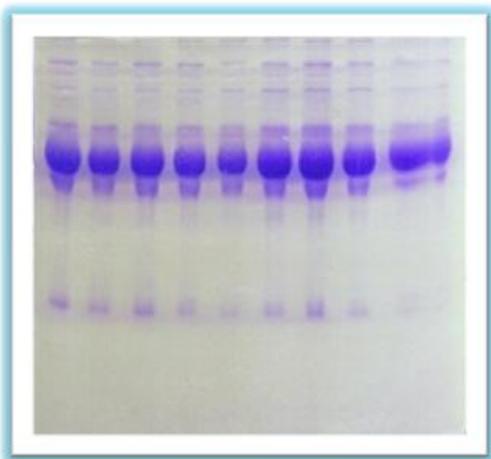
■ Muestras contaminadas por *S. aureus* ■ Muestras no contaminados



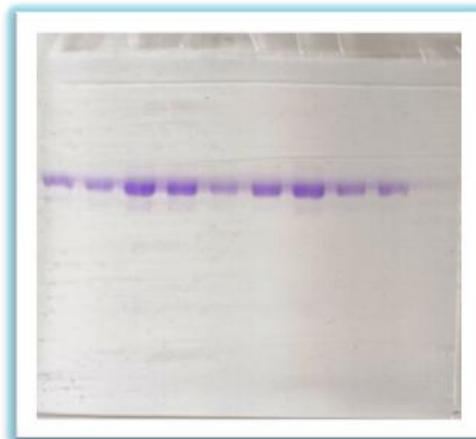
**Gráfico 1.** Cantidad en porcentaje de muestras que mostraron contaminación. 12% de las muestras se contaminaron durante el estudio, mientras que el 88% se encontraron estériles durante el periodo de estudio.

## Determinación de Proteínas

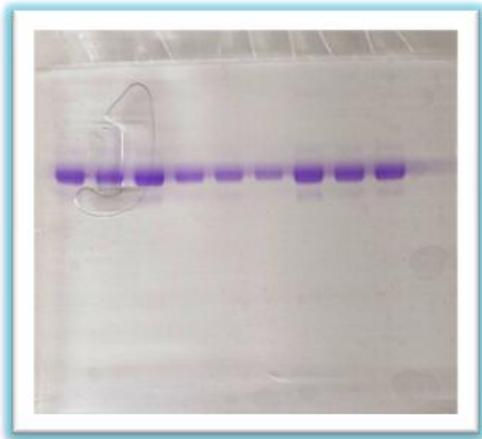
La cuantificación de proteínas demostró cambios mínimos en el patrón de concentración proteica sin alteración importante a pesar de la diversidad entre los ambientes a los cuales se mantuvieron expuestas las muestras.



**Fig. 1.** Gel de corrimiento electroforético de Muestra del día 0 a temperatura ambiente.



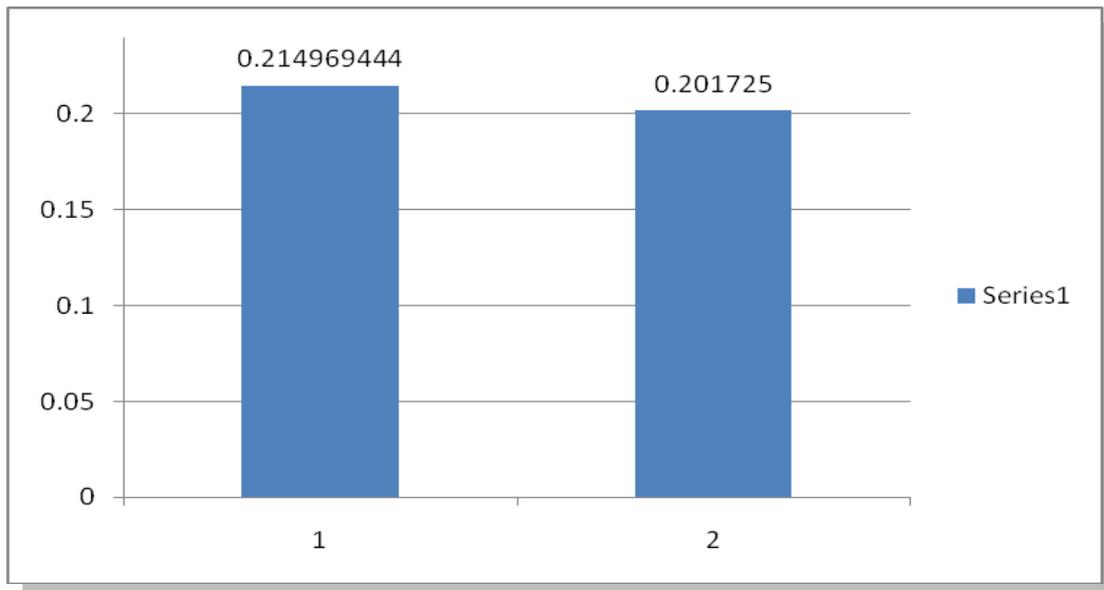
**Fig.2** Gel de corrimiento electroforético de Muestra del día 30 a temperatura ambiente



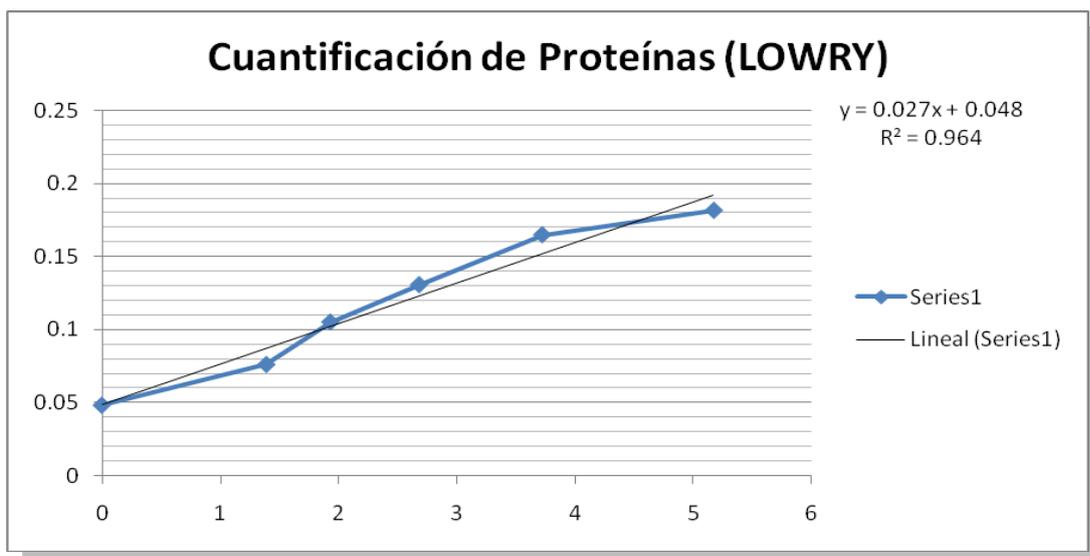
**Fig. 4. Gel de corrimiento electroforético de Muestra de día 30 congelada a -73°C**

Mediante observación de electroforesis, la diferencia no podía ser cuantificada con exactitud, por lo que se determinaron las concentraciones de proteínas en cada muestra de suero por medio del método de Lowry para demostrar una cifra cuantitativa.

Con el método de Lowry se estableció una cuantificación por duplicado de cada muestra correspondiente al día cero y al día 30, leídas a 620nm con resultados de T pareada de 0.10. Con las cifras obtenidas se estableció una diferencia de concentración proteica del día 0 al día 30 no significativa.



**Grafico 2.** Promedio de concentración de proteínas en las muestras, la columna 1 representa promedio de muestras refrigeradas mientras que la columna 2 representa muestras a temperatura ambiente durante 30 días.



**Figura 6.** La Grafica muestra la concentración de una proteína conocida, gammaglobulina, para compararla con la concentración de proteínas en el suero autólogo.

## **Discusión**

El uso de suero autólogo en pacientes con patologías oculares tales como queratoconjuntivitis seca, defectos postquirúrgicos e inclusive el síndrome de sjögren ha demostrado un gran efecto curativo.

Actualmente no existe un medicamento que logre estimular la secreción de lágrimas propias del paciente; por lo tanto, el objetivo principal de los tratamientos es aliviar la sintomatología del paciente<sup>(6)</sup>.

En estudios controlados se comprobó que la necesidad de utilizar medios preservantes o bacteriostáticos como el cloranfenicol al momento de la preparación del suero autólogo no es necesario. El acto más importante es que al momento de la preparación se utilice un protocolo de elaboración y un régimen estricto de esterilidad<sup>(7)</sup>.

La variabilidad de las concentraciones y sus efectos curativos no ha sido demostrada, independientemente de las concentraciones de diversos factores esenciales para los procesos de reepitelización.

Las pruebas de esterilidad mostraron contaminación en 3 muestras del grupo que se encontraba a temperatura ambiente al cumplir el día 13 del estudio en las cuales se identificó el mismo germen patógeno. En las muestras refrigeradas no se evidenció contaminación. Sin embargo de manera subjetiva en las muestras de geles de corrimiento de electroforesis se aprecia una diferencia importante en la concentración de proteínas al momento del análisis.

No podemos excluir que las posibilidades de que el microorganismo fuese inoculado al momento de hacer la siembra en las placas de agar. Esto podría

explicar porqué una de las muestras se presentó como contaminada únicamente en la prueba de esterilidad del día 6.

Existe la posibilidad de que el suero se contamine durante el proceso de preparación. Por lo tanto es necesario que se establezca un protocolo de esterilidad al momento de la elaboración.

De esta manera disminuir las infecciones por gérmenes como el *S. epidermidis*, considerado como patógeno perjudicial a nivel intraocular.

Existe un factor muy importante a ser tomado en cuenta y es que el suero está expuesto al manejo que el paciente le brinda en su hogar, por lo que se debe dar a conocer al paciente que el método mas favorable y seguro es dar un manejo hospitalario a las muestras <sup>(7)</sup>. De no ser posible este método, de la manera mas sencilla, instruir al paciente a dar un manejo adecuado a los goteros de suero autólogo que se le brindan en el centro de salud.

Tsubota *et al* reportaron que la concentración de factores de crecimiento, vitamina A y fibronectina en sueros con concentraciones al 100% y al 20% diluidas en solución salina y refrigeradas a 4°C permanecían intactas <sup>(6)</sup>.

Conforme a los resultados de las pruebas realizadas por Tsubota *et al*, las concentraciones de proteínas en el suero autólogo demostraron niveles mínimos de variabilidad entre el día 0 y el día 30. Esto demuestra una degradación proteica que no se vio afectada por el tiempo de exposición.

## **Conclusiones**

El presente estudio demuestra que el uso de suero autólogo puede ser utilizado de forma segura, con un manejo aséptico adecuado en pacientes con patología corneal persistente que no responde a terapia convencional <sup>(7)</sup>.

Aunque se han descrito algunas complicaciones como el depósito de inmunoglobulinas en la córnea y la presencia de infiltrados periféricos corneales en una paciente con artritis reumatoide <sup>(1)</sup> el tratamiento con suero autólogo es muy bien tolerado y tampoco se han descrito efectos adversos cuando éste se utiliza durante largos períodos de tiempo <sup>(8)</sup>.

El manejo de las muestras de suero brindadas al paciente no hospitalizado representa un factor protector importante para evitar sobreinfecciones en pacientes que han sido sometidos a procedimientos quirúrgicos y con patologías corneales severas.

Los parámetros de producción deben ser óptimos antes de realizar pruebas clínicas controladas para evaluar la terapéutica potencial real de este abordaje a las patologías de la superficie ocular.

La contaminación de las muestras en el presente estudio fue atribuida al manejo, lo que demuestra la presencia de un factor bactericida natural en el suero autólogo <sup>(7)</sup>

## **Bibliografía**

1. HERRERO-VANRELL R. Suero autólogo en el tratamiento del síndrome de ojo seco. Aspectos tecnológicos. Arch Soc Esp Ophthalmol 2008; 83: 521-524
2. Fox RI, Chan R, Michelson JB. Beneficial effects of artificial tears made with autologous serum in patients with keratoconjunctivitis sicca. Arthritis Rheum 1984;27:728-33.
3. B A Noble, R S K Loh, S MacLennan, K Pesudovs, A Reynolds, L R Bridges, J Burr, O Stewart and S Quereshi, Bridges, J Burr. Comparison of autologous serum eye drops with conventional therapy in randomized controlled crossover trial for ocular surface disease. Br J Ophthalmol 2004;88;647-652.
4. Alexander C Poon, Gerd Geerling, John K G Dart, Graham E Fraenkel, Julie T Daniels. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: clinical and in vitro toxicity studies. Br J Ophthalmol 2001;85:1188–1197
5. Jack C Kanski. Oftalmología Clínica. 5ta Ed. ELSEVIER 2004 pag.44-45. 2004
6. G Geerling, S MacLennan and D Hartwig Autologous serum eye drops for ocular surface disorders. Br J Ophthalmol 2004;88;1467-1474.
7. Tsubota K, Goto E, Fujita H, et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. Br J Ophthalmol 1999;83:390–5

8. R Lagnado, A J King, F Donald, H S Dua A protocol for low contamination risk of autologous serumdrops in the management of ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol* 2004;88:464–465.
9. López-García j, García-lozano i, Rivas l3, Martínez-garchitorena. Aplicaciones del suero autólogo en oftalmología. *ARCH SOC ESP OFTALMOL* 2007; 82: 9-20
10. Varma P, Kapoor B, Srivastava U, Saraf K, Kohli J Role of Autologous Serum in Persistent Epithelial Defect following Chemical Burns
11. Smith VA, Rishmawi H, Hussein H, et al. *Tear film MMP accumulation and corneal disease*. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 147-153.
12. S.M. Brown, D.W. Lamberts, T.W. Reid et al. *Neurotrophic and anhidrotic keratopathy treated with substance P and insulinlike growth factor 1 [letter]*. *Arch Ophthalmol* 115 (1997), pp. 926–927.
13. Cavanagh HD, Colley AM. *The molecular basis of neurotrophic keratitis*. *Acta Ophthalmol Suppl* 1989; 192: 115-134.
14. Chicama T, Fukuda K, Morishige N, Nishida T. *Treatment of neurotrophic keratopathy with substancia-P-derived petide (FGLM) and IGF 1*. *Lancet* 1998; 351: 1783-1784.

