



GvHD cronica: il lisato piastrinico nella terapia della superficie oculare

Anna Sangiovanni, Martina Maccarone, Alessio Delfino,
Elena Antoniazzi, Paolo Emilio Bianchi

Clinica Oculistica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCSS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

GvHD cronica: il lisato piastrinico nella terapia della superficie oculare

La cheratocongiuntivite secca (KCS) è la manifestazione oculare più frequente della Graft versus Host Disease (GvHD) cronica. La terapia convenzionale della KCS comprende diversi trattamenti medici e chirurgici, nessuno dei quali è tuttavia terapeutico. I fattori di crescita piastrinici vengono utilizzati in vari campi della medicina per adjuvare e potenziare i normali processi riparativi tissutali. Su questa base si è sviluppata l'idea di impiegare i suddetti fattori di crescita nella terapia della superficie oculare. Nel presente studio abbiamo valutato l'effetto dell'applicazione topica di gel e collirio a base di lisato piastrinico nel trattamento dell'occhio secco secondario a GvHD cronica. Sono stati trattati 9 pazienti refrattari alla terapia convenzionale (lacrime artificiali e siero autologo); tutti i pazienti sono stati valutati prima del trattamento e a 3, 7, 15 e 30 giorni attraverso parametri soggettivi (questionario di autovalutazione) e oggettivi (indagini diagnostiche strumentali). I risultati che abbiamo ottenuto sono eccellenti: la metodica è di semplice esecuzione, sicura, efficace ed economica.

Cronic GvHD: platelet lysate for treatment of ocular surface

Keratoconjunctivitis sicca (KCS) is the most frequent ocular manifestation of chronic Graft versus Host Disease (GvHD). Conventional therapy of KCS includes many medical and surgical treatments, however none is therapeutic. Platelet growth factors are used into various areas of modern medicine to aid and to strengthen regeneration and repair of damaged tissues. On this basis developed the idea of using these growth factor in the treatment of ocular surface. In this study we evaluated the effect of topical application of autologous platelet lysate in its gel's form and collyrium to treat dry eye secondary to chronic GvHD. We treated 9 patients who didn't respond to conventional treatments (topical artificial tears and autologous serum): they were evaluated before the treatment and after 3, 7, 15 and 30 days through subjective (self-assessment questionnaire) and objective (instrumental investigations) parameters. The results obtained are excellent: the method is simple, safe, effective and cheap.

Introduzione

La Graft versus Host Disease (GvHD) rappresenta, insieme alle infezioni, la più importante complicanza del trapianto allogenico di midollo osseo; tale complicanza insorge quando il sistema immunita-

rio del donatore riconosce come estranei (non-self) i tessuti del ricevente e attacca le cellule che li costituiscono [1-3]. La GvHD è una patologia sistemica e viene suddivisa in due forme: una acuta (a-GvHD) che insorge entro i primi cento giorni dal trapianto, e una cronica (c-GvHD) che compare successivamente. L'occhio viene coinvolto nel 60-90% dei casi di GvHD e le complicanze oculari si manifestano più frequentemente ed in modo più grave nella forma cronica rispetto quella acuta [4-6]. La cheratocongiuntivite secca è la manifestazione oculare più frequente della GvHD cronica [7-11]. Il quadro clinico è molto simile a quello che si osserva nella sindrome di Sjogren con una secchezza oculare più o meno pronunciata. Si osservano alterazioni congiuntivali e corneali e sintomi quali bruciore, sensazione di corpo estraneo, fotofobia, dolore, disturbi del visus. Le alterazioni congiuntivali si possono manifestare con una semplice sofferenza epiteliale, con retrazioni cicatriziali e simblefaron sino alla cheratinizzazione della superficie nei casi più gravi. Le manifestazioni corneali possono variare, a seconda della gravità, dall'epiteliopatia puntata ai difetti epiteliali recidivanti, sino ai quadri più gravi di ulcerazione e neovascolarizzazione corneale. I quadri più gravi possono, in alcuni casi, complicarsi con la perforazione [12]. Nella forma cronica di GvHD, il problema da risolvere è la secchezza oculare causata dalla riduzione della produzione lacrimale per infiltrazione infiammatoria della ghiandola lacrimale [13-14].

Terapia convenzionale della GvHD cronica

I principali obiettivi del trattamento dei pazienti con occhio secco sono quelli di migliorare il comfort oculare del paziente e la qualità di vita, e di ristabilire il normale equilibrio omeostatico della superficie oculare e del film lacrimale. La terapia convenzionale dell'occhio secco da GvHD cronica comprende diversi trattamenti sia medici che chirurgici, ognuno dei quali presenta però dei limiti e nessuno può considerarsi terapeutico. I trattamenti medici comprendono: i sostituti lacrimali artificiali, che consentono uno scarso controllo dei sintomi [15-17]; la chiusura dei puntini lacrimali [18-19], dimostrata essere efficace in altre forme di occhio secco, ma non nelle forme infiammatorie come la GvHD poiché determina ristagno dei fattori infiammatori ed i sostituti lacrimali biologici come il siero autologo. Il siero è una componente fluida del sangue che rimane dopo la coagulazione, contiene molti fattori epitelio-trofici, come i fattori di crescita, neurotrofine, vitamine, immunoglobuline, e proteine di matrice extracellulare coinvolte nel mantenimento del benessere della superficie oculare. Inoltre quando ha origine autogena, manca di antigenicità. Il siero autologo è stato dimostrato essere efficace nel controllo dei sintomi, ma non sul danno corneale in atto, richiede inoltre un'alta frequenza di instillazioni [20-24]. I trattamenti chirurgici comprendono: la cheratoplastica, indicata solo nei casi di perforazione a causa della bassa percentuale di successo e dei rischi elevati [25] e l'innesto di membrana amniotica, metodica scelta in caso di gravi ulcere con rischio di perforazione, ma gravata da un'alta frequenza di reinterventi e comunque non risolutiva [26]. L'uso topico dei fattori di crescita piastrinici è noto promuovere ed accelerare la riparazione tissutale. Questi sono infatti utilizzati in diversi campi della medicina: in odontoiatria e chirurgia maxillo-facciale, in chirurgia ortopedica, nella terapia riparativa delle lesioni cutanee. Acquisizioni recenti in termini di fisiopatologia di base hanno portato a considerare l'impiego del siero ricco di fattori di crescita piastrinici, in forma liquida di collirio o di gel, in ambito oftalmologico, per il trattamento delle lesioni della superficie oculare, quali quelle derivanti da GvHD cronica [27]. Questa rappresenta un'opzione terapeutica alternativa valida poiché che non si limita ad essere un sostituto lacrimale di origine biologica, ma una vera e propria terapia eziologica. In analogia con quanto avviene per gli altri tessuti dell'organismo, infatti, i meccanismi di riparazione della superficie oculare coinvolgono le diverse componenti cellulari mediante il rilascio di citochine e fattori di crescita, come l'Interleuchina 1 (IL1), l'alfa Tumor Necrosis Factor (TNFalfa), l'epidermal growth factor (EGF), il platelet derived growth factor (PDGF), così come con il rilascio di collagenasi, metalloproteinasi ed altri enzimi. L'uso topico di tali elementi cellulari adiuvanti e potenzianti i normali processi riparativi tissutali permette quindi una più rapida ed efficace guarigione del tessuto corneale e congiuntivale danneggiato.

Scopo dello studio

Il presente studio si è posto come obiettivi clinici:

- la valutazione della fattibilità della procedura di preparazione del collirio e del gel piastrinico e della sicurezza nell'impiego topico oculare dei fattori di crescita di origine piastrinica in pazienti affetti da patologie oculistiche caratterizzate da danno dell'epitelio corneale;
- la valutazione dell'efficacia dell'utilizzo dei fattori di crescita piastrinici, nel contesto della terapia del danno corneale, attraverso la valutazione della riepitelizzazione corneale e la riduzione dei tempi di guarigione;
- la verifica dell'impatto di tale approccio terapeutico sulla spesa sanitaria pubblica, in base alla riduzione dei giorni di degenza e dei farmaci impiegati.

Materiale e metodi:

Criteria di inclusione ed esclusione

I soggetti arruolati nello studio devono rispettare precisi criteri di inclusione e di esclusione. Tutti i pazienti devono avere un'età uguale o superiore a 18 anni; dare il consenso informato scritto alla terapia; mostrare segni e sintomi legati a sindrome da occhio secco secondario a GvHD oculare refrattario alle convenzionali terapie con lacrime artificiali o siero autologo. Deve essere inoltre documentata l'assenza di infezioni sistemiche in atto al momento della preparazione dell'emocomponente e della sua applicazione e l'assenza di infezioni oculari in atto al momento del trattamento. Sono stati esclusi dall'arruolamento i pazienti affetti da piastrinopatie e/o piastrinopenie, congenite o acquisite e comorbilità in terapia con farmaci che abbiano effetti sulla funzionalità piastrinica (es. FANS, acido acetilsalicilico).

Preparazione del gel piastrinico e del collirio a base di lisato piastrinico

Per la preparazione del gel piastrinico, vengono prelevati dal paziente 27 ml di sangue intero, mediante siringa da 30 ml, preventivamente caricata con 3 ml di anticoagulante (ACD-A). Il sangue anticoagulato viene trasferito nel separatore di piastrine, il quale viene centrifugato, consentendo la separazione del plasma a basso contenuto di piastrine (PPP) e del plasma ricco di piastrine (PRP) e ricavando circa 3-4 ml di PRP (componente A). Inoltre, da ciascun paziente, vengono prelevati altri 10 ml di sangue intero, per il recupero del crioprecipitato, e 1 ml in provetta con EDTA (Vacutest Emo Plast) per l'esame emocromocitometrico. La provetta contenente 10 ml di sangue intero viene centrifugata in modo da ottenere circa 2 ml di crioprecipitato, che risulta essere ricco di fibrinogeno, fibronectina ed altri fattori procoagulanti, alla base della formazione della colla di fibrina. Al crioprecipitato viene aggiunto il 20% di calcio cloruro (1g/10ml), ottenendo il componente B. Il PRP (componente A) e il crioprecipitato ricalcificato (componente B), contenuti nelle due siringhe, vengono inoculati in una piastra petri sterile, ove le due parti vengono miscelate ottenendo la formazione del gel piastrinico. Il gel piastrinico può essere suddiviso in piccoli frammenti, ciascuno dei quali viene dispensato in una piastra petri da 35 mm sterile dando origine ad aliquote monouso, che vengono conservate in congelatore dedicato tra -40° e -80°C. Per la preparazione del collirio a base di siero autologo arricchito di piastrine, i pazienti vengono sottoposti ad un prelievo di sangue in provette da sangue intero (Vacutest® 9 ml), cui è stato preventivamente aggiunto anticoagulante (ACD-A) in misura pari a 1 ml per provetta. Le provette vengono successivamente centrifugate e da ciascuna si estrae il plasma ricco di piastrine che viene concentrato in un'unica falcon da 50 ml. La falcon viene sigillata con parafilm, posta all'interno di un secondo

involucro in plastica e viene eseguito un passaggio di congelamento-scongelo, che determina la rottura delle piastrine e permette la fuoriuscita dei fattori di crescita, contenuti all'interno dei granuli piastrinici (lisato piastrinico). Al termine dello scongelamento, si procede alla diluizione (al 30%-40%), mediante l'aggiunta di sodio cloruro 0.9% (Diac). Il lisato piastrinico diluito viene suddiviso in cryovials ottenendo aliquote monouso sterili da 1 ml, che devono essere conservate in congelatore.

Trattamento e valutazione dei pazienti

Al momento dell'arruolamento nello studio, il candidato paziente viene sottoposto ad una valutazione iniziale mediante l'esecuzione dei seguenti test diagnostici: esami ematochimici completi, acutezza visiva, biomicroscopia del segmento anteriore con valutazione della cute palpebrale, ciglia, menischi lacrimali, muco sulla superficie oculare; test di Schirmer I e II in millimetri (patologici se inferiori a 10 mm), Tear Film Break Up Time in secondi (TFBUT, patologico se inferiore a 5 secondi), colorazione vitale delle superficie oculare con fluoresceina e verde di lissamina quantificata con l'Oxford Scale con scala 0-4 (patologico se maggiore di 1). Ad ogni paziente viene somministrato inoltre un questionario di autovalutazione, in cui vengono presi in considerazione i seguenti sintomi: bruciore, dolore, iperemia, prurito, secchezza persistente, fotofobia, lacrimazione, senso di corpo estraneo, presenza di filamenti o secrezione, secondo la seguente scala: scomparsa; migliorata; lievemente migliorata; invariata; peggiorata. Durante il periodo di ricovero il gel piastrinico viene applicato sulla superficie corneale, tramite l'utilizzo di una pinza corneale sterile e posizionamento di bendaggio compressivo ed occlusivo, in misura pari a tre aliquote monouso al dì per tre giorni. Concluso il periodo di ricovero ospedaliero, della durata di tre giorni, il paziente viene rivalutato, mediante questionario di autovalutazione e test diagnostici. Successivamente la valutazione viene ripetuta a 7, 15 e 30 giorni dalla dimissione, periodo durante il quale viene eseguita l'instillazione di siero autologo arricchito di piastrine per 4 volte al giorno. In pratica viene valutata l'efficacia del trattamento con gel piastrinico e collirio, sulla base sia di parametri fisici soggettivi (secondo le informazioni fornite dal paziente stesso mediante il questionario di autovalutazione) sia di parametri oggettivi (secondo la valutazione specialistica ottenuta mediante le indagini diagnostiche strumentali).

Analisi statistica

I dati quantitativi sono stati sintetizzati con media e deviazione standard in quanto normalmente distribuiti. Le variazioni nel tempo dei vari parametri sono state analizzate con l'analisi della varianza per misure ripetute. I confronti tra due sono stati effettuati con un test t di student corretto. Tutti i test sono a due code e il limite di significatività scelto è stato quello usuale del 5% (P-value <0.05); Le analisi sono effettuate con il software STATA (vers: 9; Stata Corporation, College Station, 2008, Texas, USA).

Risultati

Sono stati arruolati nello studio 9 pazienti tutti affetti da GvHD cronica associata a Sindrome Sicca Oculare, secondaria a trapianto allogenico di midollo osseo. L'età dei 9 pazienti arruolati, 6 maschi e 3 femmine, è compresa tra i 16 e i 61 anni, con una mediana di 41 anni. Dagli esami emocromocitometrici effettuati per ogni paziente, il valore medio delle piastrine è risultato pari a $170 \times 10^3/\mu\text{l}$, con un range compreso tra $110 \times 10^3/\mu\text{l}$ e $530 \times 10^3/\mu\text{l}$, mentre la media dell'ematocrito è stata pari al 36%, con un range del 32-46%. In particolare, nessuno dei 9 pazienti ha presentato, al momento dell'inclusione dello studio e per tutta la durata del follow-up, valori di emoglobina e piastrine su sangue periferico tali da controindicare l'esecuzione del prelievo o la preparazione del lisato piastrinico. Inoltre, non

sono stati documentati pazienti che, a seguito di valori normali di emoglobina e piastrine al momento dell'arruolamento nel protocollo, abbiano presentato anemia e/o piastrinopenia iatrogene da attribuirsi alla preparazione del lisato piastrinico e/o ai prelievi ad essa associati. Per ciascun paziente è stato quindi sempre possibile allestire sia il gel che il collirio a base di lisato piastrinico autologo. Per tutti i 9 pazienti inclusi nello studio, non vi è stata documentazione di alcuna reazione avversa grave, da porsi in relazione con il trattamento. In particolare, non è stato registrato alcun episodio infettivo sistemico né alcun tipo di infezione oftalmica, sia di tipo batterico che virale, a seguito dell'instillazione del preparato. Per quanto riguarda i test diagnostici strumentali, confrontando i rispettivi valori a T0 vs T3, T7, T15 e T30 (Tabella 1), è stato riscontrato un miglioramento statisticamente significativo del TFBUT (Figura 1), delle colorazioni vitali con fluoresceina e verde di lissamina (Figura 2) e dell'acuità visiva (Figura 3) ($P < 0.001$ per tutti i valori presi in esame). La medesima valutazione della secrezione lacrimale mediante test di Shirmer non ha evidenziato variazioni statisticamente significative ($P = 0.592$ per tutti i valori presi in esame). Il confronto dei parametri a T3 vs T30 (periodo di somministrazione del lisato piastrinico) ha dimostrato un differenza statisticamente significativa nel TFBUT ($P < 0.0001$) e nell'acuità visiva ($P < 0.0002$). Tale significatività non è stata riscontrata nel test di Shirmer ($P < 0.701$) e per le colorazioni vitali con fluoresceina ($P < 0.518$) e verde di lissamina ($P < 0.313$). Per quanto riguarda la sintomatologia descritta (non sottoposta ad indagine statistica) il 100% dei casi ha mostrato un netto miglioramento della secchezza oculare soprattutto nella fase iniziale dell'applicazione del gel, ma anche durante tutto il follow-up.

Discussione

Lo studio è stato condotto utilizzando il siero autologo arricchito di piastrine, rispettivamente sotto forma di gel e di collirio. La differenza tra queste due formulazioni è data dal fatto che il siero arricchito di piastrine sotto forma di gel possiede una maggiore concentrazione di fattori di crescita rispetto al collirio e che la sua forma gelificata, non essendo soggetta alla clearance lacrimale, permette la dismissione continuativa dei fattori di crescita. In questo momento il gel e il lisato piastrinico rappresentano le uniche formulazioni disponibili che contengono tutti i fattori di crescita piastrinici. Il mercato offre solamente singoli fattori di crescita di origine ricombinante. Un'ulteriore peculiarità è il corretto rapporto intercorrente tra i fattori di crescita, condizione, quest'ultima, indispensabile per un'efficace processo riparativo. I risultati ottenuti trattando i 9 pazienti arruolati nello studio hanno dimostrato la fattibilità e la sicurezza dell'impiego del lisato piastrinico autologo in ambito oftalmologico. In particolare, l'attento monitoraggio emocromocitometrico di ciascun paziente ha consentito sia di confermare di volta in volta l'eleggibilità all'esecuzione del prelievo ed alla preparazione del gel piastrinico autologo, sia di escludere che, come effetto del trattamento, si presentassero anemia o piastrinopenia iatrogene. È sempre stato possibile ottenere entrambe le preparazioni, ma è necessario menzionare che, rispettando i criteri di esclusione, non sono stati ammessi nello studio pazienti che, per concomitanti comorbidità, assumevano farmaci con effetti sulla funzionalità piastrinica, in particolar modo antiaggreganti. Di grande importanza è l'aver dimostrato che, lavorando in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare ed istruendo attentamente il paziente circa l'utilizzo del siero autologo arricchito di piastrine a domicilio, non si sono verificati episodi di contaminazione microbica del prodotto o del paziente in vivo, nonostante nessuno dei due preparati (gel e collirio) contenesse alcun tipo di antibiotico o disinfettante. A ciò si aggiunga l'assenza di qualsiasi tipo di reazioni avversa. Vi è stata una netta riduzione dei giorni di degenza (3 giorni) rispetto alle convenzionali terapie (10 giorni) permettendo al paziente un più rapido ritorno alla vita sociale e lavorativa e potendo effettuare la seconda parte della terapia a

domicilio. Nessuno dei pazienti è stato eliminato dallo studio per scarsa adesione al trattamento o al follow-up, questo probabilmente è da ascrivere all'efficacia della terapia che può essere riscontrata, sin dall'inizio del trattamento, in prima persona dal paziente come una riduzione della sintomatologia dolorosa ed un aumento dell'acuità visiva. Dopo aver confermato la fattibilità e la sicurezza del gel piastrinico e del collirio a base di lisato piastrinico autologo, il nostro studio ne ha anche dimostrato l'efficacia. È stato evidenziato un significativo aumento del TFBUT il quale riflette una ritrovata stabilità del film lacrimale in quanto la terapia con gel piastrinico va ad agire sia interrompendo il circolo vizioso infiammazione - instabilità del film lacrimale - iperosmolarità lacrimale, sia ricostituendo l'integrità dell'epitelio corneale. Questo è dimostrato anche dalle colorazioni vitali con lissamina e fluoresceina (colorano rispettivamente le aree di sofferenza e necrosi congiuntivale e le discontinuità dell'epitelio corneale), le quali già dopo i tre giorni di trattamento con gel hanno mostrato un netto miglioramento passando da un grado severo a uno moderato-lieve della Oxford Scale, stabilizzandosi ulteriormente durante il trattamento domiciliare con siero autologo arricchito di piastrine. Nessun miglioramento, come atteso, è stato riscontrato nello Schirmer test dato che la ridotta secrezione lacrimale è causata dalla fibrosi della ghiandola lacrimale dovuta alla presenza di T-linfociti periduttali (CD4 e CD8) e fibroblasti contenenti antigeni, ed è quindi irreversibile, anche se un blando aumento della secrezione lacrimale è stato evidenziato grazie alla fotochemioterapia sistemica. I pazienti hanno riferito sin dall'inizio della terapia una netta riduzione della sintomatologia dolorosa, con attenuazione del bruciore, della sensazione di corpo estraneo e della fotofobia. L'impatto sulla funzione visiva è stato altrettanto importante ed è stato rilevabile non solo come un aumento dell'acuità visiva ad alto contrasto, misurata in modo standard, ma è stata anche riferita dal paziente come un'augmentata abilità ad adempiere compiti richiedenti un'intensa concentrazione visiva, come la lettura, l'uso del computer, il lavoro professionale, la guida notturna o la visione della televisione, con un miglioramento della vita sociale. La breve durata della terapia e la sua efficacia hanno portato ad una diminuzione della spesa sanitaria, non solo per la riduzione del periodo di degenza ospedaliera, ma anche per la diminuzione degli accessi spontanei in pronto soccorso oculistico, delle visite effettuate presso diversi specialisti oftalmologi e per una più efficace prevenzione delle complicanze, che spesso richiedono un approccio chirurgico, il quale è gravato da maggiore invasività, costi sanitari elevati e più lento reinserimento nella vita lavorativa e sociale oltre a non rappresentare una soluzione terapeutica definitiva. I risultati del presente studio ci consentono di concludere che l'uso topico dei fattori di crescita piastrinici, in forma di gel e collirio, per il trattamento delle lesioni della superficie oculare secondarie a GvHd cronica è una metodica di semplice esecuzione, sicura, efficace ed economica.

Tabelle e figure

Tabella 1. Valutazione del Tear Film Break Up Time, test di Schirmer I, colorazione vitale delle superficie oculare con fluoresceina e verde di lissamina (Oxford Scale) ed acuità visiva al momento dell'arruolamento e a 3, 7, 15 e 30 giorni di follow-up.

ID PZ	EYE	TFBUT (secondi)					SHIRMER I (millimetri)					FLUORESCEINA (Oxford Scale 0-4)					LISSAMINA (Oxford Scale 0-4)					ACUITÀ VISIVA (decimi)					
		<i>follow-up</i>					<i>follow-up</i>					<i>follow-up</i>					<i>follow-up</i>					<i>follow-up</i>					
		0	3	7	15	30	0	3	7	15	30	0	3	7	15	30	0	3	7	15	30	0	3	7	15	30	
1	OD	2	4	4	5	5	2	3	2	3	3	3	0	1	1	1	3	0	1	1	1	1	2	8	9	9	8
	OS	0	3	4	5	7	1	1	2	3	2	4	1	1	1	1	4	1	1	1	1	1	0	6	8	10	8
2	OD	2	5	6	8	8	1	2	2	2	1	3	0	0	1	1	3	0	0	1	1	1	5	9	8	8	
	OS	1	7	6	7	7	1	2	2	3	3	4	1	1	1	2	4	1	1	1	2	0	5	7	7	6	
3	OD	2	6	5	6	7	1	1	2	2	3	4	1	1	0	1	4	1	1	0	1	1	6	8	9	8	
	OS	3	5	6	7	7	2	2	2	1	1	3	1	1	1	2	3	1	1	1	1	2	9	8	8	8	
4	OD	2	7	6	8	8	2	3	2	3	2	3	0	0	1	1	3	0	0	1	1	3	10	9	9	10	
	OS	0	3	5	5	5	3	3	3	3	2	4	0	1	0	0	4	0	1	0	0	0	7	9	9	9	
5	OD	1	4	5	6	6	3	2	2	3	3	4	1	0	1	1	4	1	0	1	0	1	4	6	7	8	
	OS	3	5	5	5	5	4	4	5	4	4	3	0	1	0	0	3	0	1	0	0	1	5	7	9	9	
6	OD	2	6	7	8	6	3	3	4	3	2	4	1	0	0	1	4	1	0	0	1	1	6	10	10	10	
	OS	1	2	3	5	4	2	3	4	3	2	4	2	1	0	0	4	1	1	0	0	0	4	8	9	9	
7	OD	3	5	4	6	6	2	4	4	3	2	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1	7	8	9	10	
	OS	1	5	5	7	7	2	3	4	4	3	4	0	1	1	0	4	0	1	1	0	0	8	8	8	9	
8	OD	2	4	6	6	6	2	4	5	4	3	4	1	0	0	1	4	1	0	0	0	1	2	2	2	2	
	OS	1	6	6	5	6	2	1	1	4	3	4	0	1	0	0	4	0	1	0	0	1	6	7	8	10	
9	OD	2	5	6	6	6	2	2	1	1	2	4	1	1	0	1	4	1	1	0	1	1	6	8	8	9	
	OS	1	5	6	6	6	1	1	2	2	2	4	0	1	1	0	4	0	1	1	0	0	7	8	8	9	

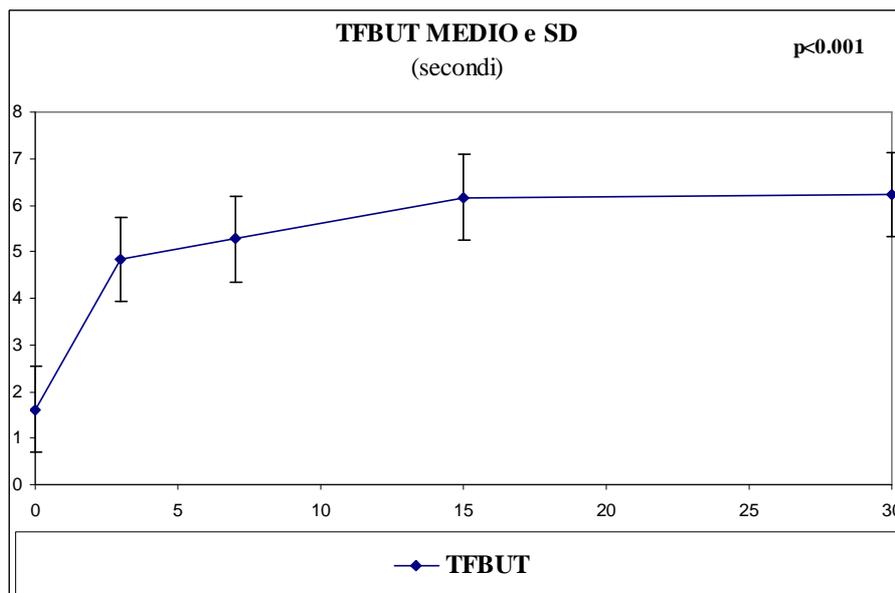


Figura 1. Valutazione del Tear Film Break Up Time al momento dell'arruolamento e a 3, 7, 15 e 30 giorni di follow-up.

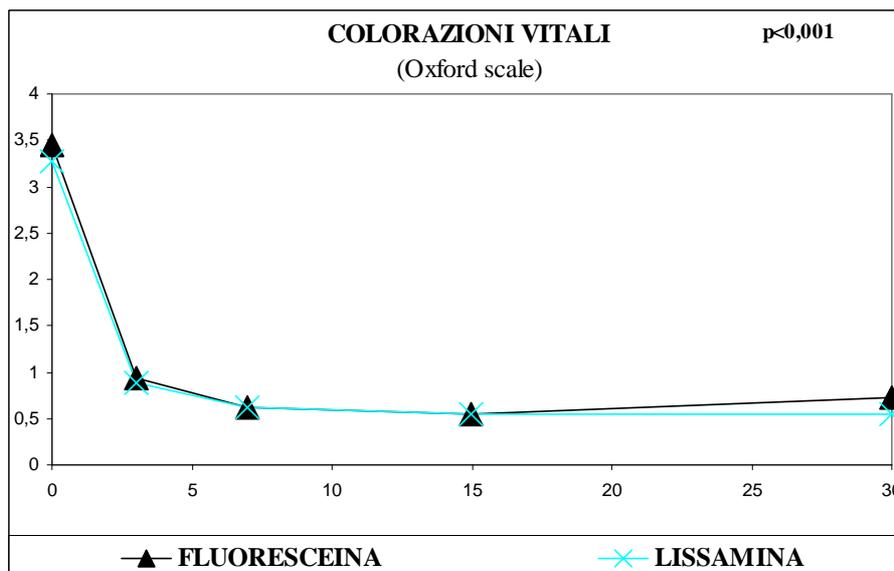


Figura 2. Valutazione della colorazione vitale delle superficie oculare con fluoresceina e verde di lissamina (Oxford Scale) al momento dell'arruolamento e a 3, 7, 15 e 30 giorni di follow-up.

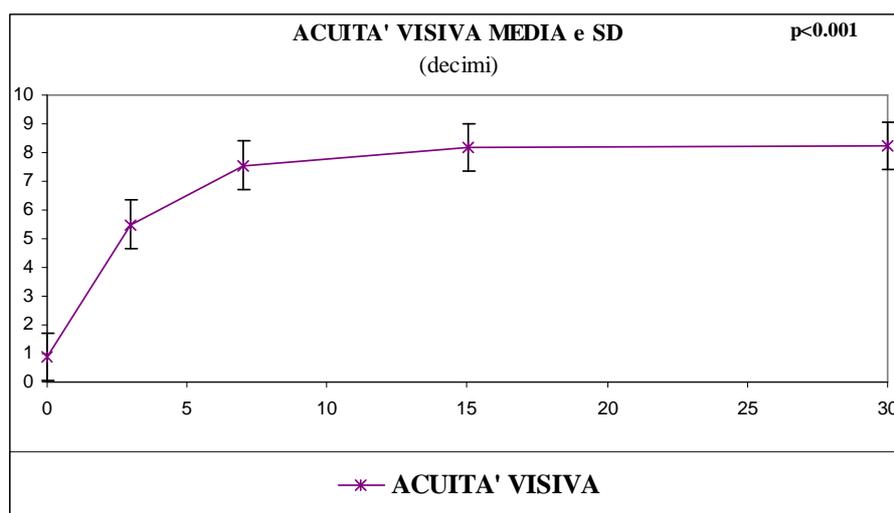


Figura 3. Valutazione dell'acuità visiva al momento dell'arruolamento e a 3, 7, 15 e 30 giorni di follow-up.

Bibliografia

1. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1967;62:21-78.
2. Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
3. Sullivan KM. Acute and chronic graft-versus-host disease in man. *Int J Cell Cloning* 1986;4(Suppl. 1):42-93.
4. Anderson NG, Regillo C. Ocular manifestations of graft versus host disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:503-507.
5. Jack MK, Jack GM, Sale GE et al. Ocular manifestations of graft-v-host disease. *Arch Ophthalmol* 1983;101:1080-1084.
6. Franklin RM, Kenyon KR, Tutschka PJ et al. Ocular manifestations of graft-vs-host disease. *Ophthalmology* 1983;90:4-13.
7. Lemp MA. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. *CLAO J* 1995;21:221-232.
8. Begley CG, Chalmers RL, Abetz L et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-4761.
9. Rieger G. The importance of the precorneal tear film for the quality of optical imaging. *Br J Ophthalmol* 1992;76:157-158.

10. Tutt R, Bradley A, Begley C et al. Optical and visual impact of tear break-up in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:4117-4123.
11. Goto E, Yagi Y, Matsumoto Y et al. Impaired functional visual acuity of dry eye patients. *Am J Ophthalmol* 2002;133:181-186.
12. Ogawa Y, Okamoto S, Wakui M et al. Dry eye after haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Ophthalmol* 1999;83:1125-1130.
13. Ogawa Y, Kuwana M, Yamazaki K et al. Periductal area as the primary site for T-cell activation in lacrimal gland chronic graft-versus-host disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:1888-1896.
14. Baudouin C. The pathology of dry eye. *Surv Ophthalmol* 2001;45(Suppl. 2):S211-220.
15. Gilbard JP, Rossi SR, Heyda KG. Ophthalmic solutions, the ocular surface, and a unique therapeutic artificial tear formulation. *Am J Ophthalmol* 1989;107:348-355.
16. Gilbard JP. Human tear film electrolyte concentrations in health and dry-eye disease. *Int Ophthalmol Clin* 1994;34:27-36.
17. Albietsz JM, Bruce AS. The conjunctival epithelium in dry eye subtypes: effect of preserved and non-preserved topical treatments. *Curr Eye Res* 2001;22:8-18.
18. Freeman JM. The punctum plug: evaluation of a new treatment for the dry eye. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 1975;79:OP874-879.
19. Yen MT, Pflugfelder SC, Feuer WJ. The effect of punctal occlusion on tear production, tear clearance, and ocular surface sensation in normal subjects. *Am J Ophthalmol* 2001;131:314-323.
20. Ogawa Y, Okamoto S, Mori T 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.
21. Rocha EM, Pelegrino FS, De Paiva CS et al. GVHD dry eyes treated with autologous serum tears. *Bone Marrow Transplant* 2000;25:1101-1103.
22. Tsubota K, Goto E, Fujita H et al. Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999;83:390-395.
23. Liu L, Hartwig D, Harloff S, Herminghaus P et al. An optimised protocol for the production of autologous serum eyedrops. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005;243:706-714.
24. Noble BA, Loh RS, MacLennan S 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.
25. Portnoy S, Insler M, Kaufman HE. Surgical management of corneal ulceration and perforation. *Surv Ophthalmol* 1989;34:47-58.
26. Peris-Martínez C, Menezo JL, Díaz-Llopis M et al. Multilayer amniotic membrane transplantation in severe ocular graft versus host disease. *Eur J Ophthalmol* 2001;11:183-186.
27. Martínez-Zapata MJ, Martí-Carvajal A, Solà I et al. Efficacy and safety of the use of autologous plasma rich in platelets for tissue regeneration: a systematic review. *Transfusion* 2009;49:44-56.