

Criopreservación y Vitricación de Córneas Humanas  
Cryopreservation and Vitrification of Human Cornea

Alba Area Crespo  
Julio 2016



Facultad de Ciencias.

Servicio de Criobiología del Hospital Materno- Infantil Teresa Herrera.

Criopreservación y vitrificación de córneas humanas.  
Cryopreservation and vitrificación of human cornea.

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER Alba Area Crespo.

Directora: Dra. Esther Rendal Vázquez.

Co-Directora: Dra. María Arufe Gonda.

Dra. ESTHER RENDAL VÁZQUEZ y Dra. MARÍA ARUFE GONDA en calidad de tutor/es de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

A Coruña, Julio 2016.

NOMBRE  
ARUFE GONDA  
MARIA  
CARMEN - NIF  
36116727B

Firmado digitalmente por  
NOMBRE ARUFE GONDA MARIA  
CARMEN - NIF 36116727B  
Nombre de reconocimiento  
(DN): cn=ES, ou=FNMT, ou=FNMT  
Clase 2 CA, ou=501090071,  
cn=NOMBRE ARUFE GONDA  
MARIA CARMEN - NIF  
36116727B  
Fecha: 2016.07.08 09:44:20  
+01'00'

## ÍNDICE

### INTRODUCCIÓN

1. La córnea. ....	Pág. 1
2. Trasplante corneal. ....	Pág. 2
2.1. Trasplante corneal y tipos de trasplante. ....	Pág. 2
2.2. Criterios exclusión de donantes de córneas. ....	Pág. 3
2.3. Datos clínicos. ....	Pág. 4
3. Papel de los Bancos de Tejidos en los trasplantes de córneas. ....	Pág. 5
3.1. Evaluación de la estructura corneal. ....	Pág. 5
3.2. Conservación/almacenamiento de córneas. ....	Pág. 7
4. Criopreservación. ....	Pág. 7
4.1. Desventajas de la criopreservación. ....	Pág. 9
5. Vitricación. ....	Pág. 10

<b>OBEJTIVOS</b> .....	Pág. 11
------------------------	---------

### MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de tejidos y grupos de estudio. ....	Pág. 12
2. Protocolo de preparación de córneas para trasplante.	
2.1. Evaluación. ....	Pág. 13
2.2. Criopreservación.	
2.2.1. Criopreservación en medio con albúmina. ....	Pág. 14
2.2.2. Criopreservación en medio sin albúmina. ....	Pág. 15
2.2.3. Descongelación. ....	Pág. 16
2.3. Vitricación.	
2.3.1. Vitricación con solución VS83. ....	Pág. 16
2.3.2. Vitricación con solución VS55. ....	Pág. 17
2.3.3. Descongelación. ....	Pág. 18
3. Análisis histológico de las córneas tras su descongelación. ....	Pág. 18

## RESULTADOS

1. Examen lámpara de hendidura y microscopio especular. .... Pág. 19
2. Examen histológico. .... Pág. 27
3. Aplicaciones clínicas de córnea criopreservada. .... Pág. 29

DISCUSIÓN..... Pág. 29

CONCLUSIONES ..... Pág. 33

AGRADECIMIENTOS ..... Pág. 34

BIBLIOGRAFÍA ..... Pág. 34

## INTRODUCCIÓN

### **1. LA CORNEA**

La córnea es la principal estructura del polo anterior del ojo y como tal es una de las primeras responsables de la vía óptica de la función visual. Tiene un diámetro de 12 mm y un espesor de alrededor de 0.5 mm. Los rayos de luz pasan a través de ella y de la pupila y se enfocan en la retina. Para que esto suceda así la córnea ha de ser transparente y tener la curvatura adecuada, de lo contrario la visión puede verse gravemente afectada. Se trata de una estructura a vascular.

Es un órgano complejo formado por cinco capas histológicas:

1. El epitelio es la capa más superficial, tiene una función óptica de transparencia y fuerte poder refractivo; de protección física frente a traumas externos, actúa como barrera a los fluidos y microorganismos y es un estabilizador de lágrima por las microvellosidades que tiene. Es un epitelio especificado compuesto por varias capas de células (Villa, C. 2010).
2. La membrana de Bowman: es un tejido transparente constituido por fibrillas uniformes de tipo I y que no posee capacidad de regeneración.
3. El estroma: está formado por colágeno, queratocitos y matriz, constituye el 90% del espesor de la córnea (Villa, C. 2010).
4. La membrana de Descemet: es la membrana basal del endotelio y las irregularidades que presenta se reconocen con el nombre de córnea gutata. Las gutas son una especie de agujeros en las que no existen células
5. El endotelio.

El recién nacido tiene muchas células endoteliales, estas células son las que mantienen transparente la córnea. El endotelio es una monocapa de células homogéneas muy ordenadas y compactas, que deben ser del mismo tamaño y de forma hexagonal que no se reproducen in vivo por lo que las células vecinas llenan el espacio aumentando su tamaño, cuántas menos células haya más grandes serán y consta de 3,500 a 4,000 células por milímetro cuadrado, cifra que disminuye paulatinamente en relación con el aumento de la edad.

La función principal del endotelio es mantener la deturgescencia corneal que es un requisito imprescindible para mantener la transparencia, ya que cuando la estructura corneal se vuelve opaca dificulta la entrada de la luz y empeora la visión. El endotelio realiza esta función mediante dos mecanismos; uno actúa como una barrera mecánica y el otro como una bomba que extrae el exceso de fluidos que penetran en la córnea.

Todas estas capas deben ser claras y uniformes para que la córnea funcione correctamente. En numerosas ocasiones, la córnea se ve afectada por determinadas patologías, que convierte a las enfermedades de la córnea en un grave problema social, debido no sólo a su alta prevalencia sino también a la edad de los pacientes afectados. Todas las capas de la córnea pueden afectarse individualmente o en combinación:

- Pueden aparecer cicatrices en la capa central (estroma) a consecuencia de heridas, infecciones o ciertas distrofias. Pueden aparecer alteraciones de la forma y el grosor de la córnea lo que da lugar a forma irregular de la misma como en el queratocono.
- La capa posterior de la córnea (endotelio) puede resultar inadecuada para mantener su acción de bombeo (fracaso corneal o descompensación) como resultado de alteraciones determinadas genéticamente como la distrofia de Fuchs o traumatismo como la cirugía.
- Puede aparecer un agujero perforación en la capa central (estroma) como resultado de una infección o inflamación. Si esto no se trata con rapidez el resultado es la ceguera.
- Puede volverse opaca debido a daño de las células madre de donde se originan las células que dan lugar a la piel (epitelio) debido a inflamación grave o a una agresión química.

## **2. TRANSPLANTE CORNEAL**

### **2.1. Trasplante corneal y tipos de trasplante**

Debido a su carácter avascular y su escasa capacidad de regeneración las lesiones graves de la córnea son muy difíciles de reparar y en ocasiones desembocan como ya hemos mencionado en un leucoma o lesión cicatricial que puede dificultar la visión. Por este motivo el único tratamiento efectivo para gran parte de las lesiones corneales graves es el trasplante corneal alogénico, queratoplastia. El trasplante corneal es la intervención mediante la cual se sustituye tejido corneal dañado o enfermo por tejido corneal sano procedente de un donante. Entre los objetivos que se pretenden alcanzar al realizar un trasplante de córnea se encuentran mejorar la agudeza visual, restaurar la morfología de la

córnea o eliminar tejido inflamado que no responde al tratamiento médico. Las nuevas técnicas en el trasplante de córnea exigen un aumento en la disponibilidad de tejido de calidad.

Existen dos tipos de trasplante corneal: de espesor total (penetrantes) o de espesor parcial (lamelares). Los trasplantes penetrantes es la única alternativa cuando todas las capas corneales están afectadas. La desventaja es que el endotelio trasplantado es el principal estímulo para el rechazo. Los de espesor parcial son los más utilizados actualmente. Dentro de los trasplantes lamelares se puede diferenciar dos tipos de procedimientos: aquellos que reemplazan la parte anterior de la córnea (epitelio y estroma) (queratoplastia lamelar anterior profunda DALK) y aquellos que reemplazan la capa posterior (endotelio) DSAEK (endotelio y capa fina de estroma) y DMEK (endotelio).

## **2.2. Criterios de exclusión de los donantes de corneas**

En general se dispone de unos criterios de selección básicos, marcados por la edad, o por la ausencia de enfermedades del tipo HIV o hepatitis. El aviso al coordinador de trasplantes es inmediato al fallecimiento. En ese primer contacto con la coordinación, bien se hace una valoración telefónica con la planta donde ha estado ingresado el posible donante, o por vía telemática consultando la historia clínica o desplazándose al hospital y haciendo una valoración in situ.

Los criterios de exclusión para que un donante sea donante de corneas son (Plan nacional de córneas 2016):

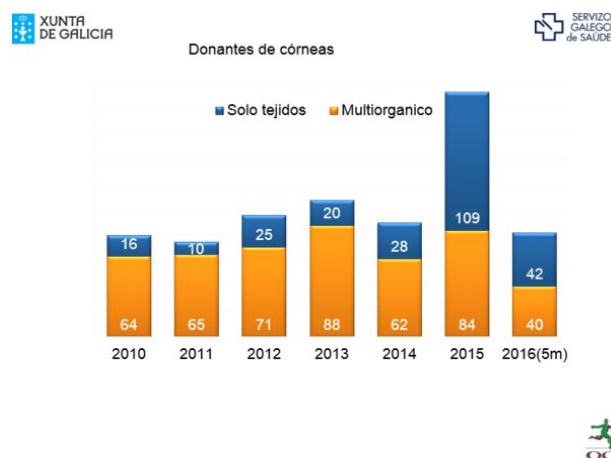
### **- Contraindicaciones absolutas**

- Causa de muerte desconocida, sin historia clínica previa y sin la posibilidad de realizar autopsia después de la donación.
- Imposibilidad de realizar una correcta evaluación de la historia clínica y del riesgo social biológico del donante.
- Ingesta o exposición a sustancias tóxicas que se puedan transmitir en dosis tóxicas al receptor de tejidos o a las células (cianuro, plomo, mercurio, oro).
- Enfermedades neurológicas:
- Antecedentes de neoplasia maligna:
- Infecciones (serología negativa para los siguientes marcadores HIV, hepatitis B, Hepatitis C)

- Antecedente de xenotrasplante, trasplante de órganos, o de los siguientes tejidos: córnea, esclerótica, duramadre, o derivados de pituitaria humana
- Estancias en UK por periodos acumulados de 6 meses desde el 1 de Enero de 1980 hasta el 31 de diciembre del 1995, excepto si se puede realizar estudio anatomía patológica para descartar enfermedad de Creutzfeld Jacob.
- **Contraindicaciones relativas**
- Edad fuera del rango: 2-89 años
- Donantes con riesgo biológico o social de presentar una enfermedad transmisible:

### 2.3. Datos Clínicos

El primer trasplante de córnea con éxito (la córnea permaneció transparente) fue realizado en 1905 por Eduard Zirm en la clínica Olomouc de la ahora República Checa, Después de esto se empezaron a realizar en diversos lugares del mundo. En España, en los últimos años el número de pacientes que se someten a un trasplante de córnea ha ido sufriendo un aumento paulatino. Ya en 2010 más de 3000 pacientes fueron intervenidos, cifra que ha ido aumentando cada año, alcanzado su máximo en 2014 con un total de 3488 pacientes trasplantados. Este incremento ha ido acompañado de forma fluctuante en el tiempo por la utilización de córneas procedentes de algunos bancos de países de la Unión Europea, que con carácter ocasional han suplido las necesidades puntuales de determinadas Comunidades Autónomas de nuestro país. El trasplante de córnea es el órgano con mejor pronóstico en el campo de los trasplantes.



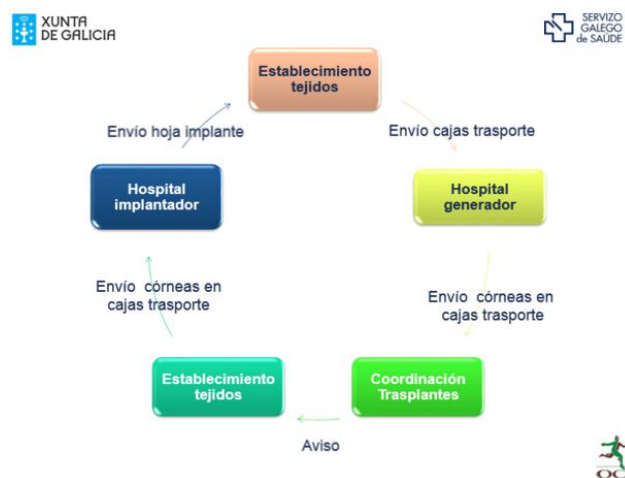
**Diagrama 1.** Evolución temporal de los donantes de córneas. Plan Nacional de Córneas (2016).



### 3. PAPEL DE LOS BANCOS DE TEJIDOS EN LOS TRASPLANTES DE CORNEAS

Las entrevistas para conseguir la donación y conocer la historia médico social debe hacerla personal entrenado para ello, ya que por una parte debe disponer de las habilidades para realizar la solicitud, así como conocer los criterios de selección del donante de corneas. A continuación se debe realizar una evaluación completa de la historia clínica por parte de una persona con los conocimientos de los criterios de selección del donante de córneas. Se realizará a continuación un examen físico completo del donante. Finalmente la extracción, si el donante se considera válido, será llevada a cabo por parte de personal entrenado. Se puede realizar la enucleación completa del globo, enviándolo al banco en lo que se conoce como cámara húmeda o bien la extracción del botón esclero-corneal (córnea).

Una vez obtenidas las corneas del donante deben ser enviadas un Banco de Tejidos donde se realiza todo el proceso de su valoración, preparación y conservación hasta el momento de su implante



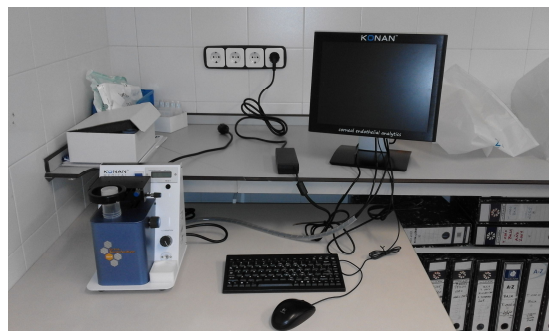
**Figura 1.** Proceso de obtención, envío e implantación de córneas. Plan Nacional de córneas (2016).

#### 3.1. Evaluación de la estructura

Lo primero que se hace al recibir la córnea es una evaluación de la estructura de las diferentes capas de la córnea mediante una lámpara de hendidura y un microscopio especular.

La **lámpara de hendidura**, también llamada **biomicroscopio**, es un dispositivo óptico que se utiliza para la exploración de las estructuras de la porción anterior del ojo. Consiste en un microscopio binocular dotado de una potente fuente de luz que permite ver en tres dimensiones y con una amplificación que oscila entre 6 y 40 aumentos, las estructuras del polo anterior del ojo. Mediante la lámpara de hendidura se realiza una exploración biomicroscópica de todas las capas que conforman la córnea: el rodete escleral (ancho, irregular, estrecho, escaso), la presencia de arco senil, tamaño de la zona clara; presencia de cuerpos extraños en el medio de cultivo y en el botón esclerocorneal (sangre y pestañas); presencia y grado de exposición epitelial y desepitelizaciones (presencia de infiltrados); presencia, tamaño y localización de leucomas, cicatrices quirúrgicas (lasik, pseudofaquia); en estroma profundo y Descemet presencia de estrías, pliegues, guttas.

La **microscopía especular** permite realizar el estudio del endotelio corneal. Puesto que la distribución celular es prácticamente uniforme, mediante la microscopía se puede conocer el número, la forma y el tamaño de la población endotelial. Los parámetros estudiados son la densidad celular, la hexagonalidad y el coeficiente de variación del área. La densidad celular da idea de la reserva funcional de esta monocapa. La densidad corneal normal en el adulto joven ronda entorno a las 3000 células/mm<sup>2</sup>. Las células endoteliales no tienen capacidad mitótica tras el nacimiento. Cuando ocurre una pérdida endotelial por cualquier causa, la respuesta de esta monocapa es la de aumentar el tamaño celular y deslizarse para cubrir el defecto ocasionado por la pérdida. La densidad celular disminuye con la edad. La variación en la forma celular se denomina pleomorfismo. El coeficiente de variación del área celular refleja la variabilidad en el área celular. La variación en el tamaño celular se denomina polimegatismo. Una cornea se considera viable para poder ser trasplantada cuando muestra una celularidad endotelial mayor de 2000 y un examen en lámpara de hendidura adecuado.



**Figuras 2 y 3.** Imágenes de una lámpara de hendidura y microscopio especular (KONAN).

### 3.2. Conservación/almacenamiento de las corneas

Una vez que se han valorado las corneas, las que se consideran viables se conservan en el banco de tejidos hasta el momento de su implante.

En la actualidad los 3 principales tipos de almacenamiento de la córnea son:

- FRÍO A 4°C. Es el más utilizado. Ventajas: escasa manipulación y bajo coste almacenamiento y procesado. Desventaja: duración 7 días.
- CALIENTE 31°C. Ventajas: duración almacenamiento hasta 28 días, permite programar cirugías a más largo plazo, se realizan controles microbiológicos, cierto efecto regenerador del tejido. Desventajas: Mayor manipulación, mayor coste de almacenamiento y procesado.
- CRIOPRESERVACIÓN A -140°C. Para investigación y uso tectónico en urgencias en las que no se dispone de tejido. Ventaja: almacenamiento casi ilimitado. Desventajas: Mayor coste almacenamiento y procesado

Las corneas criopreservadas con fines clínicos son aquellas en las que el recuento endotelial muestra una celularidad entre 1500-2000 células y un examen en la lámpara de hendidura adecuado. En caso de celularidad por debajo de 1500 independientemente de la viabilidad en la lámpara de hendidura esas corneas serán criopreservadas pero con uso exclusivo para investigación.

## 4. CRIOPRESERVACIÓN

La congelación de tejidos es una técnica que se utiliza para poder conservar la viabilidad celular a bajas temperaturas, mantenerlos así por largos periodos de tiempo y sin perder la funcionalidad. (Ávila-Portillo *et al*, 2006). El proceso de congelación conlleva cambios físicos y químicos a nivel de la célula que pueden alterar la fisiología de la misma, llegando a ocasionarle daños incluso letales. Las dificultades de la congelación derivan de los procesos de enfriamiento y de calentamiento y no de la permanencia a bajas temperaturas puesto que a estas temperaturas no existen fenómenos de difusión ni energía térmica suficiente para llevar a cabo reacciones químicas.

La criopreservación de material biológico tiene lugar normalmente en una solución acuosa, con presencia de diferentes solutos. Para comprender la respuesta celular en esa solución acuosa ante los fenómenos que tienen lugar a bajas temperaturas, hay que tener en cuenta que el ambiente intracelular es también en sí una solución acuosa y se encuentra separada

de la solución acuosa extracelular por medio de la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula y permite el equilibrio osmótico. Por lo tanto, la clave para la supervivencia de la célula a bajas temperaturas radica en el destino del agua intracelular, ligado a su vez a la capacidad de respuesta osmótica de la célula.

La criopreservación de material biológico tiene lugar normalmente en una solución acuosa, con presencia de diferentes solutos. Para comprender la respuesta celular en esa solución acuosa ante los fenómenos que tienen lugar a bajas temperaturas, hay que tener en cuenta que el ambiente intracelular es también en sí una solución acuosa y se encuentra separada de la solución acuosa extracelular por medio de la membrana plasmática que constituye la barrera que detiene el crecimiento cristalino dentro de la célula y permite el equilibrio osmótico. Por lo tanto, la clave para la supervivencia de la célula a bajas temperaturas radica en el destino del agua intracelular, ligado a su vez a la capacidad de respuesta osmótica de la célula. A bajas temperaturas, el destino del agua intracelular se ve influenciado por las relaciones fisicoquímicas de calor y agua, y por los cambios de fases entre los estados sólido y líquido de los ambientes intra y extracelulares. En realidad, el descenso de temperatura resulta en un sistema bifásico en el que coexisten una fracción sólida extracelular ya congelada y una fracción líquida intracelular no congelada.

Con el descenso de temperatura, el medio extracelular se cristaliza y la fracción líquida no congelada de las células está expuesta a grandes cambios en su concentración salina. La fase líquida se hace progresivamente más concentrada o hipertónica que la fase sólida. En respuesta a esa diferencia de gradiente que se genera entre el medio intracelular y extracelular, el agua fluye hacia afuera de manera que las células en suspensión deben deshidratarse para mantener el equilibrio osmótico con el medio extracelular cada vez más hipertónico. Evidentemente este estrés osmótico o cambios en la concentración salina pueden provocar serias alteraciones en la membrana celular y estos cambios se sabe que están directamente relacionados con la velocidad en el descenso de la temperatura. Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse suficientemente rápido y el agua remanente se congela formando hielo intracelular. Si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular. Una velocidad de enfriamiento adecuada permite que la célula se deshidrate y concentre intracelularmente de

forma correcta, de manera que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará.

El agua representa más del 80% del contenido intracelular y al congelarse forma cristales de hielo, distribuidos aleatoriamente, en el interior de la célula con el correspondiente efecto adverso para la misma. Esos cristales de hielo en expansión generan un daño mecánico, presionando sobre las células y causando planos de fractura que comprometen la viabilidad celular letal. El principal problema es el control de la cantidad y localización de esos cristales de hielo (Kasai y Mukaida, 2004; Cabrera *et al.*, 2006).

Además de la adecuada velocidad de enfriamiento, para minimizar los efectos nocivos del enfriamiento es necesario utilizar medios de congelación constituidos por componentes ácidos, básicos y nutrientes que aportan energía a las células. Las células poseen una velocidad de enfriamiento óptima donde los daños producidos son mínimos. Los crioprotectores presentes en los medios de congelación son sustancias hidrosolubles de baja citotoxicidad que evitan o disminuyen la formación de los cristales de hielo al bajar la temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido. Los crioprotectores son permeables o no permeables en función de su capacidad para penetrar en el interior de la célula a temperaturas cercanas a 0°C. Los primeros, como el 1,2.propanodiol (PROH), dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol, disminuyen el punto de congelación de la solución, dando más tiempo a la célula para que se deshidrate. Mientras la célula se deshidrata tiene lugar un reemplazo de las moléculas de agua por las de crioprotector, que no se congela en forma de hielo sino que se solidifica formando una sustancia amorfa de consistencia vidriosa. Por otro lado, los crioprotectores no permeables, como la sacarosa, actúan generando diferencias de presión osmótica o gradiente osmótico que favorece la deshidratación celular, reduciendo la cantidad de agua en las células y la probabilidad de formación de hielo intracelular, y contrarrestando así el efecto del incremento de solutos. Aunque los agentes crioprotectores ayuda a controlar los cristales de hielo que se forman durante el proceso de congelación, también tienen un efecto negativo, a parte de su citotoxicidad, también varían el gradiente osmótico aumentándolo y rompiendo las células. Durante la descongelación se producen cambios osmóticos inversos a los de la congelación que es necesario tener en cuenta para obtener muestras en las mejores condiciones (Kasai y Mukaida, 2004; Cabrera *et al.*, 2006).

#### **4.1. Desventajas criopreservación**

En la criopreservación, las células son suspendidas en una solución, enfriada, almacenada en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), calentada hasta temperatura ambiente y retornada a su estado fisiológico. Esto representa un gran estrés (estrés mecánico, térmico y/o químico) para la célula y puede causar graves daños, comprometiendo su viabilidad. Entre los principales daños se encuentran: el causado por la formación intracelular de hielo durante el enfriamiento y el calentamiento, la toxicidad química por los agentes crioprotectores y shock osmótico durante la incorporación y retirada de la solución crioprotectora, además el mayor desafío para las células es pasar dos veces por la zona intermedia de temperatura que oscila entre  $+15$  y  $-5^{\circ}\text{C}$  (Vajta, 2000). Todo ello repercute en la menor viabilidad del tejido criopreservado (Stornelli *et al*, 2005).

En el caso de los embriones, la tasa de supervivencia por embrión está entre el 50 y el 70%. Pero cada estadio embrionario así como los diferentes tejidos presenta sus características propias.

## 5. VITRIFICACION

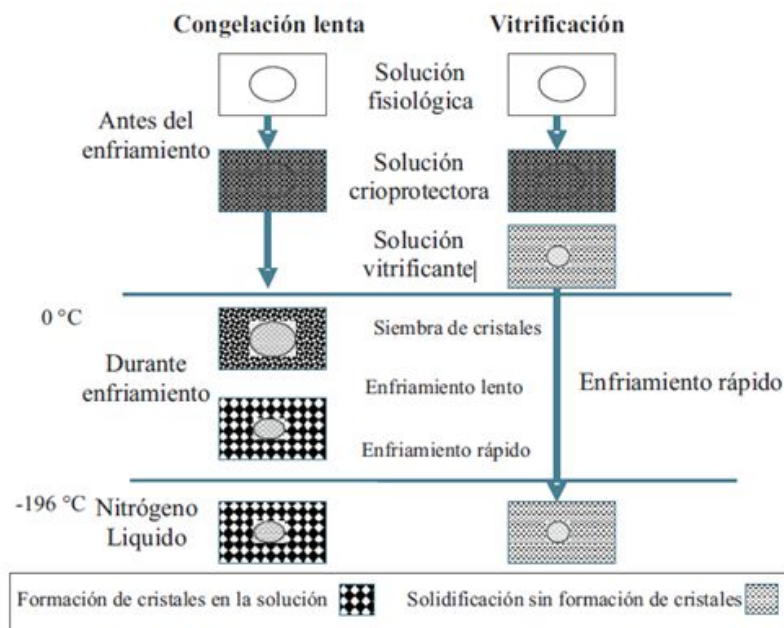
La vitrificación se define como la solidificación de una solución a bajas temperaturas sin la formación de cristales de hielo, ya que atraviesa el rango de temperatura crítica ( $+15$  a  $-5^{\circ}\text{C}$ ) a una velocidad de enfriamiento rápida, por lo que representa una razonable y eficiente estrategia para prevenir una de las causas de daño celular como lo es la formación de hielo intracelular (Kasai y Mukaida, 2004), además no requiere de equipos de congelación costosos.

Se utiliza ampliamente como técnica de crioconservación de embriones y ovocitos. Dicha vitrificación se consigue mediante un enfriamiento muy rápido en el cual se utiliza una solución altamente concentrada que no cristaliza durante la congelación, en tanto que su viscosidad aumenta con el descenso de temperatura hasta la formación de un estado sólido amorfo. Para conseguir un gran cambio de temperatura a gran velocidad, se usa un volumen mínimo de medio (menos de 0,1 microlitros) y nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ . La exposición y las tasas de congelación deben ser lo suficientemente rápidas para evitar la toxicidad y la formación de cristales intracelulares que puedan dañar el contenido celular. Para conseguir que la deshidratación sea muy rápida se utilizan crioprotectores en concentraciones elevadas, la velocidad de congelación/descongelación es indirectamente proporcional a la concentración de crioprotectores. Antes de la congelación, el material biológico debe equilibrarse con esta solución crioprotectora (en menor concentración) para



que pueda soportar el choque osmótico. La tasa de supervivencia de las muestras es mayor del 90%, y los embriones suelen sobrevivir intactos. Se necesita una velocidad extrema en el proceso de desvitrificación, sacando la muestra del nitrógeno líquido e introduciéndola en medio a 37°C.

La principal diferencia radica en si existe (congelación lenta) o no (vitrificación) formación de hielo en la solución durante el proceso de enfriamiento (Vajta, 2000). Los cambios celulares más notorios entre vitrificación y congelación lenta están ilustrados en la Figura 4.



**Figura 4.** Cambios celulares más notorios entre vitrificación y congelación. Modificado de Kasai y Mukaida, (2004)

La vitrificación presenta ventajas en relación a la congelación lenta, ya que es menor la formación de cristales de hielo en el interior de la célula, disminuye los daños por criopreservación, desventajas como el uso de crioprotectores a concentraciones tóxicas para la células (Vajta, 2000). Todo ello repercute en unas altas tasas de supervivencia tras la desvitrificación de los tejidos.

## OBJETIVOS

La no siempre disponibilidad de corneas en fresco hace que sea necesario la utilización de corneas criopreservadas para uso tectónico en urgencias en las que no se dispone de tejido. Principalmente este tipo de urgencias son debidas a perforaciones corneales y a infecciones no controladas. El objetivo principal en este tipo de queratoplastias es el de restablecer la

integridad estructural del ojo, pudiéndose en un segundo tiempo una vez controlada la causa de la urgencia, realizar una queratoplastia con fines ópticos.

En vista de la importancia de optimizar las técnicas de conservación de tejidos para su posterior utilización se realizó este estudio cuyos objetivos son los siguientes:

1. Influencia de la albúmina en la conservación de la estructura de las diferentes capas de la córnea tras la criopreservación.
2. Diferencias en la conservación en la estructura de las capas de la córnea entre el protocolo de criopreservación y el protocolo de vitrificación.
3. Diferencias en la conservación de la estructura y en la preservación de la viabilidad celular entre los dos protocolos de vitrificación utilizados.

## **MATERIAL Y METODOS**

### **1. OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS y grupos de estudio**

Para llevar a cabo el trabajo se utilizaron 16 córneas de donantes tras consentimiento informado. Las córneas son extraídas por personal entrenado para ello.

Se establecieron 4 grupos de estudio (n=4), a los que se les sometió a diferentes técnicas de Conservación.

#### **- Grupo 1: Corneas criopreservadas con albúmina almacenadas en fase gas.**

Datos clínicos de los donantes: La media de edad de los donantes era de 72 años. Se trataba de pacientes sin antecedentes de enfermedad tumoral y sin antecedentes de cirugía ocular.

#### **- Grupo 2: Corneas criopreservadas sin albúmina almacenadas en fase gas.**

Datos clínicos de los donantes: La media de edad de los donantes fue de 55 años. Se trata de donantes sin antecedentes de enfermedad tumoral y sin antecedentes de cirugía ocular.

#### **- Grupo 3: Corneas vitrificadas con solución denominada VS83.**

Datos clínicos de los donantes: La media de edad de los donantes era de 71 años. En 2 corneas el donante tenía antecedentes de enfermedad tumoral. En el caso de las otras 2 corneas el donante no tenía antecedentes de enfermedad tumoral. 3 corneas no tenían antecedentes de cirugía ocular y en la otra cornea el donante estaba operado de cataratas

#### **- Grupo 4: Corneas vitrificadas con solución denominada VS55.**



Datos clínicos de los donantes: La media de edad de los donantes era de 67 años. 1 cornea tenía antecedentes de enfermedad tumoral y las otras 3 corneas no tenían antecedentes de enfermedad tumoral. Ninguna córnea tenía antecedentes de cirugía ocular.

## **2.- PROTOCOLO DE PREPARACION DE CORNEAS PARA TRASPLANTE**

### **2.1. Evaluación**

Una vez obtenidas las corneas del donante deben ser enviadas a 4°C en un medio rico en vitaminas, antioxidantes y precursores energéticos con gentamicina como antibiótico (Corneal Chamber, Medical Mix) al Banco de Tejidos para su evaluación. De cada donante se extraen, además de las corneas, muestras de sangre para la realización de las determinaciones de los controles serológicas.

Una vez que llegan las córneas al Banco de Tejidos, previas a la evaluación deben estar a temperatura de aproximadamente 25° para que la evaluación de las diferentes capas de las córneas sea posible.

Se realiza la evaluación con microscopio especular y lámpara de hendidura del botón esclero-corneal (córnea) en su medio de almacenamiento:

- Microscopio especular: Se obtienen como mínimo 2 a 3 fotografías del endotelio y se realiza contaje con la herramienta que para ello dispone el software. Se genera un informe con los siguientes datos: densidad media, tamaño medio, desviación estándar, coeficiente de variación y hexagonalidad.
- Lámpara de hendidura: Se realiza una exploración biomicroscópica de todas las capas que conforman la córnea, en especial se tiene en cuenta: el estado del epitelio e irregularidades epiteliales, la presencia de opacidades estromales, la presencias de pliegues de la Descemet, precipitados endoteliales, guttas, curvatura anormal de la córnea, cirugías previas, presencia de tumores o metástasis, presencia de sangre, cuerpos extraños.

El criterio mínimo de densidad celular para considerar viable un botón esclerocorneal más aceptado es de más de 2000 células/mm<sup>2</sup>, para la realización de una queratoplastia penetrante y 2500 para un trasplante lamelar endotelial. Realizada la evaluación, se realiza un informe de resultado de cada una de las dos exploraciones anteriores,

determinando si una córnea ha sido viable o no para su uso clínico. En el caso de que la córnea no sea viable para su uso en frío o en caliente, se procede a la criopreservación. Este tipo de almacenamiento se usará para almacenar tejido no viable, para su uso en injertos tectónicos.

De ser posible se realiza microscopia especular/óptica así como evaluación con lámpara de hendidura, previa a la criopreservación para así tener documentado el tejido para su uso tectónico. En términos generales, si la córnea posee una celularidad entre 1500-2000 células/mm<sup>2</sup> y examen en lámpara de hendidura viable se criopreserva para uso clínico. En el caso de que la celularidad de la córnea esté por debajo de 1500, no es necesario realizar examen en la lámpara de hendidura y se criopreserva para investigación.

En este trabajo no se realizó examen en la lámpara de hendidura en tres córneas.

## 2.2 Criopreservación

### 2.2.1 Criopreservación en medio con albúmina

En el proceso de la criopreservación se han utilizado dos tipos de soluciones, con y sin albúmina con el objetivo de valorar la influencia de la presencia de albúmina en los daños producidos por la congelación.

Al menos una hora antes de iniciar el proceso de criopreservación se prepararan las tres soluciones crioprotectoras M1 M2 y M3 con dosis crecientes de DMSO.

**Tabla 1.** Componentes de los medios de criopreservación con albúmina.

	<b>Medio 199</b>	<b>Albúmina</b>	<b>DMSO</b>
<b>M1</b>	21,9 ml	7.5 ml	0,6 ml
<b>M2</b>	21,3 ml	7.5 ml	1,2 ml
<b>M3</b>	20,4 ml	7.5 ml	2,1 ml

Se colocan los tubos en nevera a 4°C al menos durante una hora.

Se coloca una batea y dentro de ella cuatro bolsas de suero fisiológico congelado de 100 ml. Se colocan encima de los sueros tres vasos de precipitados que se rotulan como M1,

M2 y M3, y se vierte en cada uno de ellos las soluciones preparadas previamente. Se coloca también encima de las bolsas de suero una placa de 6 pocillos y se añade 8-10 ml de cada una de las soluciones medio M1, medio M2 y medio M3 en un pocillo de la Placa de Petri. Se vuelca la córnea con el medio que queda en uno de los pocillos vacíos de la Placa de Petri. Con una pinza se coge la córnea por el anillo esclero corneal, INTENTANDO NO TOCAR EL EPITELIO DE LA CÓRNEA y se deposita, en la solución M1 del pocillo de la Placa de Petri durante 3 minutos. Trascorridos 3 minutos de la córnea en solución M1, se coloca 3 minutos en solución M2 y 3 minutos en solución M3. Con ayuda de una pinza se introduce la córnea en el criotubo previamente rotulado sin aplastarla y se añade solución M3 hasta llenar el criotubo. Se coge la batea que contiene las córneas, recubiertas con hielo picado para mantenerlas a aproximadamente 4°C, y se pone a agitar suavemente durante 5 minutos para permitir que se equilibre la solución de criopreservación con el tejido. Mientras los criotubos permanecen en agitación, se prepara el congelador biológico para realizar la congelación mediante el programa correspondiente, con el cual se consigue un descenso de la temperatura de la muestra de 1°C/min hasta -80°C y de 5°C/min hasta -140°C. Se coloca dentro del mismo una bandeja con una gradilla. La sonda control consiste en un **criotubo con 3 ml de medio M3** que se ha preparado previamente que lleva una sonda que indica la temperatura de la muestra. Se enfría la cámara de congelación hasta 4°C, y una vez que haya transcurrido el período de equilibrio a aproximadamente 4°C de los criotubos con las córneas, se colocan en la gradilla, y se inicia **la congelación**. Se llena una caja de poroxpán con nitrógeno líquido en su parte inferior y una vez terminada la congelación, rápidamente se sacan los criotubos y se colocan dentro de la caja en su ubicación en el tanque de nitrógeno (fase gas, temperatura aproximadamente -150°C).

### 2.2.2 Criopreservación en medio sin albúmina

Se procede de igual modo que en el punto anterior pero las soluciones que se deben preparar son las siguientes:

**Tabla 2.** Componentes de los medios de criopreservación sin albúmina

	<b>Medio 199</b>	<b>DMSO</b>
<b>M1</b>	29,4 ml	0,6 ml

<b>M2</b>	28,8 ml	1,2 ml
<b>M3</b>	27,9 ml	2,1 ml

### 2.2.3. Descongelación

Se introduce el criotubo que contiene la córnea en una batea conteniendo suero fisiológico a temperatura ambiente o a 37°C, agitando suavemente el criotubo (alrededor de unos 5-10 minutos). Se vierte el contenido del criotubo con la córnea directamente en uno de los pocillos de una placa de 6 pocillos. En otros dos pocillos se añade albúmina humana al 20% fría (4°C) y con ayuda de unas pinzas, se pasa directamente al primer pocillo con albúmina. Se deja unos minutos (4-5) y se pasa al segundo pocillo, se deja también unos minutos (4-5). La placa debe estar en todo momento sobre un suero congelado para que se mantenga fría (4°C).

### 2.3 Vitricificación

En el proceso de la vitricificación se han utilizado dos tipos de soluciones, la VS83 que preserva únicamente la estructura celular y la VS55 que preserva también la viabilidad celular.

En primer lugar se prepara la disolución 5X EuroCollins que es una disolución compuesta por dextrosa 174.76 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 36.5g, KCL 5.6g, NaHCO<sub>3</sub> 4.2g (volumen final de un litro con agua). Esta es la disolución base que se utiliza en los dos métodos de vitricificación. Se pone en agitación y una vez disueltos los reactivos (solución transparente) se filtra a través de un filtro de 0.22micras. Se mide su ph (7.4) y se almacena a 4° C (máximo 1 mes).

#### 2.3.1. Vitricificación con VS83.

El medio está compuesta por 3.31 ml/l de Propilenglicol, 4.65 mol/l de DMSO y 4.65 mol/l de formamida en 5X EuroCollins. Se pone en agitación y una vez disueltos los reactivos (solución transparente) se filtra a través de un filtro de 0.22micras. Se mide su pH (7.9-8.1) y se almacena a 4° C (máximo 1 mes). A continuación se coloca la córnea en una bolsa que contiene 40 ml de solución VS83 a temperatura ambiente. Se saca el aire y se sella la

bolsa. Se incuba el tejido en agitación continua 1 hora a temperatura ambiente antes de proceder al enfriamiento. El proceso de enfriamiento se alcanza al colocar las bolsas con el tejido en un baño preenfriado de isopentano. Para ello, se prepara un vaso de precipitados de un litro y medio con isopentano. Este vaso se encuentra dentro de una caja de porexpán con nitrógeno líquido. Cuando se observa en el fondo del vaso de precipitados la fase sólida es indicativo de que la fase líquida ha alcanzado la temperatura deseada (-50°C). Se coloca la bolsa con el tejido durante 10 minutos dentro del recipiente con isopentano. Una vez congelada se almacena en un congelador a -80 °C.

Para la descongelación. Se depositan 40 ml de solución 5xEurocollins en un vaso de precipitados. La solución ha de mantenerse en todo momento fría. Se retira la bolsa del congelador y se deja 3 minutos a temperatura ambiente para que se vaya atemperando. Después de este tiempo se introduce en un baño maría a 37 °C hasta que toda la disolución está descongelada. Posteriormente se abre la bolsa y vuelca su contenido en el vaso de precipitados con la solución 5xEurocollins fría. Se procede a retirar el VS83 por dilución progresiva (v/v) haciendo 4-5 lavados. Finalmente, con unas pinzas se coge la córnea por el anillo esclero-corneal, teniendo cuidado de no tocar el endotelio de la córnea, y se deposita en un recipiente con formol para su posterior tallado.

### **2.3.2. Vitricación con VS55.**

El medio está compuesta por 2.2 ml/l de Propilenglicol, 3.1 mol/l de DMSO y 3.1 mol/l de formamida en 5X EuroCollins. Se pone en agitación y una vez disueltos los reactivos (solución transparente) se filtra a través de un filtro de 0.22micras. Se mide su pH (7.9-8.1) y se almacena a 4° C (máximo 1 mes). A continuación se coloca la córnea en un criotubo previamente enfriado a 4°C y se añade gota a gota la solución VS55 fría hasta alcanzar un volumen de 4 ml. Finalmente la parte de arriba de la solución de vitricación se cubre con 1 ml de isopentano. El proceso de enfriamiento se alcanza al introducir el criotubo con el tejido en un baño preenfriado de isopentano. Para ello, se prepara un vaso de precipitados de un litro y medio con isopentano. Este vaso se encuentra dentro de una caja de poroxpán con nitrógeno líquido. Cuando se observa en el fondo del vaso de precipitados la fase sólida es indicativo de que la fase líquida ha alcanzado la temperatura deseada (-50°C). Se coloca la bolsa con el tejido durante 10 minutos dentro del recipiente con isopentano. Una vez congelada se almacena a -135°C.

### 2.3.3. Descongelación

Para la descongelación, en un tubo previamente enfriado se depositan 4 ml de solución 5xEurocollins. La solución ha de mantenerse en todo momento fría. Se deposita el criotubo 3 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se introduce en un baño maría a 37 °C hasta que toda la disolución está descongelada. Posteriormente se abre el criotubo y se vuelca su contenido en tubo estéril con la solución 5xEurocollins fría. Se procede a retirar el VS55 por dilución progresiva (v/v) haciendo 4-5 lavados. Finalmente, con unas pinzas se coge la córnea por el anillo esclero-corneal, teniendo cuidado de no tocar el endotelio de la córnea, y se deposita en un recipiente con formol para su posterior inclusión en parafina.

## 3. ANALISIS HISTOLOGICO DE LAS CORNEAS TRAS SU DESCONGELACION

Una vez descongeladas, se obtuvieron piezas representativas. Se talla la córnea en tres fragmentos y se coloca cada uno de ellos con la superficie de corte hacia abajo en la misma orientación como si estuvieran unidos. Se incluyen en parafina para su posterior tallado para su análisis histológico. Para ello se cortan las muestras con 4µm de grosor de forma seriada en el micrótopo para no desechar ningún fragmento y se tiñen con las técnicas histoquímicas estándar: hematoxilina-eosina.

**Hematoxilina-eosina.** Se empleó esta tinción para evaluar el estado general de la córnea así como el estado de las diferentes capas (endotelio, estroma, membrana de Descemet y endotelio). Las muestras fueron desparafinadas en una estufa (30 minutos a 60°C), seguido de un tratamiento con xilol (10 minutos) e hidratadas introduciéndolas en soluciones con una gradación de etanol decreciente (100°, 96°, 70°, 50°) y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, (10 minutos cada uno). Posteriormente, se embebió el tejido en hematoxilina de Harris (5 minutos) y se lavaron con un flujo de agua corriente hasta obtener el viraje crómico. Finalmente, se realizó una contratinción con eosina (5 minutos) y deshidratación en etanol de gradación creciente (50°, 96°, 100°) y xilol (10 minutos cada uno). El montaje de la preparación se hizo con DePeX (Sigma-Aldrich, EE.UU).

Las fotos de las tinciones histoquímicas se realizaron en un microscopio BX61 (Olympus, Japón).

## RESULTADOS

### 1. EXAMEN LAMPARA DE HENDIDURA Y MICROSCOPIO ESPECULAR.

#### Grupo 1:

En el caso de la córnea de un donante presenta recuento celular en el microscopio especular de 2457 células/mm<sup>2</sup>. En el examen en la lámpara de hendidura muestra: epitelio adecuado con leve desepitelización, estroma claro y transparente, arco senil severo, diámetro zona clara 6.8 mm, membrana de Descemet con pliegues moderado, anillo escleral escaso. Debido al diámetro pequeño de zona clara no es válida para su uso clínico en frío.

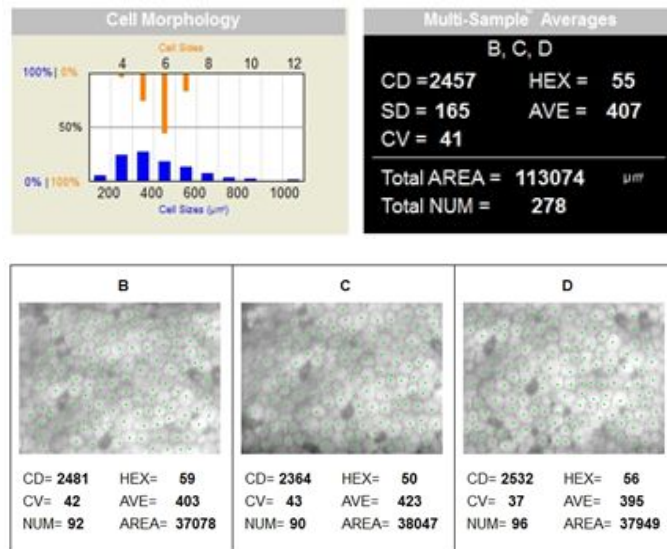


Figura 5. Evaluación en KONAN de córnea a criopreservar.

Se aprecian abundantes restos hemáticos, tanto en el examen en la lámpara de hendidura como en el examen en el microscopio especular.

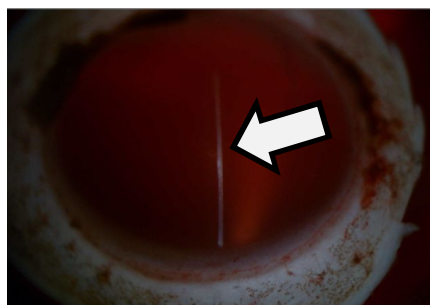
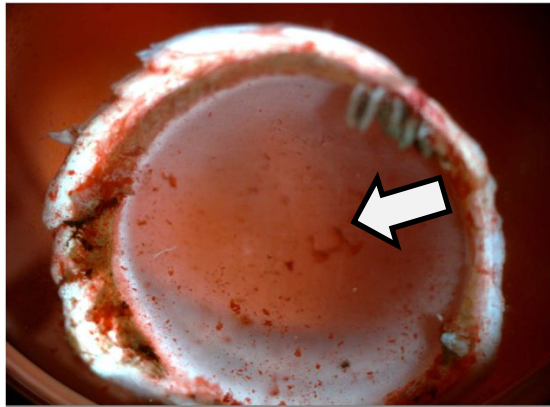


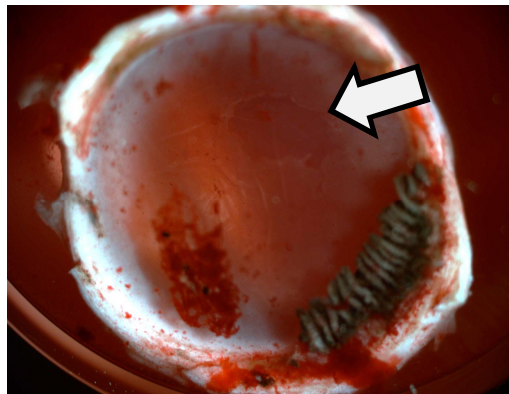
Figura 6. Córnea con zona clara pequeña. Imagen cortesía Dr. Álvarez.





**Figura 7.** Córnea con restos hemáticos. Imagen cortesía Dr. Álvarez.

En el caso de dos corneas de un donante muestran recuento en microscopio especular de 2387 y 2160 células /mm<sup>2</sup>. En el examen en la lámpara de hendidura se muestra epitelio no adecuado con desepitelización y exposición severa. Estroma claro y transparente. Arco senil moderado, diámetro de zona clara 7.5 mm. Membrana de Descemet con pliegues leve. Anillo escleral estrecho. Debido al epitelio no adecuado no son válidas para su uso clínico en frío.



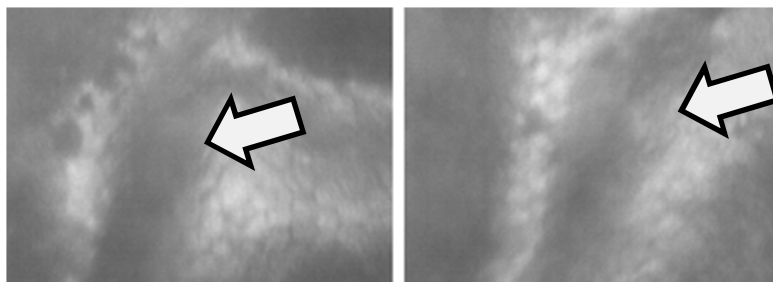
**Figura 8.** Córnea con exposición severa de epitelio. Imagen cortesía Dr. Álvarez

Por último se incluyó en este grupo la córnea de un paciente diagnosticado de esclerosis lateral amiotrófica (ELA). Este diagnóstico es un criterio de exclusión de las corneas para implante por ello ya no se realiza examen en la lámpara de hendidura ni recuento en el microscopio especular.

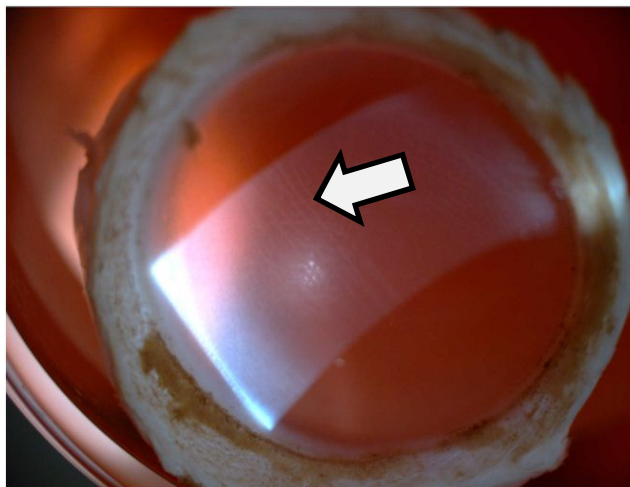


## Grupo 2:

En el caso de dos córneas de un donante no se realiza contaje en el microscopio especular al no ser posible. El examen en la lámpara de hendidura muestra un epitelio adecuado, exposición leve, estroma claro y transparente, arco senil moderado, diámetro zona clara 7.5 mm, abundantes estrías estromales, anillo escleral estrecho. Debido a las abundantes estrías estromales que imposibilitan el contaje en el microscopio especular no se pueden utilizar las corneas para uso clínico en frío.



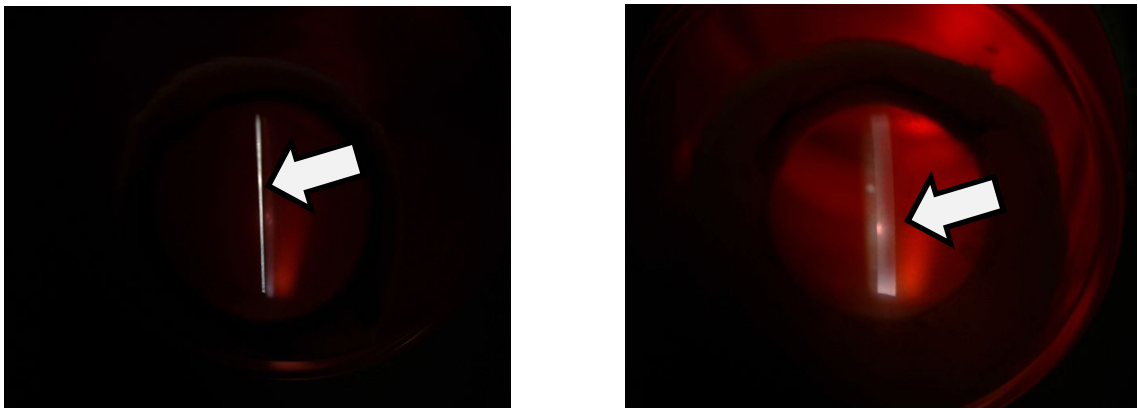
**Figura 9.** Estrías estromales en microscopio especular KONAN.



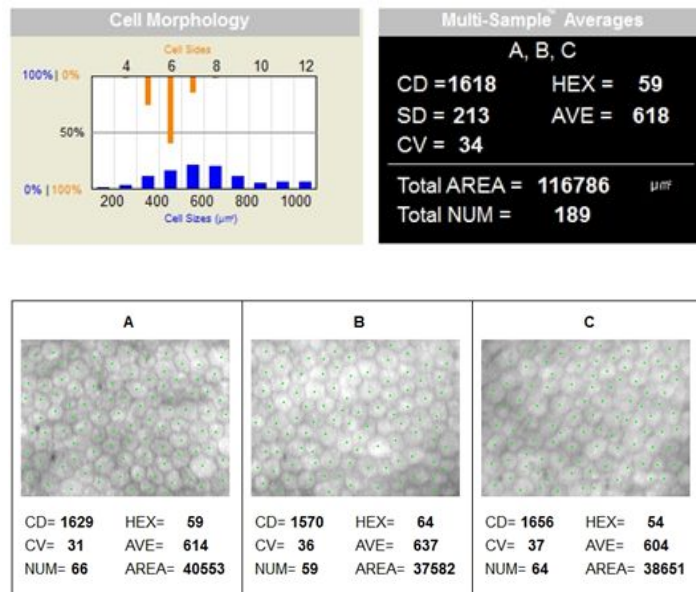
**Figura 10.** Córnea con estrías estromales en lámpara de hendidura. Imagen cortesía Dr. Álvarez.

En el caso de dos córneas de un donante, muestran recuento en microscopio especular de 2469 y 2392. El examen en la lámpara de hendidura muestra epitelio no adecuado con desepitelización leve y exposición severa, estroma claro y transparente, arco senil severo, diámetro de zona clara 6.8 mm, membrana de Descemet con pliegues leve y desprendimiento y abundantes líneas de stress. Debido al examen en la lámpara de hendidura y en especial a la zona clara pequeña no se pueden utilizar las córneas para uso clínico en frío.

Por último se incluye en este grupo, la córnea de un donante en la cual el recuento en el espejular fue de 1618. El examen en la lámpara de hendidura muestra epitelio adecuado, estroma claro y transparente, arco senil moderado, diámetro zona clara 7.5 mm, leucoma paracentral. Membrana de Descemet con pliegues leve. El recuento en el microscopio espejular inferior a 2000 células/mm hace que no pueda ser utilizada para uso clínico en frío.



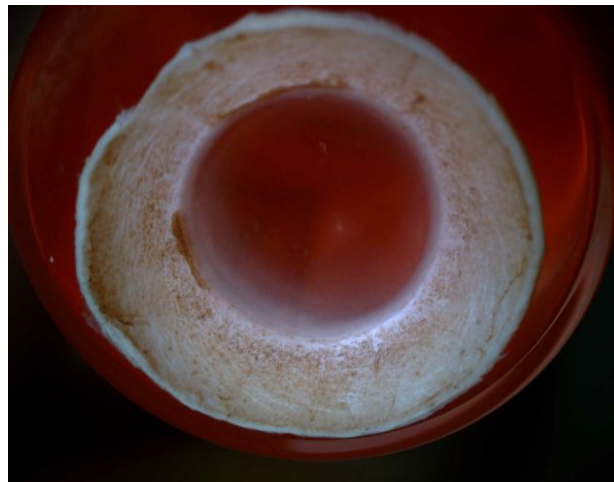
**Figuras 11 y 12.** Zonas claras normales. Imágenes cortesía Dr. Álvarez.



**Figura 13.** Recuento en microscopio espejular.

### Grupo 3:

En primer lugar en este grupo se incluyen las dos corneas de un paciente con sepsis. Esto representa un criterio de exclusión que imposibilita el uso de las corneas para su uso clínico en frío. El recuento en el microscopio especular muestra 2681 y 2513 células/mm<sup>2</sup>. El examen en la lámpara de hendidura muestra epitelio adecuado, estroma claro y transparente, arco senil moderado, diámetro zona clara 7.4mm, membrana de Descemet con pliegues leve y anillo escleral ancho.

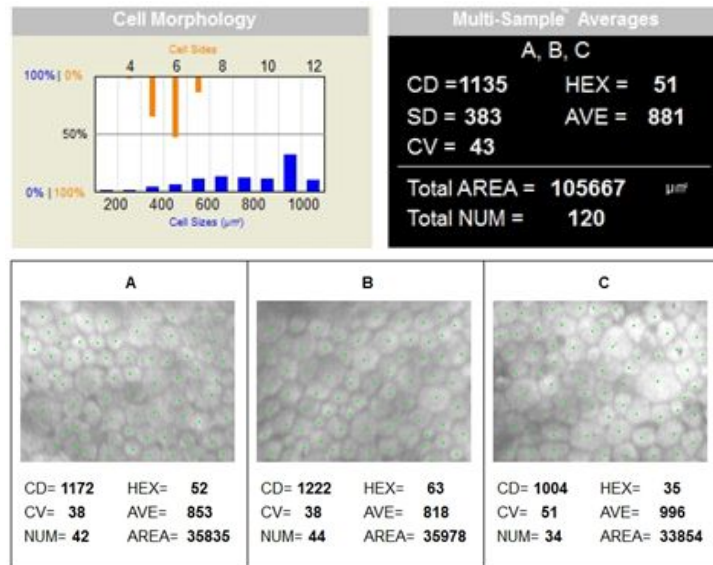


**Figura 14.** Córnea con anillo escleral ancho. Imagen cortesía Dr. Álvarez..

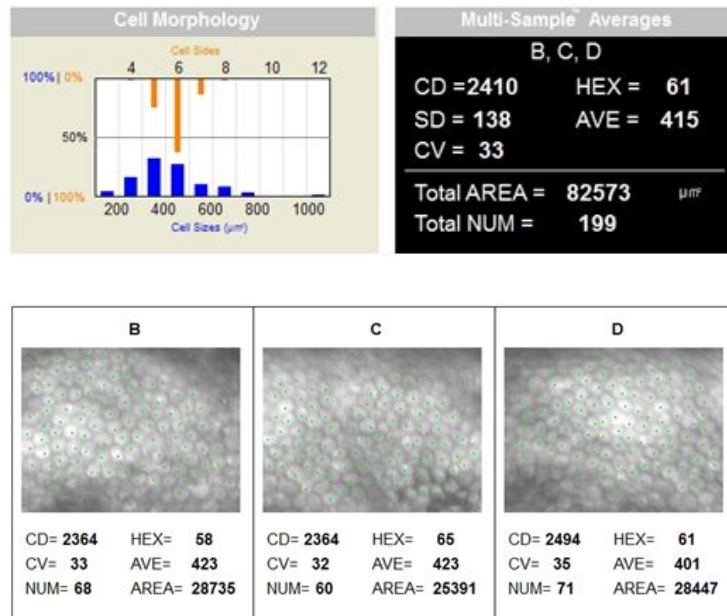
En el caso de la córnea de un donante el recuento en el microscopio especular fue de aproximadamente 1135 células/mm<sup>2</sup>. Se trata de un paciente operado de cataratas. El recuento en el microscopio especular fue inferior a 2000 células/mm<sup>2</sup> lo hace que no pueda ser utilizada para uso clínico en frío. El examen en la lámpara de hendidura muestra epitelio adecuado, estroma claro y transparente, arco senil moderado, diámetro zona clara 7.4mm, membrana de Descemet con pliegues leve, anillo escleral ancho.

Finalmente se incluye en este grupo la córnea de un donante cuyo recuento en el microscopio especular fue de 2410 células/mm<sup>2</sup>. El examen en la lámpara de hendidura mostró epitelio adecuado, estroma claro y transparente, arco senil leve, diámetro zona clara 8.2 mm, edema leve, estrías estromales escasas, membrana de Descemet con pliegues

moderado y anillo escleral ancho. Esta cornea se incluyó en el estudio al no disponer de receptor para su implante.



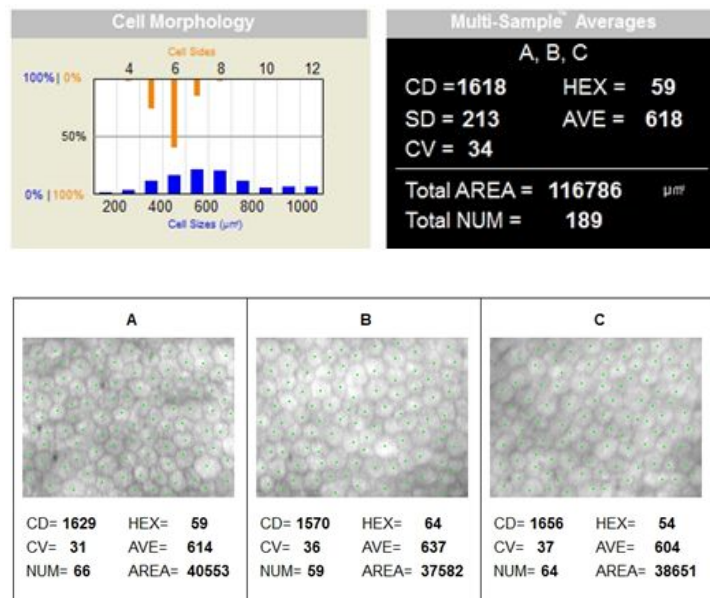
**Figura 15.** Córnea de donante operado de cataratas.



**Figura 16.** Córnea válida con contaje alto sin receptor.

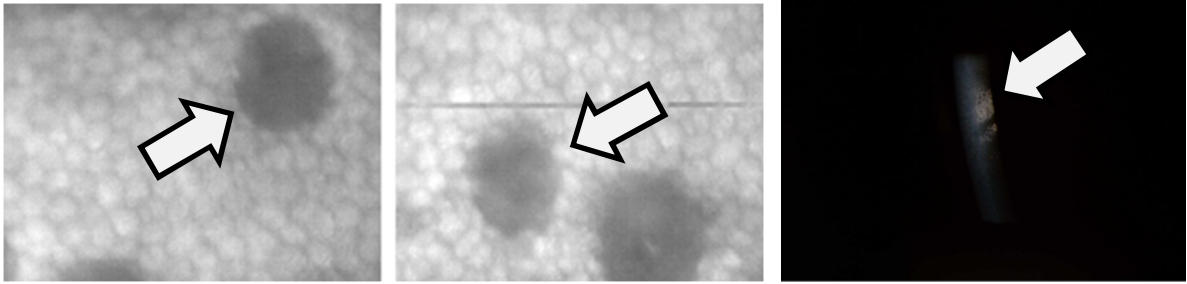
**Grupo 4:**

En el caso de dos corneas de un donante el recuento en el microscopio especular fue de 1302 y 1618 células/mm<sup>2</sup> y no se realizó examen en la lámpara de hendidura. El recuento en el microscopio especular inferior a 2000 células/mm<sup>2</sup> hace que no puedan ser utilizadas para uso clínico en frío.



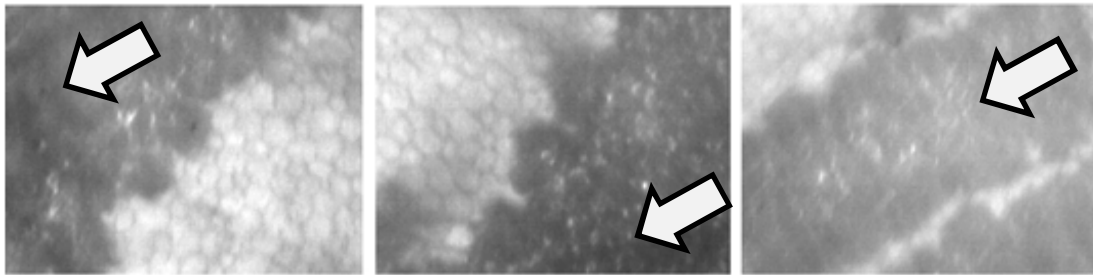
**Figura 17.** Córnea con bajo recuento celular.

En otras dos corneas de un donante el recuento en el microscopio especular fue de 2519 y 2475 células/mm<sup>2</sup>. El examen en la lámpara de hendidura mostraba: epitelio adecuado, desepitelización leve, estroma claro y transparente, edema leve, arco senil leve, diámetro zona clara 8.9 mm, estrías estromales escasas, membrana de Descemet pliegues leve, anillo escleral estrecho, abundantes guttas. Debido a la presencia de abundantes guttas observadas en el examen en la lámpara de hendidura y en el microscopio especular hace que no puedan ser utilizadas para uso clínico en frío.



**Figuras 18 y 19.** Guttas corneales en KONAN y lámpara de hendidura.

Finalmente, se incluyó el caso de otra córnea de un donante que se descartó debido a que el medio de transporte en el que llegaron las corneas estaba a temperatura inferior a los 4°C no pudiendo realizarse examen en el espejular ni en la lámpara de hendidura.

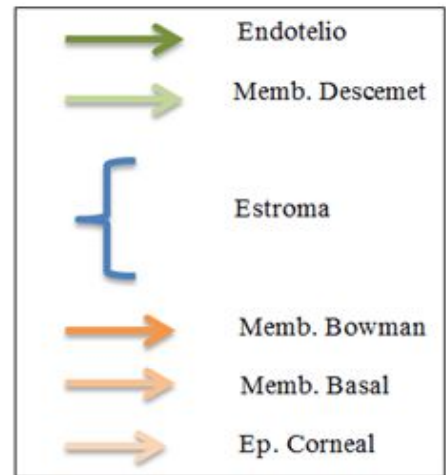
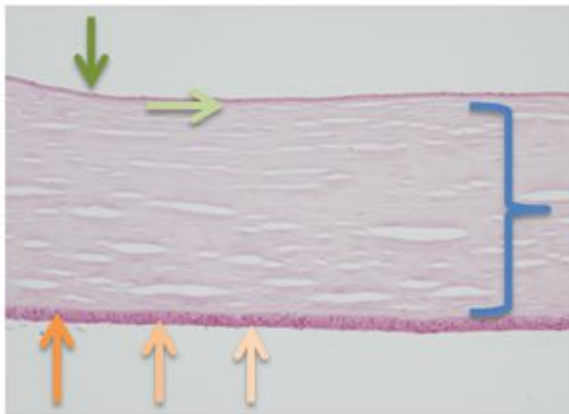


**Figura 20.** Córnea daño endotelial severo.



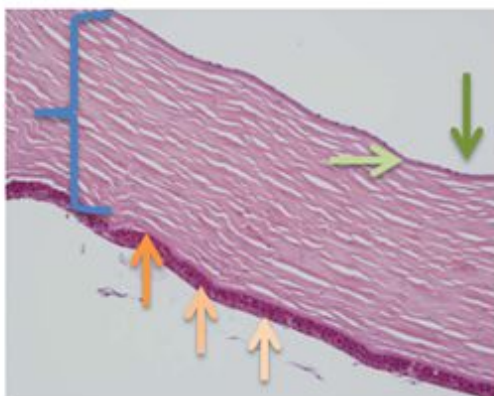
## 2. EXAMEN HISTOLÓGICO

### Córnea control



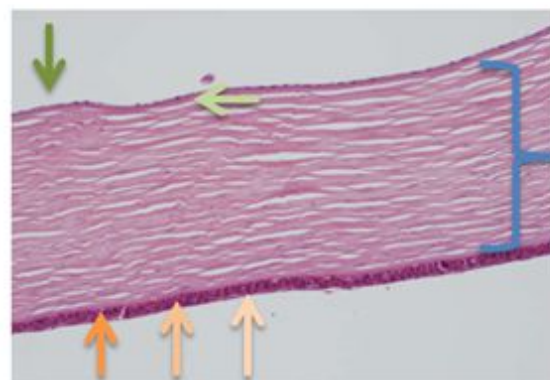
**Figura 21.** Corte histológico de la córnea control.

### Grupo 1: Córneas criopreservadas con albúmina

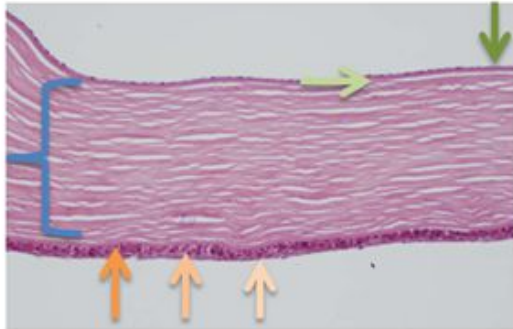


**Figura 22.** Corte histológico de córneas criopreservadas con albúmina.

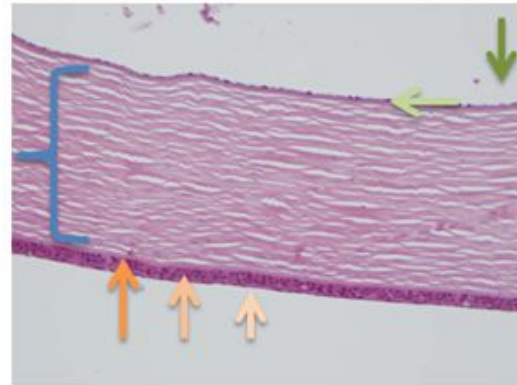
### Grupo 2: Córneas criopreservadas sin albúmina



**Figura 23.** Corte histológico de córnea criopreservadas sin albúmina.

**Grupo 3: Córneas vitrificadas con VS83**

**Figura 24.** Corte histológico de córnea vitrificada con VS83.

**Grupo 4: Córneas vitrificadas con VS55:**

**Figura 25.** Corte histológico de córnea vitrificada con VS55.

Las 6 capas de la córnea están bien preservadas en todos los grupos de estudio.

El epitelio escamoso estratificado está íntegro, asentando sobre una membrana basal nítida y una capa de Bowman íntegras.

El estroma muestra hendiduras (artefacto de fijación) y subyacentemente la membrana de Descemet se reconoce.

Por último, el endotelio está preservado, identificándose un número adecuado de células endoteliales.

La criopreservación permite la conservación de la estructura histológica independientemente de la presencia de albúmina.

La vitrificación presenta una conservación similar de la estructura histológica comparada con las corneas que fueron criopreservadas.

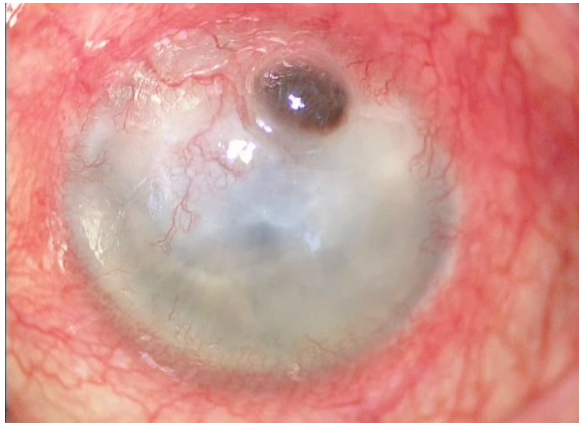
Los dos protocolos de vitrificación muestran similar preservación de la estructura histológica y en el caso de las corneas del grupo 4 vitrificadas con una solución que mantiene la viabilidad celular el endotelio está bien preservado con un número adecuado de células endoteliales, aunque similar al grupo preservado con solución VS83, que mantiene la estructura celular.

### 3. APLICACIONES CLÍNICAS DE CORNEA CRIOPRESERVADA

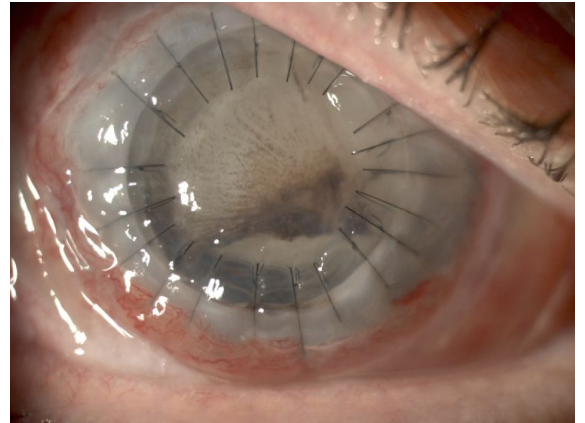


Las córneas criopreservadas pueden ser utilizadas a posteriori en trasplantes tectónicos urgentes por infecciones y perforaciones.

Tras el implante de la córnea criopreservada se puede observar la transparencia de la córnea y el paciente recupera parte de la agudeza visual.



**Figura 27:** Córnea opaca en paciente con queratitis herpética



**Figura 28.** Trasplante tectónico.

## DISCUSIÓN

El trasplante de córnea es uno de los más frecuentes en el mundo. La principal causa médica para rechazar un trasplante de córnea es, previo análisis, el hecho de que un paciente tenga una enfermedad vírica como, por ejemplo, la hepatitis o el VIH que pueda transmitirse al receptor. Por su parte, una vez que la operación se practica el rechazo es posible, aunque al ser un tejido que carece de vasos sanguíneos las posibilidades de que esto ocurra son menores que en las intervenciones de otros órganos. Los Bancos de Ojos, presentes en muchos hospitales españoles desempeñan un papel fundamental en los trasplantes de córneas, ya que procesan hasta 1.000 córneas al año. En los últimos años el número de pacientes que se someten a un trasplante de córnea en España ha ido en aumento.

Hay tres técnicas de conservación y almacenamiento de corneas frío, caliente y criopreservación. El almacenamiento en frío a 2-8°C es el método más utilizado y permite

un almacenamiento hasta 7 días. Las técnicas de conservación en caliente permiten el almacenamiento de córneas hasta 4 semanas. La criopreservación es la única técnica que permite un almacenamiento de tejidos por un período ilimitado. Las técnicas para la criopreservación de córneas se desarrollaron en el 1960 y se aplicaron en clínica (Schultz RO et al; Armitage WJ et al). La supervivencia en general de diferentes tejidos congelados es no obstante únicamente un 20% tras la congelación (Taylor MJ et al; Brockbank KGM et al 2015). El índice de supervivencia de las células endoteliales corneales después de la criopreservación es muy bajo, y la función endotelial no se puede mantener. Li et al mantuvieron almacenadas las corneas en glicerol a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Estas corneas no mostraban un endotelio viable y además su almacenamiento sólo es posible durante 5 años a esta temperatura. Neronov et al mostraron la integridad del endotelio en corneas humanas criopreservadas utilizando como crioprotector 10% de DMSO y una congelación programada con un índice de enfriamiento de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La complejidad de la criopreservación y el daño en el endotelio hace que esta técnica sea poco utilizada de rutina en los bancos de ojos, excepto para uso tectónico en trasplantes urgentes de clínica donde el principal objetivo es salvar el ojo (European Eye Bank Association). Aunque el uso de crioprotectores podría mejorar la eficacia de la congelación, la sensibilidad química de las células endoteliales corneales a los crioprotectores limita enormemente su elección y su uso (Taylor and Hunt). El protocolo de criopreservación utilizado en nuestro Banco utiliza 10% de DMSO y albúmina así como una congelación programada con un índice de enfriamiento de  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Este protocolo utilizado en nuestro Banco de Tejidos, permite la criopreservación de la córnea entera. Al igual que otros autores, permite una buena conservación de las diferentes capas de la córnea. El endotelio está bien preservado con un número adecuado de células endoteliales. Una cornea criopreservada se aplicó en un paciente con una queratitis herpética en la que se pudo apreciar la recuperación la integridad estructural del ojo así como una mejora en la agudeza visual. En el paciente, tras implante se observó una transparencia en la córnea. Estudios de viabilidad en corneas criopreservadas en nuestro Banco de Tejidos con calceína (Fluka) han demostrado la persistencia de células endoteliales viables lo que indica que el protocolo de criopreservación utilizado en nuestro Banco de Tejidos permite la conservación de la viabilidad de las células endoteliales.

Lucas et al compararon la conservación de células endoteliales humanas criopreservadas en medio suplementado con suero humano y las criopreservadas en medio suplementado con suero bovino. No se observaron diferencias en la morfología, proliferación expresión de proteínas en las células que se criopreservaron en los dos medios antes o después de la criopreservación. Las corneas criopreservadas en nuestro Banco de Tejidos se realizaron con y sin albúmina. Aunque también se apreció en ambos casos una correcta conservación de las diferentes capas de la córnea independientemente de la presencia de la albúmina, las corneas criopreservadas con albúmina una vez descongeladas se apreciaron que presentaban un aspecto similar a las corneas en fresco, mostrando una transparencia por lo que se deberían incluir proteínas en la solución de criopreservación de modo similar como ocurre en la mayoría de los protocolos de criopreservación utilizados para la conservación de los diferentes tejidos .

Los resultados no satisfactorios de la criopreservación corneal llevaron a realizar numerosos esfuerzos para desarrollar una nueva técnica alternativa que podría eliminar el daño del tejido causado por el problema del proceso de congelación, la vitrificación (Fahy GM et al). La vitrificación, el proceso de enfriamiento de un líquido en un sólido amorfo sin cristalización está resultando prometedor. La mayoría de los estudios sobre vitrificación están realizados sobre embriones. En ellos se puede observar cómo la vitrificación no afecta a la tasa de supervivencia celular después la descongelación. (María A. Masciangioli, 2011). Los embriones conservan su viabilidad en más de un 90%. En el caso de la vitrificación de espermatozoides, los resultados post vitrificación son también mejores que los obtenidos en la criopreservación (Raúl Sánchez, 2013) reforzando la idea de la vitrificación como mejor método de conservación. Cabrita et al indicaron que debido a su baja toxicidad, el DMSO era un buen crioprotector para los embriones. Sin embargo altas concentraciones de DMSO no pueden ser toleradas por la mayoría de las células. Kevin G.M. Brockbank et al utilizaron la solución VS83 (4.65 mol/l de formamida, 4.65 mol/l DMSO y 3.31 mol/l 1,2 propanodiol en Eurocollins) para vitrificar diferentes tejidos: vasos sanguíneos (Song YC et al), cartílago (Song YC et al), islotes pancreáticos (Song YC et al). La supervivencia funcional de estos tejidos vitrificados fue de 80%. VS83 era apropiado para grandes volúmenes y almacenamiento a -80°C a expensas de mantener la viabilidad. VS55 (3.1 mol/l de formamida, 3.1 mol/l DMSO y 2.2 mol/l 1,2 propanodiol en

Eurocollins) era apropiado para pequeños volúmenes con conservación de la integridad y de la viabilidad celular.

Estudios de vitrificación de corneas se iniciaron en 1989 (Armitage et al; Rich et al). Armitage et al desarrollaron un método de vitrificación que permitiera la recuperación de la función endotelial después de la vitrificación, pero la técnica necesitaba 2.5 horas para añadir y quitar la solución de vitrificación y las corneas estaban muy engrosadas tras la descongelación y la retirada de la solución de vitrificación. Esta técnica resulta difícil para la rutina de un Banco de Tejidos. Por ello es necesario optimizar la técnica de vitrificación.

Los procedimientos para la vitrificación de corneas enteras han sido realizados fundamentalmente en corneas de conejo aunque en su mayoría resultaron en buena conservación de la morfología pero en una insuficiente conservación de la función endotelial (Rich and Armitage; Wusteman et al). Armitage et al demostraron la conservación del endotelio corneal de conejo utilizando un único crioprotector a una alta concentración 6.8M de propanodiol. Por otra parte también en el caso de una cornea humana usando este mismo protocolo observaron conservación del endotelio después de la vitrificación. Pero la córnea de conejo difiere de la humana por ejemplo en el grosor del endotelio y en las propiedades del estroma. En nuestro Banco de Tejidos se vitrificó corneas enteras humanas utilizando las dos soluciones antes mencionadas VS83 y VS55. En ambos casos se aprecia una buena conservación de las diferentes capas de la córnea y en el endotelio también se aprecia un número adecuado de células endoteliales. Sería necesario valorar mediante pruebas de viabilidad como la calceína la viabilidad de las células endoteliales. El endotelio es la capa más interna de la córnea y controla la hidratación corneal. El endotelio es más delgado que la córnea completa y está compuesto de una única monocapa celular. Estas características simplifican la transferencia de calor durante la criopreservación o la vitrificación. Una alta concentración de agentes crioprotectores permeables en las soluciones de vitrificación resulta altamente tóxico y dañino para las células por ello es necesario desarrollar soluciones de vitrificación menos tóxicas. Las soluciones con 1,2 propanodiol o trehalosa muestran resultados alentadores (Bourne WM et al; Cabrita E et al; Christian M et al). El grosor de la muestra es muy importante en la eficacia de la vitrificación, cuanto más delgada es la muestra más fácil es el proceso de vitrificación (Mac Farlane DR et al). Las muestras delgadas pueden ser

enfriadas más rápidamente y los crioprotectores pueden ser utilizados a dosis más bajas (Ryan et al 1990). La vitrificación de células endoteliales corneales de ojos bovinos mostró una viabilidad del 89% utilizando como solución de vitrificación 52% de etilenglicol (w/w), 8% glucosa y 3% condroitin sulfato. Wen-Xia Fan mostraron una viabilidad del 61% utilizando una solución del 25% de 1,2 propanodiol y 35% de trehalosa como agentes crioprotectores en la solución de vitrificación de ojos bovinos y almacenamiento a  $-110^{\circ}\text{C}$ .

Meltendorf utilizaron una solución VS41 (pequeños volúmenes 0.1ml) (3.1 mol/l de formamida, 3.1 mol/l DMSO y 2.2 mol/l 1,2 propanodiol en CPTES) para la vitrificación de las lamelas corneales de ojos de cerdo y posterior almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$ . Únicamente se conservó un 10% de células endoteliales. La toxicidad de los crioprotectores y el propio proceso de vitrificación necesita de un proceso de optimización de la técnica especialmente del proceso de descongelación.

Sería necesario en un trabajo posterior comparar la vitrificación de corneas enteras humanas con vitrificación de las diferentes capas de la córnea concretamente la capa endotelial y determinar no sólo la preservación de la estructura sino la viabilidad de las células.

## **CONCLUSIONES**

- 1.- El protocolo de criopreservación utilizado con 10% de Dimetilsulfoxido y con albúmina o sin albúmina permite la conservación de las diferentes capas de la córnea. El endotelio está bien conservado con un número adecuado de células endoteliales.
- 2.- La inclusión de albúmina en la solución de criopreservación permite la conservación de una cornea transparente con un aspecto similar a la córnea en fresco.
- 3.- Las soluciones de vitrificación utilizadas permiten la conservación de las diferentes capas de la córnea. El endotelio está bien conservado con un número adecuado de células endoteliales.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al personal de la Coordinación de Trasplantes y del Servicio de Oftalmología por su participación.

Al personal del Banco de Tejidos, por su colaboración en las técnicas de conservación.

Al Dr. Marcelino Álvarez por la valoración de las muestras incluidas en este estudio, así como su ayuda en la elaboración de este Trabajo de Fin de Master.

A la Dra. Esther Rendal, sin la cual este trabajo no habría sido posible.

## Bibliografía

- Aisen, A. G. Principios físico-químicos aplicados a la criopreservación de los espermatozoides. (2014). Lima. Encuentro Científico internacional.
- Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K., Alberio, R.H. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (Lama Glama). *Arc. Zoot.* N° 197, Vol. 52: 15-23.
- Armitage W.J. (1989). Survival of corneal endothelium following exposure to a vitrification solution. *Cryobiology*, 26, 318-327.
- Armitage W.J., Rich S.J. (1990). Vitrification of organized tissues. *Cryobiology* 27 (5): 483-491.
- Armitage, W.J., Hall, S.C., Routledge, C. (2002) Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at -110°C. *Inv. Opht. and visual science* 43; 2160-2164.
- Armitage, W.J. (2011) Preservation of human cornea. *Transfus Med Hemother*; 38: 143-147.
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J.I., López, C., León, M.F, Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J.M., Reguero, M.T. (2006). Basic points in cryopreservation. *Rev. Col. Obs. y Gin-* Vol. 57 No. 4 (291-300).
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Rev. Iber. Fert.* Vol. 18 - nº 4.
- Borbolla, J.R. (2002). Nuevo método de criopreservación de células progenitoras hematopoyéticas vuelve más accesible la realización de trasplantes de médula ósea. *Tranferencia.* Año 15. Nº 57: 28-29.
- Bourne, W.M., Shearer, D. R., Nelson, L.R. (1994). Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethyl sulphoxide, 1,2 propanediol and 2,3 butanediol. *Cryobiology* 31: 1-9.
- Brockbank, K. G.M., Zhenzhen, C., Greene, E. D., Campbell, L. H. (2015). Vitrification of Heart valve tissues. Willen F Wolkers and Harriette Oldenholf (eds). *Cryopreservation and freeze-drying protocols. Methods in Molecular Biology* vol: 1257: 399-421.
- Cabrera, P., Fernández, A., Bastidas, P., Molina, M., Bethencourt, A., Díaz, T. (2006). Vitrificación. Una alternativa a la criopreservación de embriones. *Rev. Fac. CC. Vet.* Vol. 47, Nº. 1: 9-23.
- Cabrera, E., Robles, V., Chereguini, O., Wallace, J., Herráez, M.P. (2003) Effect of different cryoprotectants and vitrification solutions on the hatching rate of turbot embryos. *Cryobiology* 47: 204-213.
- Christian, M., Dirk, K.H., Friedrich, H. (2002). Vitrification of posterior corneal lamellae. *Cryobiology* 44: 170-178.
- Ebertz S.L., McGann L.E. (2004) Cryoinjury in endothelial cell monolayers. *Cryobiology* 49 (1): 37-44.



- European Eye Bank Association (2010). Technical guidelines. Revision 4 , January 2010.
- Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Criobiology* 21 (4): 407-426.
- Fan, W., Ma, X., Liu, T., Cui, Z. (2008) Vitrification of corneal endothelial cells in a monolayer. *Jour. of Bioscience and Bioengineering*. Vol 106 No6 610-613.
- Hurí Hawa, M. (2005). Transplante de córnea. Criterio clínico quirúrgico. *Rev. invest. clín.* vol.57 no.2 México mar./abr. 2005.
- Kasai, M., Mukaida, T. (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online*. Aug;9(2):164-70.
- Krabcova, I., Jirsova, K., Bednar, J. (2014) Rapid cooling of the amniotic membrane as a model system for the vitrification of posterior corneal lamellae. *Cell Tissue Bank* 15: 165-173.
- Li, J., Yu, J., Deng, Z., Wang, L., Sin, L., Ma, H., Chen, W. (2011). Deep anterior lamellar keratoplasty using acellular corneal tissue for prevention of allograft rejection in high-risk corneas. *Am J Ophthalmol* 152: 762-770
- Mac Farlane D.R. (1987). Physical aspects of vitrification in aqueous solutions. *Cryobiology* 24: 181-195.
- Masciangioli, M. A., Urbina, M. T., Medina, R. (2011). Viability of re-vitrified mouse embryos at successive stages of development. *Rio de Janeiro. Cong. Lat. Rep. Asist.*
- Meltendorf, C., Hinch, D.K., Hoffmann, F. (2002). Vitrification of posterior corneal lamellae. *Criobiology* 44: 170-178.
- Monferrari, L., Vianna, M., Li, H., Holiman, J.D., Stoeger, C., Belfort Jr, R., Jun, A.S. (2016) Characterization of cryopreserved primary human corneal endothelial cells cultured in human serum-supplemented media. *Arq Bras Oftalmol*; 79: 37-41.
- Morales Becerra, E., Toro Opazo, C. V. (2013). Estandarización de métodos para criopreservación de glóbulos rojos. Chile. *Esc. Tec. Médica*.
- Neronov, A., Mazgalova, J., Cholakova, M., Dimitrova, M., Deligiozova, I., Kovatcheva, S., Nikolova, E. (2005). Integrity of endothelium in cryopreserved human cornea. *Cryoletters* 26(2) 131-136.
- Rich S.J., Armitage W.J. (1990). Propane 1,2diol as a potential component of a vitrification solution for corneas. *Cryobiology*, 27, 42-54.
- Rich, S.J., Armitage, W.J. (1991) Corneal tolerance of vitrifiable concentrations of propane-1,2diol. *Cryobiology* 28 (2): 159-170.
- Rodríguez, M., Prats, L., Cairó, O., Del Río, F., Correa, N., Cifuentes, P., Brassesco, A., Brassesco, M. (2012) Comparación de las tasas de supervivencia de la vitrificación versus la congelación lenta para la criopreservación embrionaria en reproducción asistida. *Rev. Iber. Fertilidad*. Vol 9 N° 3.
- Ryan, K.P., Bald, W.B., Neumann, K., Simonsberger, P., Purse, D.H., Nicholson, D.N. (1990). Cooling rate and ice-crystal measurement in biological specimens plunged into liquid ethane, propane, and Freon 22. *J Microsc* 158 (Pt3): 365-378.
- Sanchez, R., Schulz, M., Risopatron, J., Isachenko, V., Isachenko, E., Vitrificación de espermatozoides: una alternativa a la inyección intracitoplasmática de espermatozoides en paciente con oligoastenozoospermia severa. (2013) *Rev Int Andrologia*. Vol. 11. Enero-Marzo: 36-39.

- Schenke-Layland, K., Xie, J., Heydarkhan-Hagvall, S., Alvarez, S.F., Stock, U.A., Brockbank, K.G.M., MacLellan, W.R. (2007). Optimized preservation of extracellular matrix in cardiac tissues: Implications for long-term graft durability. *El Sevier*. Vol 83, Mayo: 1641–1650.
- Silva, M. E., Berland, M. A. (2004). Successful vitrification with the Open Pulled Straw method (OPS) of bovine blastocysts produced in vitro: Preliminary results. *Arch. med. vet.* v.36 n.1 Valdivia.
- Song, Y.C., Kheirabadi, B.S., Lightfoot, F., Brockbank, K.G.M., Taylor, M.J. (2000). Vitreous cryopreservation maintains the function of vascular grafts. *Nat Biotechnol* 18: 296-299.
- Song, Y.C., An, Y.H., Kang, Q.K., Li, C., Boggs, J.M., Chen, Z., Taylor, M.J., Brockbank, K.G.M. (2004) Vitreous preservation of articular cartilage grafts. *J Invest Surg* 17: 65-70.
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone C. A., Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet.*, 25(2):28-35.
- Taylor, M.J., Hunt, C.J. (1989). Tolerance of corneas to multimolar dimethyl sulfoxide at 0 degrees C. Implications for cryopreservation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30 (3): 400-412.
- Taylor, M. J., Song, Y.C., Brockbank, K.G.M. (2004). Vitrification in tissue preservation: new developments. In: Benson E, Fuller B, Lane N (eds). *Life in the frozen state*. Taylor and Francis Books, London, 603-641.
- Tirado Peña, M.M. (2012). Detección del disco óptico y caracterización de los vasos sanguíneos en imágenes de fondo de ojo.
- Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci.* Jul 2;60-61:357-64.
- Villa, C., Santodomingo, J. (2010). La córnea. Parte I. Estructura, función y anatomía microscópica. *Gac. Ópt.* N°545: 14-18.
- Wen-Xia, F., Xue-Hu, M., Dan, G., Tian-Quing, L., Zhan-Feng, C. (2009). Cryoprotectants for the vitrification of corneal endothelial cells. *Cryobiology* 58: 28-36.
- Wusteman, M.C., Simmonds, J., Vaughan, D., Pegg, D.E. (2008). Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose. *Cryobiology* 56 (1): 62-71 2007.