

Criopreservación de córnea: estudio de la viabilidad celular endotelial y de la histomorfología de la córnea

Rodríguez-Fernández S^{1,5}, Álvarez-Portela M^{2,3}, Rendal-Vázquez ME³, Montero-Salinas A⁴, Piñeiro-Ramil M^{1,5}, Castro-Viñuelas R^{1,5}, de Rojas MV², Sánchez-Ibáñez J³, Fuentes-Boquete IM^{1,5}, Díaz-Prado S^{1,5}.

¹ Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC); A Coruña.

² Servicio de Oftalmología, Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC); SERGAS; A Coruña.

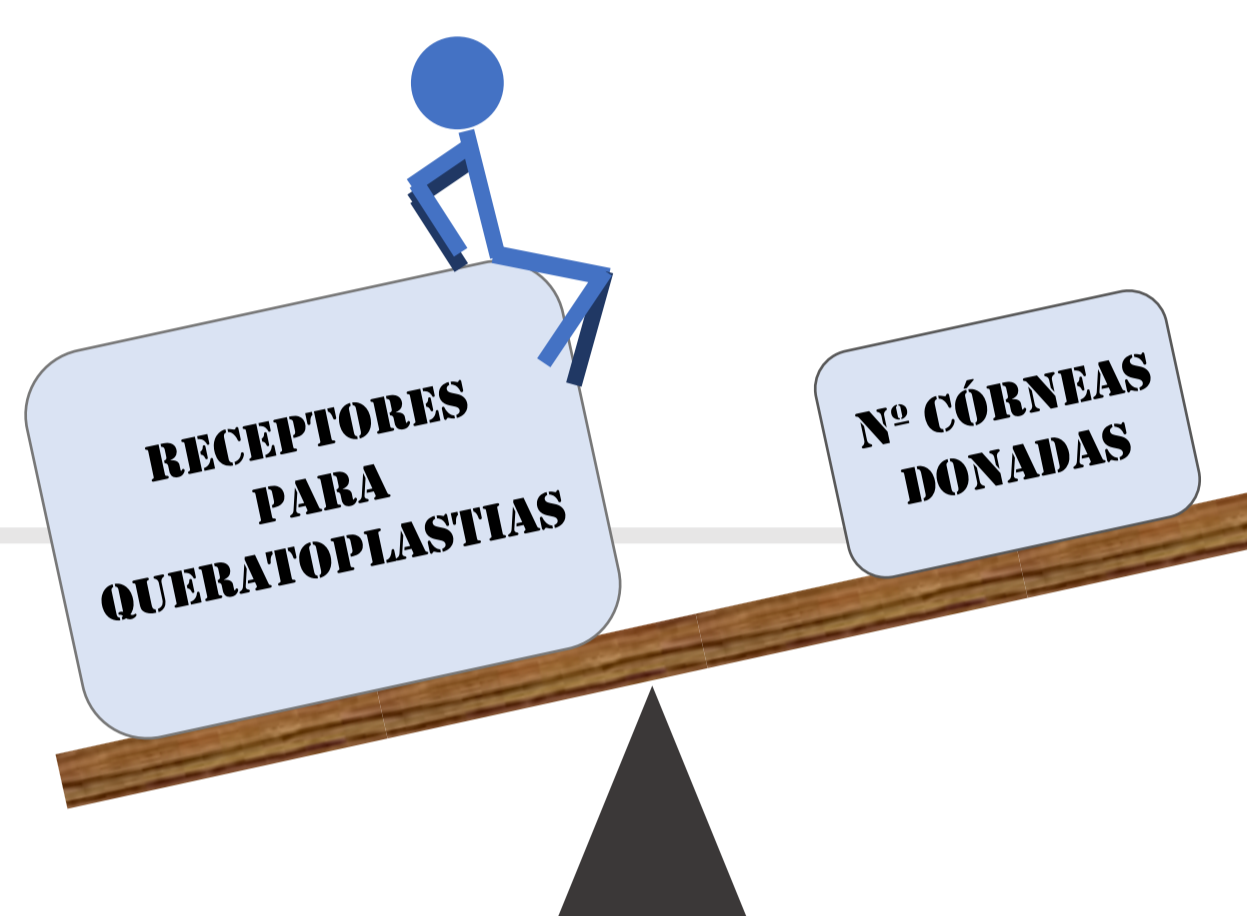
³ Unidad de Criobiología-Banco de Tejidos, CHUAC; SERGAS; A Coruña

⁴ Oficina de Coordinación de Trasplantes, CHUAC; SERGAS; A Coruña

⁵ Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa, Departamento de Fisioterapia, Medicina y Ciencias Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidade da Coruña (UDC); A Coruña

Introducción

El trasplante de córnea (queratoplastia) es uno de los trasplantes más frecuentes del mundo. Sin embargo, existe un desequilibrio entre el número de personas que necesitan una queratoplastia y el número de córneas donadas. La criopreservación podría ser la solución para incrementar la disponibilidad de córneas, pues permitiría almacenarlas durante un tiempo ilimitado. Para esto, las córneas criopreservadas deben mantener su estructura histomorfológica y su viabilidad celular endotelial intactas.



Objetivo

Evaluación preliminar de cuatro protocolos de criopreservación atendiendo a la celularidad, viabilidad celular endotelial y a la estructura histológica de las córneas.

Metodología

Se han criopreservado 12 córneas utilizando 4 protocolos diferentes de criopreservación (Tabla 1). Se ha extraído manualmente el complejo membrana de Descemet-endotelio, y se ha realizado un ensayo sobre él con el kit *LIVE/DEAD imaging* y Hoechst para evaluar la celularidad y la viabilidad celular. Las imágenes obtenidas se han analizado con el programa *Fiji (Fiji Is Just ImageJ)* y se han realizado contajes para determinar el número de células. Para el análisis de la estructura histomorfológica, se ha realizado la tinción de tricrómico de Masson.

Tabla 1. Tipo de criopreservación y agentes crioprotectores utilizados en cada uno de los cuatro protocolos de criopreservación. El número de córneas criopreservadas con cada protocolo es de n=3. DMSO: dimetilsulfóxido, PrOH: 1,2-propanodiol.

	Tipo de criopreservación	Agente crioprotector
Protocolo 1 (n=3)	Criopreservación lenta (CL)	Albúmina DMSO
Protocolo 2 (n=3)	Criopreservación lenta (CL)	DMSO
Protocolo 3 (n=3)	Criopreservación rápida (vitricación; CR)	PrOH DMSO Formamida
Protocolo 4 (n=3)	Criopreservación rápida (vitricación; CR)	PrOH DMSO

Resultados

La celularidad endotelial fue abundante en todas las córneas (en orden decreciente, Protocolos 4, 3, 1 y 2). Respecto a la viabilidad celular, las córneas criopreservadas con el Protocolo 1 presentaron mayor número de células viables (66,79%) (Figura 1 a), mientras que con el resto de los protocolos a penas se conservaron células viables (Protocolo 2) (Figura 1 b), o no hubo ninguna célula viable (Protocolo 3 y 4) (Figura 1 c y d). En todas las córneas, el epitelio sufrió un adelgazamiento (Figura 2, a), y en un caso (Protocolo 1) mostró un epitelio "dentado" por posible formación de hielo extracelular (Figura 2, b). El endotelio se separó del tejido (Protocolos 2, 3 y 4), y las fibras de colágeno del estroma mostraron grandes separaciones entre ellas (Protocolos 1, 3 y 4) (Figura 2, c).

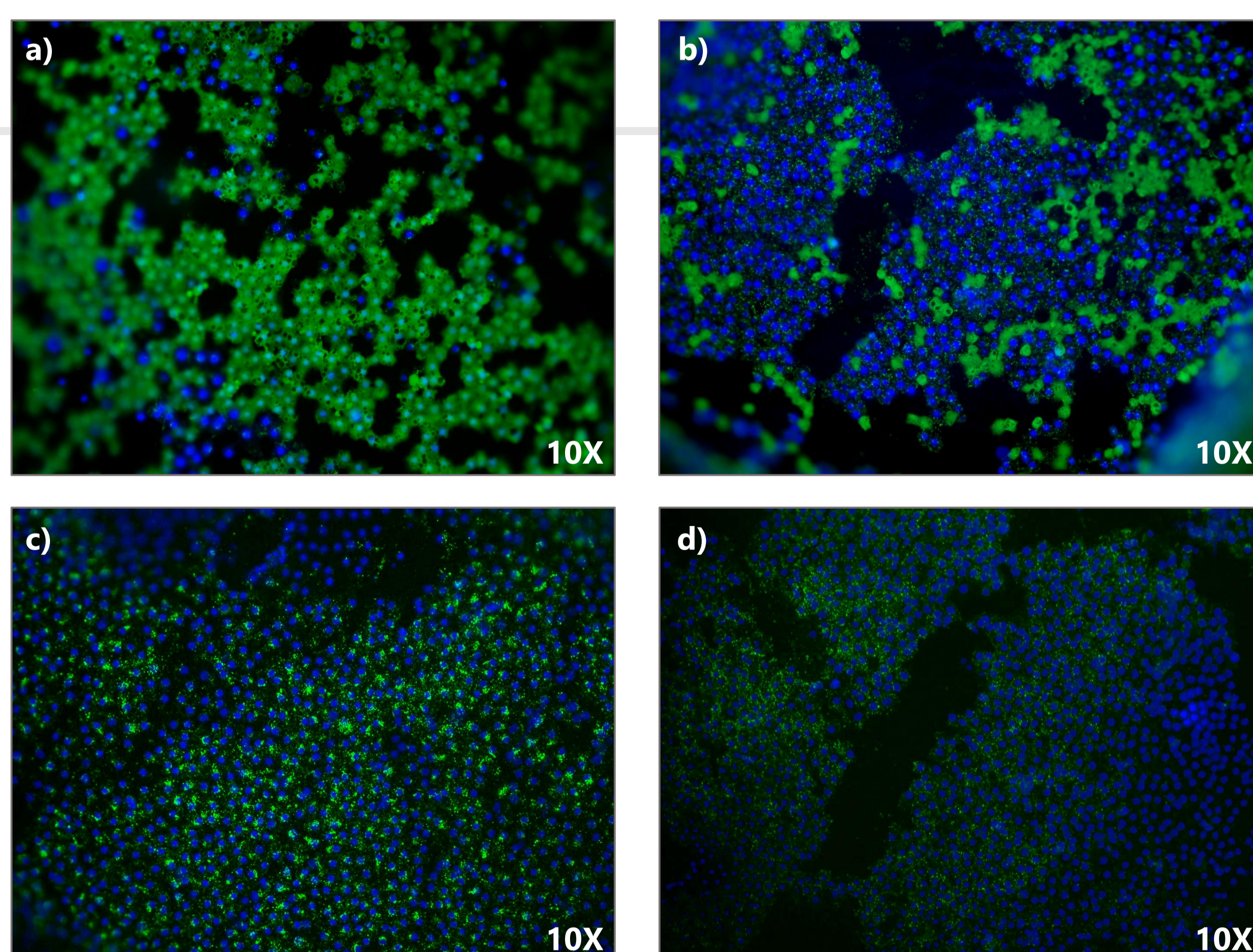


Figura 1. Imágenes de los endotelios tras la tinción con Hoechst (azul) y con el kit *LIVE/DEAD imaging* (verde, calceína), de las córneas criopreservadas con: a), Protocolo 1; b), Protocolo 2; c), Protocolo 3, y d) Protocolo 4.

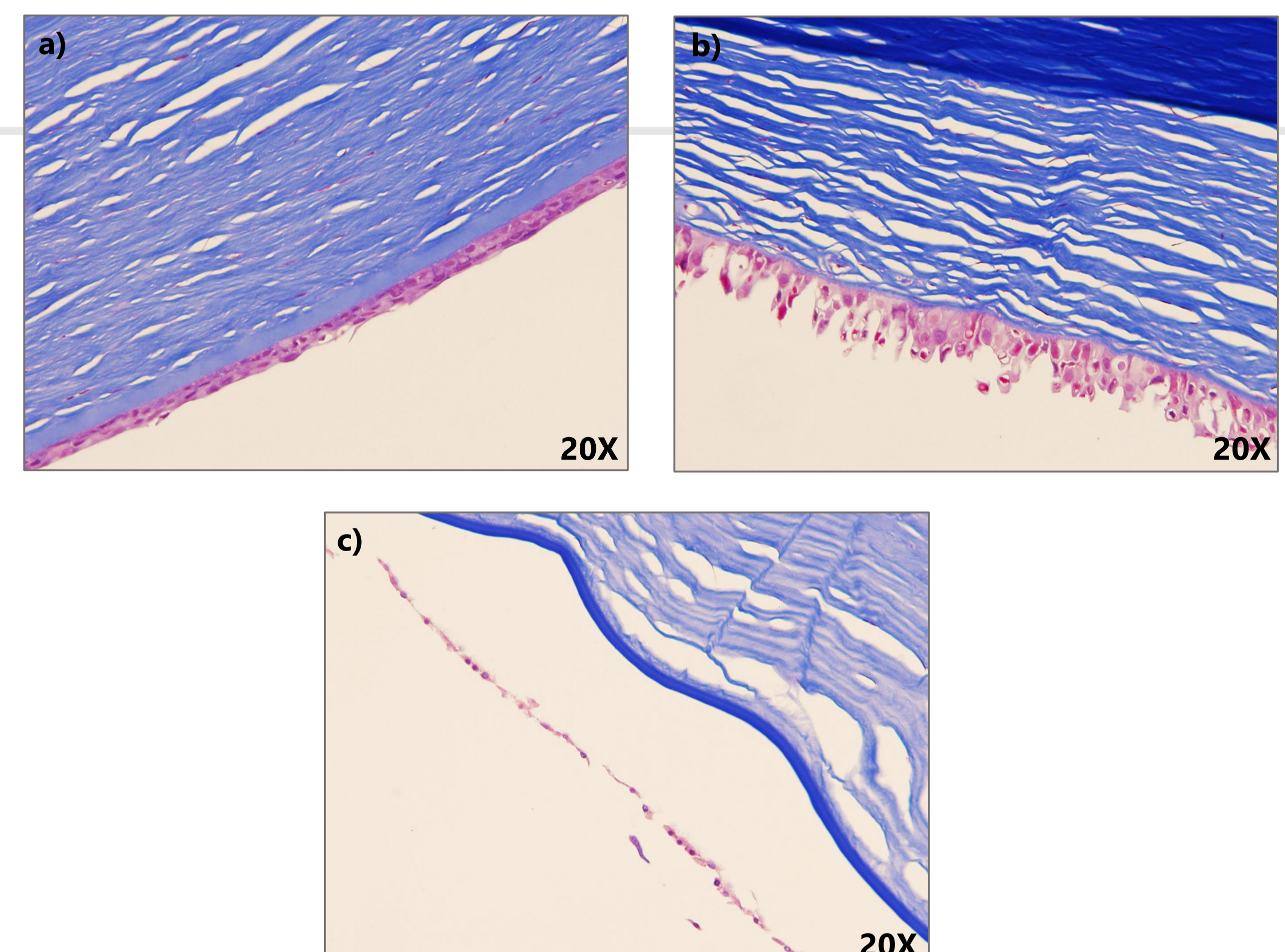


Figura 2. Posibles daños debidos a la criopreservación. a) adelgazamiento de epitelio (Protocolo 1), b) epitelio dentado por posible formación de hielo extracelular (Protocolo 1); c) amplias oquedades en el estroma y separación del endotelio (Protocolo 4).

Conclusiones

La criopreservación de córneas con los cuatro protocolos ofrece una alta celularidad, siendo mayor en las córneas criopreservadas de forma rápida. La viabilidad celular endotelial se ve comprometida con la criopreservación rápida, mientras que con los protocolos de criopreservación lenta se retiene cierta viabilidad. Las capas histológicas muestran posibles daños debidos a la criopreservación en epitelio, estroma y endotelio independientemente del protocolo de criopreservación utilizado.

Contacto: silvia.ma.diaz.prado@sergas.es