

**MÉTODO DE CULTIVO CELULAR DE CÓRNEA COMO ALTERNATIVA SEGURA QUE MEJORA LA OPORTUNIDAD DEL TRASPLANTE DE CÓRNEA HOMÓLOGO A IMPLEMENTAR EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO DEL VALLE. EVARISTO GARCIA. E.S.E- COLOMBIA SEGÚN EXPERIENCIA DEL CENTRO VASCO DE TRANSFUSIÓN Y TEJIDOS HUMANOS- ESPAÑA.**

**\*ELSA LUCÍA GUEVARA SÁNCHEZ**

**\*\*TUTOR: Dr. MIKEL PEREZ VAQUERO**

\*Unidad de servicios de Trasplantes y Banco de Tejidos. Hospital Universitario del Valle-“Evaristo García”. Instituto Nacional de Salud. Ministerio de Protección Social. Colombia.

\*\*Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos (CVTTH). Organización Nacional de Trasplantes (ONT) Madrid.

## **INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES**

La queratoplastia (QP), forma como también se denomina al trasplante de córnea, es una de las técnicas quirúrgicas más antiguas de la oftalmología. Básicamente consiste en la sustitución de una córnea enferma por otra sana. La idea de reemplazar un tejido enfermo por otro sano procedente de un cadáver es casi tan antigua como la propia medicina. Ya en 1796 Erasmus Darwin, abuelo del famoso Charles Darwin, especulaba en uno de sus escritos con la posibilidad de sustituir una córnea opaca por otra transparente. Existen documentos de principios del siglo XIX en los que se describen queratoplastias realizadas en animales de experimentación; no obstante, hasta 1905 no se llevó a cabo el primer trasplante de córnea en humanos, realizado por Edward Zirm quien consolida el método que hoy es la base de millones de cirugías oculares que se realizan en todo el mundo y surge una nueva era para la medicina: la de los trasplantes. En 1940, en la Clínica Barraquer de Barcelona se completó la que probablemente sea la primera queratoplastia hecha en España. En este país, los Dres. Fernández de la Fuente e Iturralde fueron los pioneros en introducir esta técnica. <sup>3</sup>

En 1944 Patón funda en Estados Unidos el primer Banco de Ojos de donador postmortem. A partir de 1950 surge la microcirugía y la técnica “de punch” de Vannas, misma que permitió obtener tejido de córnea prácticamente intacto. En el decenio de 1970 Stocker propuso el papel que juega el endotelio corneal en el mantenimiento de la claridad de la córnea. <sup>1</sup>

El hecho de que la córnea sea un tejido avascular le confiere una gran ventaja respecto a otros órganos trasplantados. Aunque el rechazo es la principal causa de fracaso de las queratoplastias, sus consecuencias son puramente locales y en general pueden ser manejadas de forma adecuada con el uso de colirios inmunosupresores. Sólo en los casos más severos es necesario recurrir al tratamiento sistémico. Este privilegio inmunológico hace que no sea necesario realizar estudios de histocompatibilidad. <sup>3</sup>

Aunque algunos trabajos indican que la afinidad ABO pudiera tener una cierta implicación en el rechazo, lo cierto es que para una primera queratoplastia no se considera necesaria su determinación. Aunque no es el único factor a tener en cuenta, lo que realmente suele marcar el pronóstico de este tipo de cirugía es el estado previo a la cirugía, del ojo receptor. <sup>3</sup>

Muchas son las causas que determinan que una córnea se opacifique parcial o totalmente. La cicatrización producida por heridas, quemaduras, úlceras o infecciones severas invariablemente se traduce en la formación de un tejido opaco, que si bien es beneficioso en cuanto a la conservación del ojo, es terriblemente nocivo en cuanto a la función óptica. Por lo tanto, el tributo que paga la córnea por salvar al ojo es su pérdida de transparencia. En otros casos, a la deformación sigue la presencia de leucomas centrales que vienen a dañar aún más la de por sí deteriorada visión del ojo. Cualquiera que sea la causa, el resultado final es el mismo: pérdida de la transparencia corneal con la consiguiente pérdida de la visión. <sup>2</sup>

Para recobrar la visión en estos casos es necesario realizar una queratoplastia, procedimiento que consiste en reemplazar este tejido dañado por otro de

propiedades similares a la córnea, el cual puede ser de material artificial o de estructura obtenida de seres vivos, en este último caso hablamos de trasplante heterólogo, homólogo o autólogo, dependiendo del origen del injerto. En la mayoría de los casos el origen de la córnea proviene de otro ser humano (Trasplante homólogo), lo cual hace necesario crear una fuente de córneas para poder utilizarlas en dichas ocasiones. Es así como surge el banco de ojos, para la obtención, preparación, conservación y distribución de globos oculares y córneas procedentes de cadáveres.

Actualmente la queratoplastia penetrante de córnea presenta un 90% de éxito global en la mantención de su transparencia. Si éste injerto es realizado en un ojo que ha presentado un rechazo previo o presenta vascularización del estroma corneano, la posibilidad de obtener éxito cae a un 65% en un intervalo de 3 años.<sup>4</sup>

La indicación de queratoplastia ha aumentado en los últimos 30 años, actualmente está entre las cirugías de trasplante más realizadas en el mundo.<sup>5-6</sup>

El aumento en la indicación de queratoplastias se debe al aumento de la expectativa de vida de la población, mejor selección de los potenciales donadores y nuevas técnicas quirúrgicas.<sup>7</sup>

Los Bancos de Tejidos son las entidades que mediante la aplicación de procedimientos y métodos de Buenas Prácticas optimizan los recursos con el objeto de obtener, preservar, procesar, almacenar, transportar y suministrar Tejido Humanos (Decreto 2493 de 2004. Ministerio Protección Social, Colombia), por tanto, el objetivo primordial en el procesamiento de la córnea radica en el mantenimiento de la viabilidad endotelial desde la obtención hasta que es trasplantado.

El cuidado del endotelio es necesario para evitar una excesiva hidratación del estroma. La pérdida de células endoteliales en una córnea sometida a trasplante depende de los siguientes factores:

- Edad del donante,

- Tiempo transcurrido entre la muerte del mismo y la cirugía,
- Medio de conservación,
- Tiempo de almacenamiento y técnica quirúrgica. <sup>11</sup>

Para la conservación del tejido se desarrollaron dos métodos: almacenamiento hipotérmico y medios de cultivo de órganos (M-K, K-sol, Dexsol). En la actualidad, el trasplante de córnea es homólogo y existen dos técnicas quirúrgicas: el trasplante laminar y el trasplante perforante, con las que se evita el edema de la córnea cuando ésta se sumerge en un medio con dextrán. La evaluación de las células epiteliales se realiza con un microscopio especular. <sup>1</sup>

Ahora bien, la posibilidad del trasplante se disminuye ante la falta de oportunidad de tejidos homólogos. En el informe del primer semestre de 2011 de la Coordinación Nacional de la Red de Donación y Trasplantes de Colombia<sup>12</sup>, se evidenció una disminución del 7,9% de donantes de tejidos ocular provenientes de la IPS con respecto al primer semestre del año 2010, ya que se pasó de 203 a 187 donantes. Sin embargo, es el Hospital Universitario del Valle, el principal centro generador de tejidos para la Regional III de Trasplantes y pese a que es un centro habilitado para realizar trasplantes de córnea, se evidencia la poca oportunidad de trasplante que tienen nuestros usuarios en la distribución de tejidos la cual depende de los bancos de tejidos de la ciudad y que en ocasiones la oferta del tejido se genera en tiempos muy estrechos para realizar la respectiva programación quirúrgica sin que se caduque el tejido por ser preservada en medios celulares que no se extienden a más de 14 días. Para el año 2011 se reportaron 18 casos de pacientes en lista de espera, se ofertaron 5 tejidos de córneas por el banco de tejidos proveedor siendo el promedio de espera en dichos pacientes mayor de 180 días y generando mayor espera en el 72% de los pacientes que continúan aumentando el promedio de tiempo de espera el lista.

El Hospital Universitario del Valle. Evaristo García. Empresa Social del Estado se encuentra desarrollando el proyecto de Banco de Tejidos Ocular, con el objetivo de obtener, procesar y distribuir tejidos oculares a sus pacientes y a la Red Nacional, es por ello se plantea alternativas que generen una mayor

oportunidad de uso del tejido corneal de manera segura, de calidad y a la vanguardia de nuevas técnicas de almacenamiento como bien las ha venido realizando el Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos (CVTTH) a partir de los cultivos de tejidos oculares en medio de preservación: Tissue-C (La solución contiene una mezcla antibiótico/antimicótico que garantiza una protección eficaz contra las bacterias y los hongos. El indicador de rojo fenol permite detectar rápidamente la variación de pH. No se precisa cambio del medio durante el período de cultivo), ya que se sabe que la supervivencia del injerto corneal depende de las buenas condiciones en que se conserve el tejido hasta su trasplante en la cual el cuidado del endotelio es necesario para evitar una excesiva hidratación del estroma. Está demostrado que la probabilidad de supervivencia del injerto es proporcional al número de células endoteliales existentes en la córnea trasplantada.<sup>11</sup> Por ello la nueva técnica aplicada en el Hospital Universitario del Valle no solo mejora la oportunidad de trasplantes sino que es una técnica de implementación a la vanguardia de la tecnología actual.

El Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos (CVTTH) durante los últimos tres años (2009, 2010 y 2011) ha ido incrementando su actividad y en lo referente al tejido corneal recibió durante este periodo 527 córneas siendo el Hospital de Cruces, la institución que generó el 28.8% de las córneas. (Tabla 1)

**TABLA 1. DISTRIBUCIÓN DE CÓRNEAS POR HOSPITAL GENERADOR. CVTTH 2009 - 2011**

HOSPITAL GENERADOR	2009	2010	2011	TOTAL	
				Nº	%
H. BASURTO	24	29	53	106	20.1
H. CRUCES	36	54	62	152	28.8
H. GALDAKAO	8	14	17	39	7.4
H. DONOSTIA	44	46	50	140	26.6
H. SANTIAGO	14	18	19	51	9.7
H. TXAGORRITXU	4	2	19	25	4.7
H. VALDECILLA	8	0	0	8	1.5
POLICLINICA GUIPUZCOA	0	4	0	4	0.8
B. SANGRE CANTABRIA	0	2	0	2	0.4
<b>TOTAL</b>	<b>138</b>	<b>169</b>	<b>220</b>	<b>527</b>	<b>100</b>

FUENTE: ESTADÍSTICA CVTTH. (SOFTWARE ODOLBIDE)

De las córneas recibidas en el CVTTH durante el período del 2009 al 2011 fueron validadas 489 córneas (93%), siendo el 14.5% de estas córneas cultivadas a 31°C. (Tabla 2)

**TABLA 2. CÓRNEAS VALIDADAS EN EL CVTTH 2009-2011**

CÓRNEAS VALIDADAS	2009	2010	2011	TOTAL	
				Nº	%
CÓRNEAS REFRIGERADAS A 4°C	116	133	144	394	80.6
CÓRNEAS CULTIVADAS A 31°C	11	21	40	71	14.5
CÓRNEAS CRIOPRESERVADAS	0	5	19	24	4.9
<b>TOTAL</b>	<b>127</b>	<b>159</b>	<b>203</b>	<b>489</b>	<b>100</b>

FUENTE: ESTADÍSTICA CVTTH. (SOFTWARE ODOLBIDE)

En el CVTTH durante este período fueron descartadas 38 córneas (7.8%) del total de las córneas recibidas. La principal causa de descarte de este tejido fue por serología positiva. (Tabla 3)

**TABLA 3. CAUSA DE DESCARTE DE CÓRNEAS EN EL CVTTH 2009 - 2011**

CAUSA DE DESCARTE DE CÓRNEAS		2009	2010	2011	TOTAL
CÓRNEAS REFRIGERADAS	POR CADUCIDAD	1	2	0	3
	POR SEROLOGIA	4	7	6	17
	POR MICROBIOLOGÍA	1	0	0	1
CÓRNEAS CULTIVADAS	POR CADUCIDAD	3	1	2	6
	POR SEROLOGIA	0	0	4	4
	POR MICROBIOLOGIA	0	0	2	2
CÓRNEAS CRIOPRESERVADAS	POR CADUCIDAD	0	0	0	0
	POR SEROLOGIA	0	0	0	0
	POR MICROBIOLOGIA	0	0	2	2
OTRAS	TAMAÑO INSUFICIENTE	2	0	0	2
	FALTA DE ESPECIFICACIONES DEL TEJIDO	0	0	1	1
<b>TOTAL</b>		<b>11</b>	<b>10</b>	<b>17</b>	<b>38</b>

FUENTE: ESTADÍSTICA CVTTH. (SOFTWARE ODOLBIDE)

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Un Banco de Tejidos de vanguardia debe ofrecer alternativas de conservación celular de tejidos oculares seguros y de calidad que mejoren la oportunidad del trasplante de córnea ante la oferta menor de tejidos oculares heterologos. A partir de esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

1. Realizar seguimiento al procedimiento de córnea en medio de preservación en Optisol por 7 días y previamente a las 24 horas de vencimiento realizar técnica de preservación celular hasta 28 días.
2. Realizar medición de células endoteliales existentes en la córnea preservada a 7 días y en la cultivada a 28 días, conservando la técnica de esterilidad desde la obtención hasta el almacenamiento en condiciones de control bacteriológico y seguridad de la córnea según los protocolos del Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos.
3. Adaptar la guía de Tejido de Córnea preservada en Optisol y cultivada en Tissue-C a 31°C, según la experiencia del Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos para el Banco de Tejidos de córnea del Hospital Universitario del Valle. Evaristo García, Empresa Social del Estado (E.S.E).

## **METODOLOGIA**

- Estudio descriptivo y proyectivo de una córnea refrigerada desde su recepción, conservación a 4°C y cultivo a 31°C, hasta su distribución o criopreservación, en el Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos (CVTTH) del País Vasco- España.
- Estudio descriptivo, de corte transversal, de Julio 2011 a Febrero del 2012, en el Centro Vasco de Transfusión y Tejidos Humanos, País Vasco- España, de cinco córneas para evaluar la variación de la densidad celular en su fase de refrigeración a 4°C y cultivo a 31°C
- Revisión bibliográfica sobre la técnica del cultivo de córneas.

## MATERIAL Y METODOS

Con el fin de conocer las técnicas de preservación del tejido corneal, utilizadas en el CVTTH, desde su recepción, conservación a 4°C y cultivo a 31°C, hasta su distribución o criopreservación (Fig. 1), se realizó el seguimiento de una córnea preservada en Optisol a 4°C (es un medio de cultivo buffereado y estéril, el cual es realizado con polipéptidos, un agente osmótico-dextrán, sulfato de condroitina, sulfato de gentamicina, estreptomycin y rojo de fenol como indicador), debidamente rotulada, de un donante fallecido con la siguiente información:

- Edad del donante: 73 años
- Tiempo transcurrido entre la muerte del mismo y la cirugía: 8:30 horas (fallece a las 10:30 am y el equipo extrae el tejido a las 7:00 pm)
- Medio de preservación inicial: Optisol.

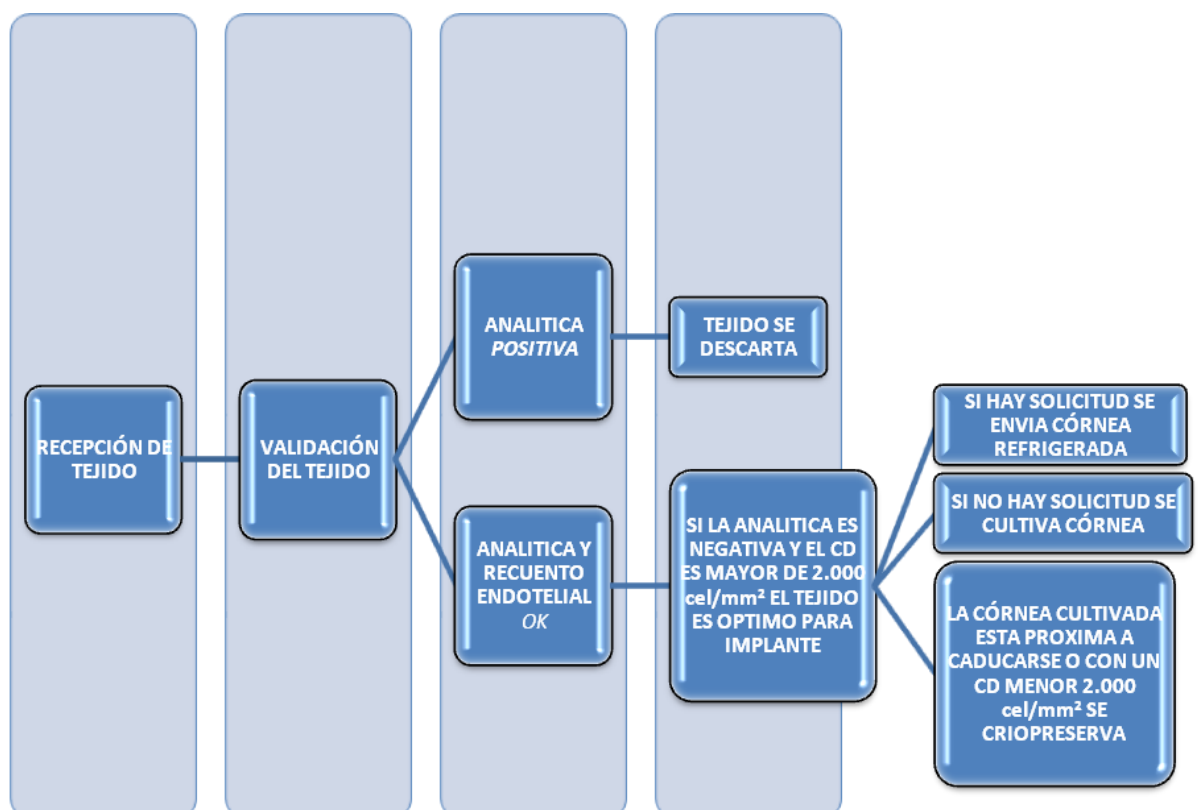


FIG. 1 FLUJOGRAMA DE MANEJO DE LAS CórNEAS EN EL CVTTH

Durante los primeros 6 días, la córnea permaneció en nevera a 4°C, solo fue retirada de la nevera para su lectura en el Kerato Analyzer (es un microscopio especular utilizado para hacer el recuento de células de las córneas y medir los espesores de las mismas, sin retirar la córnea del vial de almacenamiento



para garantizar la esterilidad). No hay evidencia de cambios morfológicos a simple vista es decir se ve transparente, sin defectos epiteliales ni pliegues. (Tabla 4)

**TABLA 4. SEGUIMIENTO DE CÓRNEA PRESERVADA EN OPTISOL A 4°C**

DIA	ACTIVIDAD	OBSERVACIONES Y RESULTADOS DE LECTURA
1	Recepción y Refrigeración	La córnea permanece en nevera a 4°C durante los siguientes 6 días solo se retiro de la nevera para su lectura en el Kerato Analyzer.  Se envían muestras para estudio serológico.  Fin de semana
2	Sin lectura	
3	Primera lectura	* <b>CD: 2833</b> SD: 105 CV: 30 6A: 53 AVE: 353 NUM: 30 Sin cambios morfológicos a simple vista  Resultados de serología "No reactivo"
4	Segunda Lectura	* <b>CD: 2733</b> SD: 149 CV: 36 6A: 59 AVE: 411 NUM: 27 Sin cambios morfológicos a simple vista
5	Tercera Lectura	* <b>CD: 2725</b> SD: 93 CV: 25 6A: 48 AVE: 367 NUM:27 Sin cambios morfológicos a simple vista
6	Córnea en Optisol. Se decide cultivar en TISSUE-C a 31°C	

FUENTE: SOFTWARE KONAN STORAGE SYSTEM, KSS-300 EB, CVTTH

**\*SIGLAS DEL REPORTE DEL RECuento ENDOTELIAL. KONAN STORAGE SYSTEM**

**CD:** Densidad Celular, **SD:** Desviación estándar, **CV:** Coeficiente de variación, **6A:** Porcentaje de hexagonalidad, **AVE:** Medida en mm<sup>2</sup>, **NUM:** Número que ha estimado de la densidad celular.

El día 6, la facultativa decide que la córnea debe ser cultivada con las siguientes observaciones:

**TABLA 5. SEGUIMIENTO DE CORNEA CULTIVADA A 31°C**

DIA	ACTIVIDAD	OBSERVACIONES
6	Toma de los primeros cultivos del medio de preservación (Optisol) para Aerobios, Anaerobios y	Esta actividad se realiza en sala de cultivos bajo campana de flujo laminar y la córnea se mantiene en incubadora a 31°C hasta el día 28 o antes para distribuir

	Hongos	según requerimiento o se criopreserva. La córnea es suspendida en el TISSUE-C por sutura que va adherida al tapón de silicona del vial.
	Se cultiva córnea a 31°C en TISSUE-C	
13	Toma de los segundos cultivos del medio de preservación (TISSUE-C) para Aerobios, Anaerobios y Hongos	Cultivos se obtienen bajo campana de flujo laminar y envían a Microbiología
	Resultado de los primeros cultivos (día 6)	Microbiología informa los cultivos como "NEGATIVOS"
20	Resultado de los segundos cultivos (día 13)	Microbiología informa los cultivos como "NEGATIVOS"
26	Toma de terceros cultivos del medio de preservación (TISSUE-C) para Aerobios, Anaerobios y Hongos	Cultivos se obtienen bajo campana de flujo laminar y envían a Microbiología
	Lectura de la córnea	<b>CD: 2370</b> SD: 180 CV: 43 6A:35 AVE: 422 NUM: 28
	Criopreservación de la córnea	Se procesa en la sala de cultivos. Posteriormente se congela utilizando el congelador programable y luego la córnea es almacenada en tanque de nitrógeno líquido a -180°C, con viabilidad de 10 años
33	Resultado de los terceros cultivos del TISSUE-C (día 26)	Microbiología informa los cultivos como "NEGATIVOS"

FUENTE: SOFTWARE CVTTH Y OBSERVACIÓN DIRECTA

A continuación se describe la técnica de cultivo de córneas que realiza el CVTTH:

EQUIPO NECESARIO:

Nevera, Incubadora, Campana de flujo laminar

MATERIAL NECESARIO:

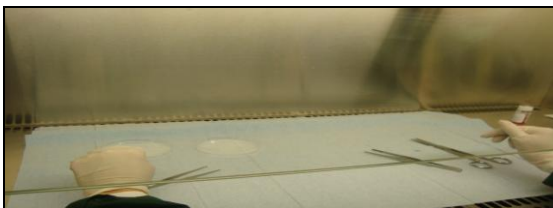
Tejido corneal en medio de conservación (Optisol), sutura de seda con aguja curva para la suspensión de la córnea en la solución de

almacenamiento, tapón de silicona permeable a gas, solución de TISSUE-C para almacenamiento corneal, conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , (retirado de la congelación para refrigerarse a  $4^{\circ}\text{C}$ , 24 horas antes de realizar el cultivo ocular), solución desinfectante (Betadine o iodine solución), parafilm, paño desechable estéril, elementos de protección personal desechables: Gorro, bata, mascarilla polainas y guantes, jeringa desechable estéril de 10 ml, gasas estériles, placas de Petri estéril, dos cultivos: para aerobios y anaerobios, instrumental estéril: 2 pinzas de disección sin garra y una tijera, recipiente de bioseguridad para agujas (guardián), recipientes para desechos.

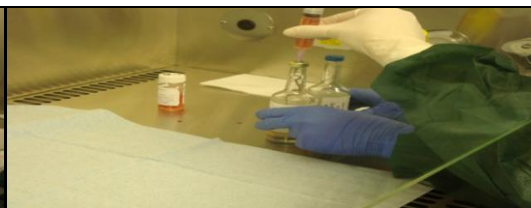
**NOTA:** Todo el material se habrá dispuesto en una mesa auxiliar y dos personas realizaran el proceso, una auxiliar manipulara el material no estéril y facilitara a la otra el material estéril, la segunda con guantes estériles realizara el procedimiento teniendo en cuenta con rigurosidad las normas de asepsia.

### PROCEDIMIENTO

1. Previa limpieza con alcohol al 70%, encender campana de flujo laminar 15 minutos antes de iniciar el procedimiento. Utilizar vestimenta desechable estéril, elementos de bioseguridad y con guantes estériles extender paño desechable estéril sobre la superficie interior de la campana, colocar placa de Petri e instrumental. Tomar el frasco de Optisol que contiene la córnea, abrirlo y con una jeringa tomar 3 ml del medio de conservación para cultivos de microbiología. Primero tomar el cultivo de anaerobios y luego el de aerobios y hongos, limpiando con solución desinfectante el sitio de inserción de la aguja.

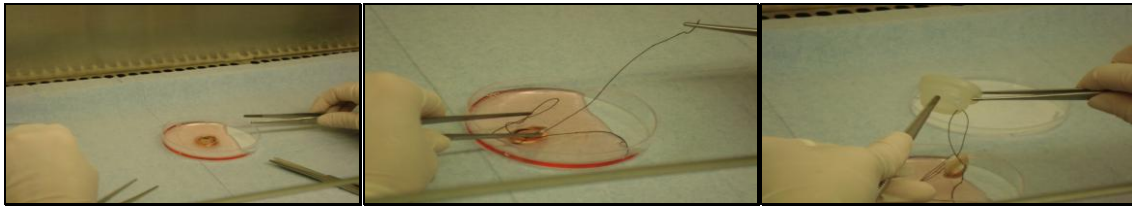


**FIG. 2** CAMPANA E INSTRUMENTAL LISTO



**FIG. 3** TOMA CULTIVOS DEL OPTISOL

2. Invertir el frasco con Optisol y verter la córnea en una Placa de Petri estéril. Abrir el paquete de seda con la aguja y con ayuda de unas pinzas, sin tocar con la mano, depositarla con el Optisol de la placa de Petri. Con la ayuda de unas pinzas pasar la aguja con la sutura a través de la esclera y sujetar la aguja en la pestaña o borde interior del tapón de silicona permeable a gas. Cortar con las tijeras la sutura que sobra.



**FIG. 4** Córnea en caja Petri

**FIG. 5** Sutura en esclera

**FIG. 6** Córnea sujeta a tapón

3. Limpiar tapa y cuello del frasco de TISSUE-C con solución desinfectante impregnada en gasas estériles, sumergir la córnea en el TISSUE-C, regulando la longitud de la sutura de manera que el tejido este sumergido como mínimo 1 cm sin tocar las paredes del frasco. Cerrar el frasco de TISSUE-C, tapar con parafilm y llevarlo a la incubadora a 31°C.



**FIG. 7** Córnea en TISSUE-C

**FIG. 8** Tapón con parafilm

**FIG. 9** Córnea en incubadora 31°C

Cuando se decide cultivar córneas, el método para posicionar la córnea en el medio de preservación durante la conservación difiere en los Bancos de Ojos. Muy a menudo es posicionada del lado epitelial hacia abajo en un recipiente de plástico o vidrio que contiene el medio. Durante el cultivo, las capas epiteliales se desprenden en el medio, lo cual ocasiona la presencia de desechos en la parte inferior del vial de cultivo. Por lo tanto, una desventaja de posicionar una córnea en la parte inferior del frasco, es que se acumulan los desechos en y alrededor de la córnea en forma de cuenco. Para superar este problema, se sutura del borde escleral y se une al tapón del frasco de modo que la córnea

quede colgada verticalmente en el medio de cultivo. Como una alternativa, existen varios tipos de soportes de plástico que unidos a la tapa del frasco están disponibles para posicionar el córnea. Estos dispositivos flotantes pueden mejorar la eficacia de la manipulación de tejidos, ser rentables ya que puede reducir el tiempo de procesamiento de tejidos, y minimizar el riesgo de daño a los tejidos inadvertida, con lo que se logra mejorar la calidad del tejido. <sup>19</sup>

### **EVALUACIÓN CORNEAL: AZUL TRIPÁN**

A los 20 – 28 días desde la extracción y después de mantener la córnea a 31°C, se realiza la evaluación corneal mediante tinción con azul tripán y toma muestra para microbiología del Tissue-C. Tras la tinción la córnea se pasa a conservar en Optisol a 4°C.

El azul tripán es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas o tejidos con la membrana celular intacta no son coloreados debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de la membrana. En las células viables, el azul tripán no es absorbido; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas (por estar dañadas, el azul tripán puede penetrar el citoplasma, y colorear el núcleo). Por lo tanto, las células muertas se muestran de un distintivo color azul bajo el microscopio o bajo una cámara Neubauer. Debido a que las células vivas son excluidas de la tinción, este método también es llamado método de tinción por exclusión. <sup>18</sup>

### **TÉCNICA DE TINCIÓN CON AZUL TRIPÁN**

NOTA: Para este procedimiento se requiere que todo el material esté dispuesto en una mesa auxiliar y dos personas realicen el proceso en la sala estéril bajo campana de flujo laminar, una auxiliar manipulara el material no estéril y facilitara a la otra el material estéril, la segunda con guantes estériles realizara el procedimiento teniendo en cuenta con rigurosidad las normas de asepsia.

## PROCEDIMIENTO

1. Se retira la córnea de medio de preservación (Tissue-C) y se sumerge en un poco de PBS (Es una solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio. Mientras que los grupos fosfato mantienen el pH estable, la osmolaridad coincide con la del cuerpo humano).
2. Se seca suavemente la córnea en una gasa estéril y se deposita en posición cóncava (boca arriba), en un soporte de evaluación (de silicona) que contiene una gota PBS.
3. Al mismo tiempo en una placa de Petri pequeña estéril se pone Sucrosa al 50% con PBS (1 ml de cada uno).
4. Añadir 2 a 3 gotas de azul tripán, con una pipeta pasteur, en la cara endotelial y se deja por un minuto (sin que manche la esclera), pasado este tiempo se retira el azul de tripán sumergiendo la córnea en PBS. En este paso se aprovecha para tomar muestra para microbiología del Tissue-C.
5. La córnea se deposita nuevamente en el soporte de silicona y se añade Sucrosa (usado para visualizar los bordes de las células endoteliales, por su efecto osmótico) también en la cara endotelial, que la cubra y se deja un minuto.
6. Se pasa a la placa de Petri con Sucrosa y PBS, se tapa y se coloca en posición convexa (boca abajo), se observa al microscopio y se realiza el recuento celular. Tiene que estar inmerso en líquido para ser observado mejor, de manera rápida según pasa el tiempo se observa peor. Tener la precaución de no dejar burbuja debajo de la córnea para permitir la lectura.
7. Después de evaluación, la córnea se pasa a Optisol.
8. A las 24 horas se toma nueva muestra de microbiología del Optisol.

Revisando retrospectivamente desde Julio del 2011 hasta la fecha, encontré 5 córneas que fueron cultivadas con sus respectivas lecturas así:

**TABLA 6. SEGUIMIENTO DE CÓRNEAS CULTIVADAS, CVTHH.  
JULIO 2011-FEBRERO 2012**

DESCRIPCIÓN		CÓRNEA 1	CORNEA 2	CORNEA 3	CORNEA 4	CORNEA 5
<b>Fecha Extracción</b>		21/07/11	29/07/11	07/08/11	22/08/11	21/12/11
<b>Edad del donante</b>		83 años	61 años	72 años	69 años	80 años
<b>1 lectura córnea refrigerada</b>	<b>CD</b>	<b>2525</b>	<b>3115</b>	<b>2725</b>	<b>2475</b>	<b>2841</b>
	6A	73	75	48	67	58
	AVE	396	321	367	404	352
<b>Ultima lectura de córnea cultivada a 31°C</b>	<b>CD</b>	<b>2217</b>	<b>2976</b>	<b>2392</b>	<b>2222</b>	<b>2653</b>
	6A	51	67	65	45	58
	AVE	451	336	418	450	352
<b>% variación CD</b>		<b>12.2%</b>	<b>4.5%</b>	<b>12.2%</b>	<b>10.2%</b>	<b>6.4%</b>
<b>Reporte de cultivos</b>	1.	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos
	2.	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos
	3.	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos	Negativos
<b>Destino Final</b>		Implante	Criopreservac	Criopreservac	Implante	Implante
<b>F. distribución</b>		19/08/11	Almacenam	Almacenam	22/09/11	19/01//12
<b>E. implantadora</b>		H. Cruces	Ninguno	Ninguno	H. Cruces	H. Cruces
<b>Seguimiento post-implante</b>		Satisfactorio	No ha sido implantado	No ha sido implantado	Satisfactorio	Satisfactorio

FUENTE: SOFTWARE ODOLBIDE Y PROTOCOLO DE CÓRNEA CULTIVADA. CVTTH

## RESULTADOS

En la tabla 4. Se registran los datos del seguimiento realizado en el CVTTH a una córnea en Optisol a 4°C, durante los primeros 6 días desde la extracción hasta su cultivo, sin observarse cambios morfológicos evidentes a simple vista, durante ese lapso de tiempo la córnea se retiró temporalmente de la nevera

para realizarle la lectura correspondiente. El tejido se obtuvo de un donante de 73 años. Los criterios de selección de un donante de tejido ocular en España, no se determinan por su edad sino por que posean óptima calidad estructural y endotelial.

En la tabla 5. Igualmente se registran las actividades realizadas a la misma córnea en su fase de cultivo hasta la criopreservación. Si se compara la primera lectura del tejido en refrigeración y la última lectura en cultivo la densidad celular inicial es de 2.833 y la última es de 2.370 con una variación de 6.3%, es decir que el tejido en los 26 días posteriores a la extracción presentó pérdida de células siendo el tejido aun viable para trasplante homólogo por tener un conteo celular mayor a 2.000 células/mm<sup>2</sup>. Al cumplir el tejido el tiempo estipulado para cultivo se decide criopreservar y así darle una viabilidad de 10 años.

La manipulación y toma de cultivos del medio de preservación para microbiología, se obtuvieron bajo campana de flujo laminar con las técnicas de seguridad indicadas. Los resultados de cultivos de todas las muestras de microbiología fueron reportados como negativos.

En la tabla 6. Para conocer la viabilidad endotelial de la córnea desde la obtención del tejido hasta el trasplante, que permitiera conocer que la sobrevivencia del tejido corneal depende de las condiciones en que se conserve procurando evitar la excesiva hidratación del estroma. Se realizó la revisión retrospectiva del manejo y la lectura de cinco córneas cultivadas en el CVTHH, entre Julio del 2011 y febrero del 2012. Esta revisión mostró:

- La edad de los donantes de tejido ocular oscila entre 61 y 83 años.
- La variación de la Densidad Celular (CD) entre la primera lectura de córnea refrigerada a 4°C y la última lectura de la córnea cultivada a 31°C, se encuentra entre 4.5% y 12.2% con un recuento de células superiores a 2.217 células/mm<sup>2</sup>, siendo tejidos óptimos para implante.
- Los tres cultivos de las soluciones de preservación, tomados para



Anaerobios, Aerobios y Hongos, de cada uno de los tejidos evaluados, fueron reportados como negativos.

- Tres córneas fueron implantadas y dos córneas fueron criopreservadas. Ninguna fue descartada por caducidad ni por cultivos positivos (contaminación).
- Tres córneas se distribuyeron y fueron implantadas en el Hospital de Cruces y dos córneas siguen almacenadas en el CVTTH en criopreservación.
- Reporte de evolución satisfactoria de los pacientes a quienes se le realizaron los implantes de córneas.

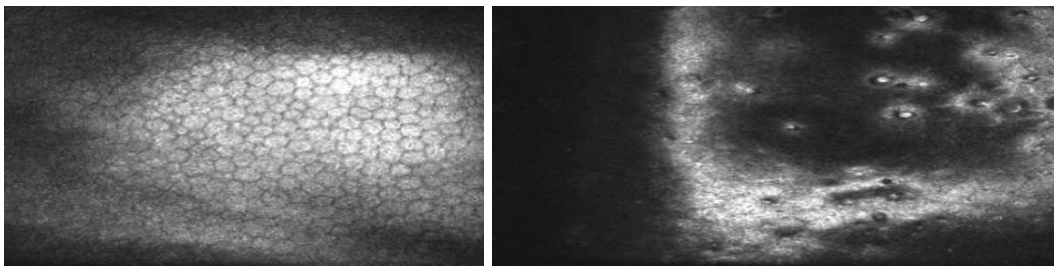
## **DISCUSIÓN**

El número de trasplantes de córnea en el mundo, como otros trasplantes, no alcanza a suplir la demanda de ellos. En nuestro servicio existe aún un gran número de pacientes que no han podido ser trasplantados. Siendo la principal limitante para la mejoría de este panorama la falta de donantes, pareciera ser un reflejo de la desinformación por parte de la población, como de los propios médicos, junto a obstáculos legales y culturales.<sup>9-10</sup>

Una característica del endotelio corneal y a diferencia del epitelio, es su incapacidad para la renovación celular. Esto origina una pérdida de población celular con la edad, así como una disminución de su grosor al estar obligadas a cubrir toda la superficie corneal posterior. Este envejecimiento puede darse de forma exagerada en distrofias y como consecuencia de patología o cirugía ocular. Los estudios del endotelio corneal han sido objeto del mayor interés desde su posibilidad de estudio clínico, que permite el análisis de las estructuras celulares y de su densidad. En el adulto joven existen entre 3.000 y 3.500 células/mm<sup>2</sup>, estimándose como críticas la cifras entre 500 y 700 células/mm<sup>2</sup>. La pérdida endotelial se manifiesta además por el polimegetismo (diversidad de tamaño entre las células), pleomorfismo (diversidad de formas) y aumento de la poligonalidad, asociado a un incremento de la permeabilidad.<sup>13</sup>

Una densidad celular de 3.000 células/mm<sup>2</sup> es infrecuente en los injertos corneales, por muy frescos que estén. En la actualidad se considera que la edad del donador o el tiempo postmortem no influyen en la densidad final de las células epiteliales durante el tiempo de almacenamiento.<sup>14-15</sup>

Para el trasplante corneal se requiere de córneas que posean óptima calidad estructural y endotelial (Fig. 9), sin atender a la edad del donante, pues en ocasiones observamos adultos mayores con excelente endotelio con más 2.600 células por mm<sup>2</sup>, frente a donantes adultos más jóvenes con córnea Guttata (Fig. 10) o marcado pleomorfismo, por lo cual se contraindica su uso para trasplante perforantes, aunque pueden utilizarse para trasplantes lamelares o no perforantes predesceméticos con fin óptico —utilizando el endotelio del receptor.<sup>16</sup>



**FIG. 9** CORNEA CON ENDOTELIO NORMAL    **FIG.10** Córnea no útil para trasplante perforante

Durante el almacenamiento, la pérdida de células endoteliales, no se ha relacionado con una causa específica, pero los factores de riesgo como la muerte traumática, las infecciones de herpes, y mal controlados los niveles de endotoxina se debe considerar cuando se toman acciones preventivas. Por el momento, un segundo recuento endotelial antes del injerto debe llevarse a cabo. La posibilidad de realizar este segundo recuento es una de las ventajas reconocidas del almacenamiento de cultivo de órganos.<sup>20</sup>

El cultivo de córneas a 31°C es un método de preservación para aquellas córneas que no se van a trasplantar como corneas frescas antes de su vencimiento post-extracción y que tienen un recuento endotelial previo al cultivo mayor de 2.000 células/ mm<sup>2</sup>.<sup>8</sup>

En el estudio de Builes N. y otros: “Mayor pérdida endotelial de córneas en cultivo de órganos” explican la importancia del segundo recuento endotelial,

sugiere que el recuento de células endoteliales que los resultados funcionales y celulares de la queratoplastia no están dramáticamente afectador por la edad de los donantes muy viejos. Teniendo en cuenta el envejecimiento de la población de Europa, los muy ancianos no deben considerarse fuera de los límites de adquisición de la córnea.

La creciente necesidad de córneas junto con los requisitos de seguridad particularmente relacionadas con el gran número de exámenes serológicos y la selección estricta de los donantes en relación con las enfermedades priónicas y el acentuado desequilibrio entre la oferta y la demanda y el envejecimiento de la población a establecido la necesidad de no determinar un límite de edad para el donante potencial de córneas.<sup>21</sup>

Las soluciones de cultivo básicas incluyen: medio esencial mínimo (MEM), el MEM con estabilización de L-glutamina, M199, el DIF de 1000, la ordenación forestal sostenible, F-99 y F-99 con ácido ascórbico, insulina, bFGF, transferrina, selenio y lípidos (denominada F-99-Sr).

Todos los medios se suplementaron con 2% de suero fetal de ternera (FCS). A excepción del MEM, que también se estudio en 8% de FCS. La mayoría de los medios de preservación ensayados (MEM 2%, MEM-G, M199, F99, F99 y Sr), mostraron datos potenciales comparables para cultivos de órganos corneal en 2% de FCS suplementación. Sin embargo hubo una tendencia clara para el medio MFS de mantener una mayor densidad de células endoteliales y la viabilidad a 2% de FCS. SFM se debe evaluar exhaustivamente en ausencia de suero y posiblemente refinado y optimizado.<sup>22</sup>

El cultivo de córneas a 31°C permite reconocer y desechar las córneas con la contaminación microbiana durante el almacenamiento. Este método reduce significativamente la frecuencia de complicaciones postoperatorias por infecciones en comparación con el almacenamiento hipotérmico.<sup>23</sup>

Después de 14 años de queratoplastias penetrantes realizadas con córneas almacenadas en MK, no se observaron diferencias significativas en la agudeza visual, la densidad de las células endoteliales, y la pérdida de células.<sup>24</sup>

La córnea guttata (alteración de la córnea en la que se forman acumulos focales en la cara posterior en forma de “granitos” microscópicos y que se traduce en la alteración profunda del endotelio corneal) puede ser detectado durante el cultivo de órganos por medio de microscopia de luz. Se asocia con una disminución en el coeficiente endotelial, figura celular y densidad celular. La presencia de guttata agrupados se asocia con peor supervivencia del injerto y la etapa más frecuente de córnea guttata es en el injerto después del trasplante.

## **ALTERNATIVAS FUTURAS**

Además de ser un escudo protector, la córnea representa dos tercios de poder de refracción del ojo. Patologías corneales pueden afectar una o todas las capas de la córnea, produciendo opacidad de la córnea. Aunque la queratoplastia total del espesor corneal ha sido el procedimiento estándar, la estrategia ideal sería la de sustituir sólo la capa dañada. Las dificultades actuales en el trasplante de córnea, el rechazo inmunológico y sobre todo la escasez de la oferta de tejidos, hace necesario poner más énfasis en el desarrollo de córneas artificiales. Bioingeniería de córneas como dispositivos protésicos útiles únicamente para la sustitución de la función de la córnea, ingeniería tisular de hidrogeles que permiten la regeneración del tejido. Recientemente, los principales avances en la biología de las células madre de la córnea se han logrado. Sin embargo, el uso terapéutico de estos tipos de células madre tiene la desventaja de necesitar un compartimento de células madre intacta, que normalmente se daña. Además, el cultivo ex vivo es necesario para generar un número suficiente de células para trasplante. En un futuro cercano, la combinación de biomateriales avanzados con células abundantes de fuentes externas permitirá avanzar en este campo. En el primer caso, el colágeno alineado magnéticamente es uno de los más prometedores. En el último caso, los diferentes tipos de células serán óptimas: 1) para el reemplazo del epitelio: epitelio de la mucosa oral, la epidermis del oído, o de médula ósea, las células madre mesenquimales, 2) para la regeneración del estroma: células madre derivadas de adipositos y 3) para la sustitución

endotelial, la posibilidad de in vitro dirigido, de diferenciación de células mesenquimales de tejido adiposo hacia células endoteliales.<sup>17</sup>

## BIBLIOGRAFIA

1. Gutiérrez Salinas J y col. Historia del trasplante de córneas y los medios para su preservación. *Med Int Mex* 2005; 21:380-5.
2. PENA R, Juan-Luis, REDEL S, Iván, PAYAHUELA D, Nidia *et al.* Trasplante de Córnea: Perfil Epidemiológico y Resultados en 9 años de experiencia. *CIMEL*, 2005, vol.10, no.2, p.14-21. ISSN 1680-8398.
3. A. Garralda y otros. Trasplante de córnea. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2006; 29 (Supl. 2): 163-174
4. The Collaborative Corneal Transplantation Studies Research Group. Effectiveness of histocompatibility matching in high-risk corneal transplantation. The Collaborative Corneal Transplantation Studies (CCTS). [commented *Arch Ophthalmol* 1992;100:1517-8]. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1392-403.
5. Acedo JT. Queratoplastias y queratoprotesis. Barcelona: EdikaMed; 1992.
6. Belfort Jr R. Ceratoplastias e ceratectomia. In: Belfort Jr R, Kara-Jose N. Córnea. São Paulo: Roca; 1996. pag.493-504.
7. Lindquist TD, McGlothan JS, Rotkis WM, Chandler JW. Indications for penetrating Keratoplasty: 1980-1988. *Cornea* 1991;10:210-6.
8. BT0046P: Sistemática de trabajo con globos oculares/corneas, CVTTH, Versión Junio 2008, pág. 12-13.
9. Diamond AG, Champion M, Mussoline JF, D'Amico RA. Obtaining consent for eye donation. *Am J Ophthalmol* 1987;103:198-203.
10. Alves MR, Crestana FP, Kanatami R, Cresta FB, José NK. Doação de córneas: opinião e conhecimento de médicos intensivistas do Complexo Hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rev Med (São Paulo)*.
11. Frueh BE, Bohnke M. Prospective, randomized clinical evaluation of optisol vs organ culture corneal storage media. *Arch Ophthalmol* 2000; 118 (6): 757-760.

12. Informe del primer semestre de 2011 de la Coordinación Nacional de la Red de Donación y Trasplantes de Colombia.
13. Waring GO, Bourne BM, Edelhauser HF et al. The corneal endothelium normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 1982;89:531-590.
14. Sperling S. Endothelial cell density in donor corneas. *Acta Ophthalmol* 1980;58:278-82.
15. Wiffen SJ, Nelson LR, Ali AF, Bourne WM. Morphologic assessment of corneal endothelium by specular microscopy in evaluation of donor corneas for transplantation. *Cornea* 1995;14:554-61.
16. Armitage WJ, Dick AD, Bourne WM. Predicting endothelial cell loss and long-term corneal graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(8):3326-31.
17. De Miguel MP, Alio JL, Arnalich-Montiel F, Fuentes-Julian S, de Benito-Llopis L, Amparo F, Bataille L, Cornea and ocular surface treatment, 2010 Jun;5(2):195-204.
18. Azul tripán (C.I. 23850) para microscopia. Hoja informativa sobre el producto comercial. Merck.
19. J T Lie, F M Lock, P G H Mulder, J van der Wees, G R J Melles, Floating device for donor corneas in organ culture. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1676-1678 doi:10.1136/bjo.2008.140574.
20. Builles N, Kodjikian L, Burillon C, and Damour O, Major Endothelial Loss From Corneas in Organ Culture Importance of Second Endothelial Count,. *Córnea* 2006 Aug; 25 (7):815-20.
21. P Gain, G Thuret, C Chiquet, P Rizzi, J L Pugniet, S Acquart, J J Colpart, J C Le Petit, J Maugery, Cornea procurement from very old donors: post organ culture cornea outcome and recipient graft outcome. *Br J Ophthalmol* 2002;86:404–411.
22. T Møller-Pedersen, U Hartmann, H J Møller, N Ehlers, K Engelmann, Evaluation of potential organ culture media for eye banking using human donor corneas. *Br J Ophthalmol* 2001;85:1075–1079.

23. Fontana L, Errani P, Zerbinati A, Musacchi Y, and Tassinari G. Frequency of Positive Donor Rim Cultures After Penetrating Keratoplasty Using Hypothermic and Organ-Cultured Donor Corneas. *Córneas*. de Jun de 2007; 26 (5) :552-6.
24. Rijnveld WJ, L Remeijer, van Rij G, H Beekhuis, E Pels. Prospective clinical evaluation of McCarey-Kaufman and organ culture cornea preservation media: 14-year follow-up. 2008 Oct;27(9):996-1000.
25. Borderie V, Sabolic V, Touzeau O, Scheer S, Santos Carvajal-Gonzalez, Laroche L. Screening human donor corneas during organ culture for the presence of guttae. *Br J Ophthalmol* 2001;85:272–276
26. Thuret G, Carricajo A, Chiquet C, Vautrin AC, Celle N, Boureille M, Acquart S, Aubert G, Maugery J, Gain P. Sensitivity and rapidity of blood culture bottles in the detection of cornea organ culture media contamination by bacteria and fungi. *Br J Ophthalmol*. 2002 Dec;86(12):1422-7.