

Preservación de córneas para trasplante en medio de cultivo MCB

Evangelina Galán de Chapa,* Pedro A Rodríguez J,** Rafael Campos,** Laura Ruiz,** Juan B Kouri,*** J Carlos Guerrero,** Verónica Ponce,** Jesús A Chapa Delgado****

RESUMEN

Se compara la viabilidad endotelial de córneas de conejo, conservadas en tres medios diferentes durante 48, 72 y 96 horas valoradas mediante la tinción con azul de tripano, microscopía de luz y microscopía electrónica. Material y métodos: Fueron analizadas 20 córneas divididas de la siguiente manera: ocho se conservaron en Optisol, 10 en MCB y dos en solución salina balanceada, mantenidas a 4° C. Resultados: En las córneas mantenidas en solución salina balanceada se observó destrucción de las células endoteliales a las 48 horas. En córneas preservadas en MCB y Optisol se apreció destrucción de un 5-10% de las células a las 72 horas. La destrucción fue del 20% después de 96 horas y de 30% luego de 105 horas en las células preservadas en el medio MCB. El estudio de microscopía electrónica de transmisión también confirmó que las células estructuralmente se encuentran preservadas hasta las 90 horas tanto en Optisol como en MCB. Conclusión: El medio de preservación para córneas producido en México (MCB) mantiene el tejido corneal hasta por 90 horas, de manera similar al Optisol, pero a un costo considerablemente menor.

Palabras clave: Preservación, córnea, endotelio corneal, trasplante.

ABSTRACT

We compared the endothelial viability of rabbit corneas, preserved in three different storage medium for 48, 72 and 96 hours, being evaluated with trypan blue, light microscopy and transmission electron microscopy. Methods: The 20 cases were divided as follows: 8 corneas conserved in Optisol, 10 in MCB and 2 corneas in balanced saline solution, maintaining their temperature at 4° C. Results: We observed at 48 hours in balanced saline solution, endothelial cell destruction. Preserved corneas in MCB and Optisol, appreciated destruction in a 5%-10% of the cells at 72 hours of the preservation, after 96 hours in MCB the destruction is about 20%, and after 105 hours the destruction is 30% in the same medium. This cases, observed by the transmission electronic microscopy, confirm that the cells have been structurally preserved up to a 90 hours in Optisol and MCB. Conclusion: The medium produced in Mexico (MCB) preserved the corneal tissue for 90 hours, like Optisol, but being less expensive.

Key words: Preservation, cornea, corneal endothelium, transplantation.

INTRODUCCIÓN

En 1974, Mc Carey y Kaufman describieron una técnica para la preservación de endotelio corneal hasta por 96 horas. Existen otros medios que preservan el endotelio corneal durante 14 días.^{1,2}

El trasplante corneal es una técnica quirúrgica que en los últimos años se ha perfeccionado, lo que permite pronosticar los resultados con mayor seguridad, algunos de los casos más favorecidos por este tipo de técnicas son: opacidades secundarias a traumatismos, queratocono, úlceras, queratitis intersticial, quemaduras térmicas o químicas poco intensas, degeneraciones corneales y leucomas rodeados por tejido corneal sano. Este procedimiento proporciona mejor calidad de vida para los pacientes. Uno de los objetivos primarios del almacenaje corneal en medios de cultivo, es mantener la viabilidad endotelial desde la obtención del botón donador hasta antes del trasplante.

El tejido fresco aún lo usan algunos, si es que pueden localizar al paciente a tiempo ya que sólo permanece el tejido viable por 24 horas.

* Patología del Hospital Central Militar.

** Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional (IPN).

*** Unidad de Microscopía Electrónica. CINVESTAV del IPN.

**** Hospital ABC.

Recibido para publicación: 16/11/00. Aceptado para publicación: 13/02/01.

Dirección para correspondencia: Evangelina Galán de Chapa
Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional.
Paseo Lomas del Sol. Huixquilucan, 52789 Estado de México. Fax: 5291-23-39

El tejido congelado se utilizó como en el caso de la epikeratofaquia que consistía en un lentículo corneal tallado que se suturaba sobre la córnea desepitelizada de un paciente, generalmente niño áfaco, al cual no se le implantó lente intraocular por el riesgo que esto implica.^{17,19,20}

Frueh y colaboradores publicaron datos clínicos de cuenta de células endoteliales a los treinta días de preservación; sin embargo, no ha habido un estudio histopatológico de cambios durante un prolongado periodo de cultivo, lo cual podría arrojar luz de las capacidades y límites del sistema establecido.²¹

El objetivo de este estudio es comparar la eficacia del medio de preservación corneal MCB (elaborado en México) con el Optisol (elaborado en los Estados Unidos de Norteamérica) y la solución salina balanceada (SSB). El MCB es un medio de costo considerablemente menor al Optisol y puede ser usado en los bancos de ojos para almacenamiento a corto plazo: 90 horas, tiempo necesario para llevar a cabo las pruebas de laboratorio requeridas, localización del paciente receptor y transporte del tejido a su destinatario, logrando con ello una disminución en los costos para poder ser utilizado en los hospitales mexicanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

La preparación del medio de cultivo MCB se llevó a cabo de la siguiente manera: Al medio 199 se le añadió dextran hasta alcanzar una concentración de 5%, gentamicina 10 mg/mL, citrato trisódico dihidratado 0.02 g/mL, 0.025 M Herpes buffer a pH 7.4. La esterilización se realizó por filtración a través de filtros de 0.22 U.M, se prepararon pequeños volúmenes esterilizados en una jeringa de 50 mL y se conectó a un filtro de Swinnex de 47 mm de diámetro. El medio así tratado se distribuyó en viales de 20 mL, previamente esterilizados. A diferencia del Optisol, este último contiene condroitin sulfato 2.5% y dextran 1%.

El medio Mc Kaufman original, contenía dextran para la deshidratación artificial del tejido, manteniendo así su transparencia y grosor.⁴

Se sacrificaron 10 conejos de Nueva Zelanda, posteriormente los ojos les fueron enucleados y las córneas²² fueron almacenadas de la siguiente manera: 12 en MCB, 10 en Optisol y 2 en SSB durante 48, 72, 96 y 105 horas a 4º C. Las córneas se estabilizaron a temperatura ambiente (24º C) y se valoró la viabilidad del endotelio a través de la aplicación de azul de tripano al 1% diluido en NaCl al 5% en una proporción de 4:1 durante 2 minutos las preparaciones fueron revisadas mediante microscopio de luz a 40X y 200X.⁵

Se estudiaron cortes anteroposteriores de córneas teñidos con hematoxilina-eosina en el microscopio de luz a 100X y 200X después de 48, 72 y 96 horas de almacenamiento en los tres medios de preservación previamente mencionados.

Se practicó microscopía electrónica de transmisión, con preparación de las muestras de la siguiente manera: se fijaron dos muestras en glutaraldehído al 2.5% una hora; se lavaron tres veces con PBS con pH 7.4 (con tiempo de cinco minutos cada uno), después se fijó en tetraóxido de osmio al 1% durante una hora y se lavó como se mencionó anteriormente. Se deshidrató en alcohol del 60% y absoluto con cambios de 10 minutos en cada porcentaje de alcohol y al llegar a la concentración del 100% (absoluto) se hicieron tres cambios con intervalo de 15 minutos; se infiltraron en resina Spurr en concentraciones: 1:1, 3:1 y tres cambios en resina pura de tres horas cada uno. Posteriormente se polimerizó a 60º C por 36 horas. Se obtuvieron cortes semifinos, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio de luz. Se hicieron los cortes finos y se contrastaron con metales pesados (acetato de uranilo y citrato de plomo).

En cuanto a la estadística se realizaron cálculos de prueba de hipótesis con (nivel de significancia) $\alpha = 0.01$ con t de Student.

RESULTADOS

Todas las córneas preservadas en MCB y Optisol por 96 horas permanecieron transparentes macroscópicamente y a la lámpara de hendidura.

Las células recién obtenidas y teñidas con azul de tripano eran de forma hexagonal, con citoplasma uniforme en forma y tamaño. A las 48 horas tanto en el

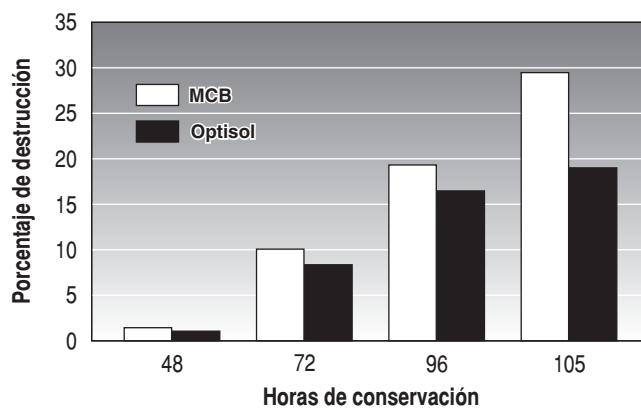
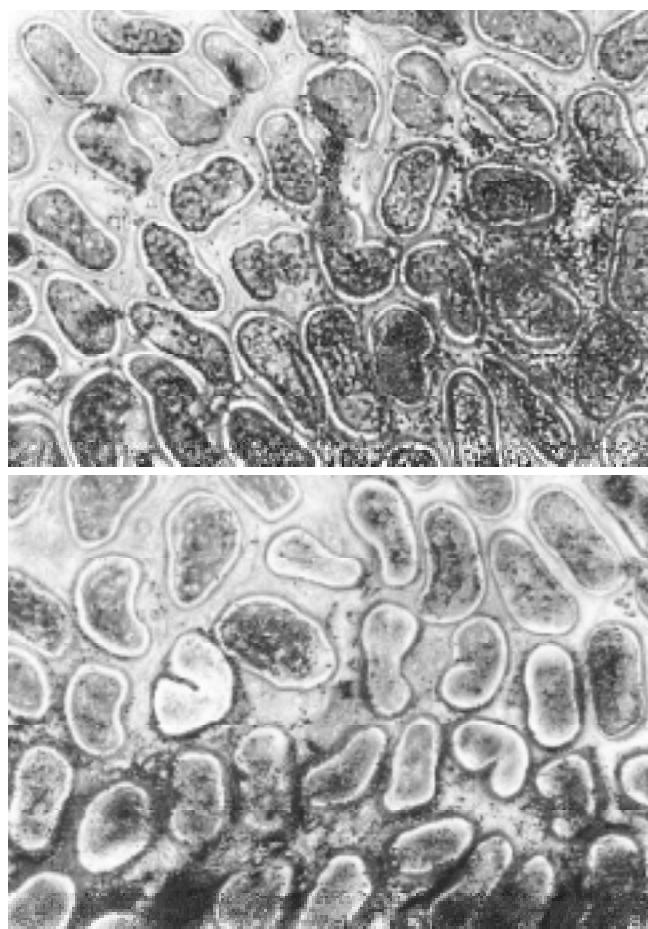


Figura 1. Porcentaje de destrucción celular de acuerdo al tiempo de conservación.



Figuras 2 y 3. Fotomicrografías que muestran iguales condiciones de células endoteliales de córnea con una viabilidad óptima a las 72 horas de preservación tanto en el medio MCB como en el Optisol. Se aprecian células endoteliales con núcleos alargados y conservación de la membrana plasmática, preservando sus límites intercelulares. (Azul de tripano. 40X).

medio Optisol como en el MCB se observaron las mismas características morfológicas del anterior, lo cual refleja una buena conservación del endotelio corneal.

Después de las 72 horas de preservación, tanto en MCB como en Optisol se observaron células endoteliales con núcleos alargados, pero límites celulares bien definidos, lo cual denotó buena viabilidad endotelial. El 10% de células conservadas en MCB y 8.6% de las conservadas en Optisol se encontraron alteradas y no viables (Figura 1).

A las 96 horas de preservación, en Optisol se observó el 83.4% de células viables y el 16.63% de células con numerosas granulaciones anormales (Figura 1). En el medio MCB, el 80.6% de las células endoteliales eran viables y el 19.4 % se encontraron dañadas con núcleos picnóticos próximos a car-

riorexis o fragmentación incipiente, vacuolación de su citoplasma (granular) con mala definición de los bordes celulares así como aumento en el espacio intercelular (Figuras 2 a 4).

En corte sagital de córnea teñido con hematoxilina y eosina, después de 48 horas de preservación del tejido corneal en Optisol y MCB, el endotelio corneal se encontró intacto. La preservación en SSB por 48 horas provocó una destrucción celular severa, con re-

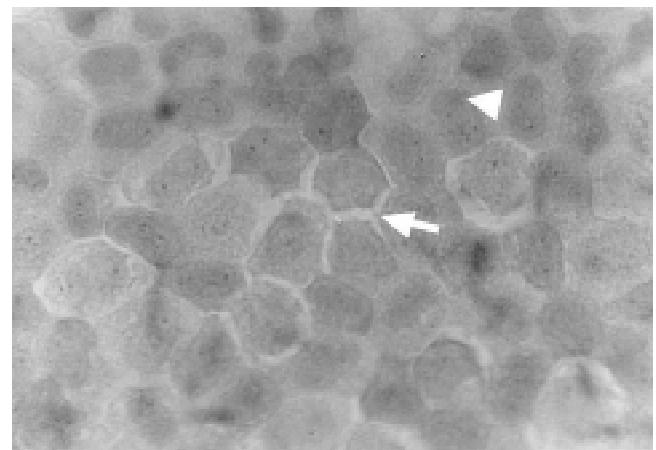


Figura 4. Fotomicrografía que muestra células endoteliales preservadas a las 96 horas en MCB. Se observan algunas células sanas (cabeza de flecha) y células dañadas con amplios espacios intercelulares, con núcleos picnóticos próximos a cariorrexis, vacuolización de su citoplasma (granular) sin preservación de sus bordes celulares (flechas). Las células normales conservan sus límites intercelulares y su viabilidad. (Azul de tripano. 200X).

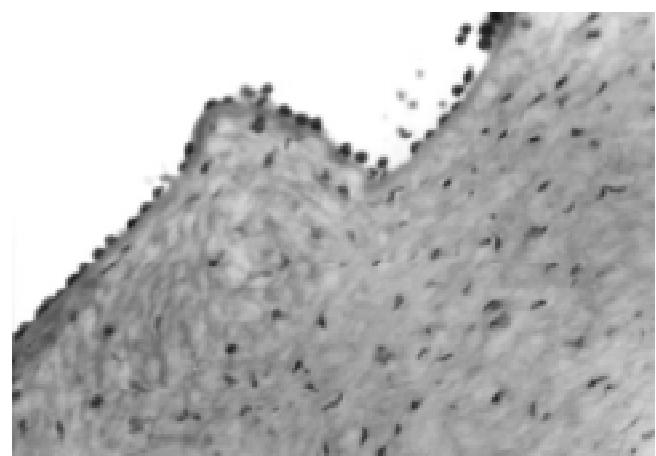
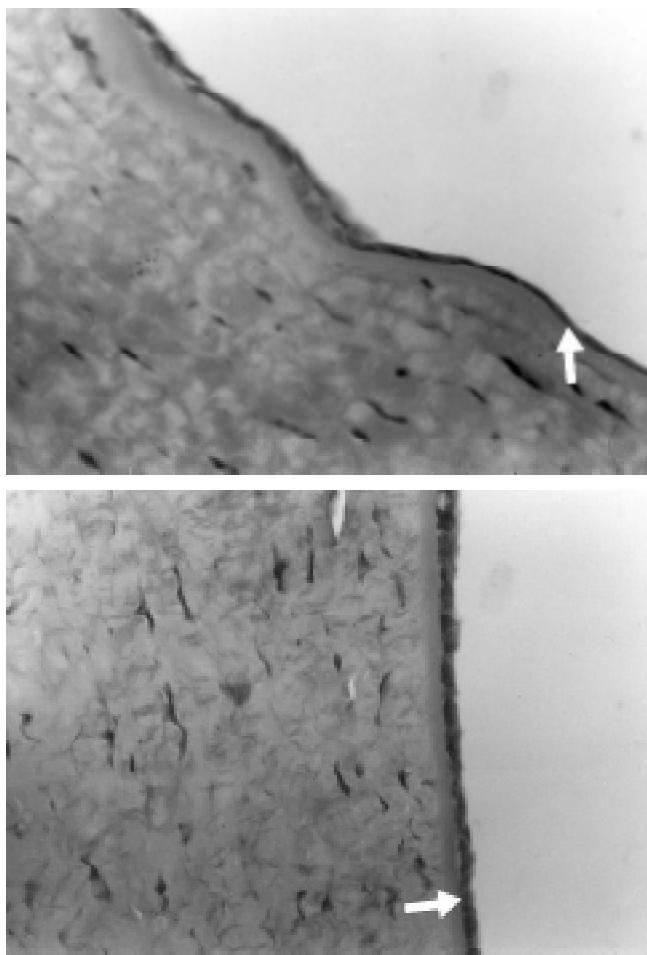


Figura 5. Fotomicrografía que muestra corte sagital de córnea de conejo a las 48 horas de preservación en solución salina balanceada. Se observa destrucción severa del endotelio corneal con disminución del número de células e incremento del espacio intercelular y alteración de la forma de la célula. (Hematoxilina y eosina. 100X).



Figuras 6 y 7. Fotomicrografías que muestran adecuada conservación del endotelio corneal a las 96 horas (flechas) de preservación, tanto en medio MCB como en Optisol. (Hematoxilina y eosina. 100X).

tracción del citoplasma de las células y separación de las mismas, la forma de las células se tornó redonda y se incrementó el espacio intercelular (Figura 5).

A las 72 horas de preservación corneal tanto en el medio Optisol como en el MCB los cambios fueron similares, los núcleos de forma alargada y el citoplasma granular, pero hubo buena viabilidad endotelial.

A las 96 horas se observó mayor aplanamiento de las células endoteliales conservadas en MCB que aquellas conservadas en Optisol, pero con buena viabilidad (Figuras 6 y 7).

En el estudio por microscopía electrónica de transmisión se encontraron los siguientes hallazgos:

El tejido preservado en solución salina por 48 horas mostró marcados cambios de muerte celular, dichos cambios son: edema de las mitocondrias, vacuolas citoplasmáticas y aumento de los espacios in-

tercelulares por cambios degenerativos, estas alteraciones no se presentan en el control (Figuras 8 y 9). A las 96 horas hubo buena viabilidad celular en tejido preservado en el medio MCB, sin edema de mitocondrias, ni formación de vacuolas intracitoplasmáticas en la mayor parte del endotelio corneal, la membrana celular se mantuvo íntegra con preservación de los espacios intercelulares. A los cinco días (110 horas) se observó claramente, conservación de la unión intercelular, se mantuvo en algunos puntos

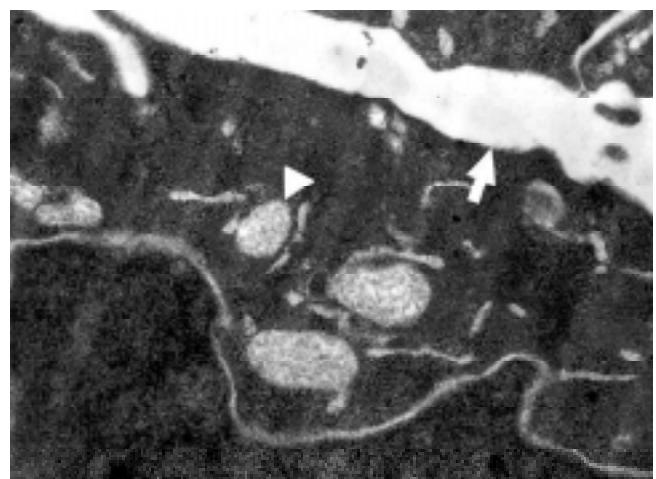


Figura 8. Electromicrografía de tejido preservado en solución salina balanceada a las 48 horas. Se observan cambios de muerte celular, tales como edema mitocondrial (cabeza de flecha), vacuolas citoplasmáticas y aumento de los espacios intercelulares (flecha). (X 40,000 K).

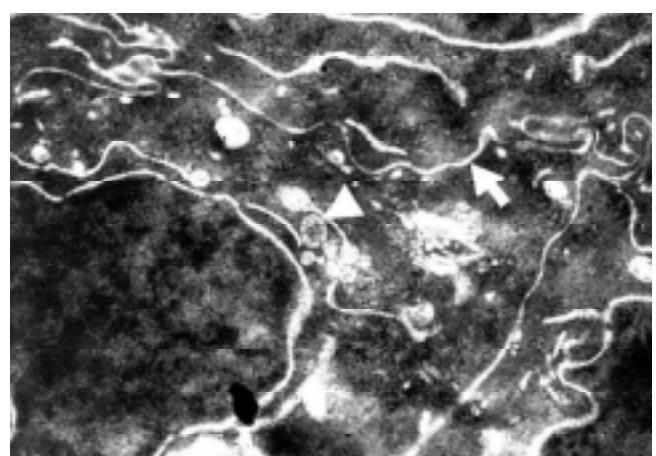


Figura 9. Electromicrografía que muestra preservación de células endoteliales en MCB a las 96 horas. Se observa buena viabilidad celular, no hay edema de mitocondrias (cabeza de flecha) ni formación de vacuolas; membrana celular íntegra con preservación de los espacios intercelulares (flecha), conservación del complejo de Golgi y retículo endoplasmático rugoso. (X 30,000 K).

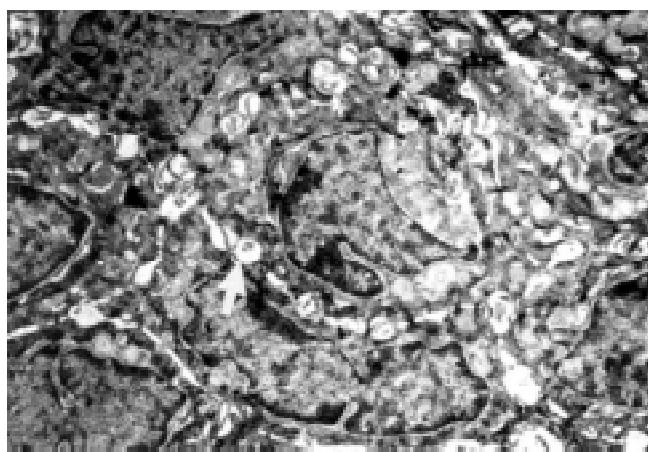


Figura 10. Electromicrografía que muestra preservación de las células endoteliales en MCB a las 110 horas (cinco días). Se observa la conservación de los complejos de unión intercelular sólo en algunos puntos por condensación incipiente del citoplasma de las células. (X 10,000 K).

por condensación incipiente del citoplasma de las células (Figura 10).

En cuanto a la estadística se realizaron cálculos de prueba de hipótesis con (nivel de significancia) $\alpha = 0.01$ con t de Student.

En cuanto al porcentaje de destrucción celular con el mismo nivel de significancia y la t crítica de 2.92 para 16 grados de libertad se encontró lo siguiente: Entre el medio nacional e internacional no hubo diferencia estadísticamente significativa a las 48 y a las 72 horas.

Se tuvo una t crítica de 1.31 a las 48 horas y a las 72 horas una t crítica de 1.70.

Mientras que a las 96 horas la t crítica encontrada fue de 3.04, lo que indica una diferencia estadísticamente significativa a favor del medio importado. Lo cual se reafirma a las 120 horas (cinco días) al presentar una t crítica de 8.71. Se puede concluir que el medio nacional preserva menos de 96 horas.

Al calcular el porcentaje de destrucción celular para 90 horas se encontró que era de 17.55%, con lo cual se concluye que durante las primeras 90 horas la córnea puede ser viable para su trasplante.

DISCUSIÓN

La conservación de las células endoteliales en el medio M-K entre las 24 y 96 horas no presentan alteraciones morfológicamente significativas³, al igual a lo encontrado en córneas preservadas tanto en MCB como en Optisol. En este trabajo la viabilidad endotelial e integridad ultraestructural del 80% de las células, se mantuvo en córneas por más de 90 horas. Por microscopía electrónica de transmisión se demostró que, en las córneas con 98 horas y 105 horas de preservación en el MCB, la destrucción endotelial fue del 30%, lo cual es similar a lo reportado por Van Horn y colaboradores (1975) quienes refieren una pérdida de 20% o más de células endoteliales en 17 de 21 córneas almacenadas en M-K.³ El remanente de células viables 80% es capaz de restituir de manera intacta la monocapa de células después de la cirugía.

Ultraestructuralmente, a las 96 horas se encontraron cambios de buena viabilidad en córneas preservadas en MCB, ya que organelos del tipo de las mitocondrias carecían de edema y/o formación de vacuolas. Van Horn y colaboradores refieren una preservación estructural con cambios mínimos en organelos subcelulares aun después de 10 días de almacenamiento en M-K modificado (con sulfato de condroitin). A las 105 horas se observó por ultraestructura que las uniones intercelulares se mantuvieron en algunos puntos por condensación incipiente del citoplasma de las células. Stein y Laibson MD (1987) refieren un promedio mínimo de separación de las células centrales tanto en el medio M-K como en el medio M-K modificado, aun después de 10 días de almacenamiento; sin embargo, la separación de las células periféricas fue común en ambos medios a cualquier periodo de almacenamiento. Con la microscopía electrónica el mosaico de células endoteliales era visible, pero habían áreas de separación celular las cuales indicaban muerte celular.³

La preservación de córneas en solución salina balanceada durante 48 horas provocó importante destrucción celular caracterizada por retracción del citoplasma de las células, separación e incremento en el espacio intercelular, así como células de contorno redondo. Aquavella y colaboradores (1975) refieren que en córneas preservadas en una cámara estándar a 4° C hubo un incremento en la tinción de las células en más del 50%, mientras que en aquéllas preservadas en medio M-K sólo hubo un 20% de aumento en la tinción de las mismas.²

Lo anteriormente descrito se debe a que el medio TC 199 que forma parte del MCB y Optisol contiene glutatión, vitamina E y ácido ascórbico.

Los dos primeros son antioxidantes que apoyan al sistema redox-intracelular del endotelio (sistema que colabora en el mantenimiento de la barrera endotelial) y la oxidación del glutatión intracelular del endotelio rompe las uniones celulares apicales y expone la membrana de Descemet ocasionando edema severo de la córnea. Se ha visto que el almacenamiento de

córneas en M-K por cuatro días preserva la misma cantidad de glutatión endotelial. Se ha reportado que el condroitin sulfato (material contenido en el estroma endotelial y que se agrega en el Optisol) es un antioxidante y el grupo sulfidrilo es importante en el sitio activo de $\text{Na}^+ \text{K}^+$, activando la adenosin-trifosfatasa (ATPasa) requerida para la actividad de la bomba endotelial. Los antioxidantes actúan como radicales libres para eliminar sustancias tóxicas que pueden interferir con la función endotelial.⁴

Kaufman HE y colaboradores⁴ demostraron, por ultraestructura, que la capa de células endoteliales de una córnea donadora producto de una enucleación de 13 días de evolución mantenida en K-Sol, mostraba un mosaico endotelial completamente intacto, de bordes celulares prominentes, regulares, aparentemente normales y núcleos de localización central. Por microscopía electrónica de transmisión se pudo demostrar que las células endoteliales mantuvieron algunas mitocondrias con crestas bien desarrolladas, formación de algunas vacuolas y hendiduras en escasa cantidad que tradujera deterioro de la función endotelial. A diferencia de lo anteriormente citado, los cambios presentes en las células endoteliales conservadas en MCB se hicieron aparentes desde las 96 horas y fueron más acentuadas a las 105 horas, cambios que pueden explicarse debido a que la conservación en este último medio carece de condroitin sulfato.

Por todo lo anteriormente expuesto se puede concluir que el medio MCB puede preservar las córneas utilizadas para trasplante en condiciones óptimas durante 90 horas de manera muy similar al Optisol; pero, a diferencia de este último, el costo es considerablemente menor, por lo que puede ser una gran alternativa para su uso en numerosos hospitales de países como el nuestro, ya que el tipo de población que se atiende generalmente es de bajos recursos.

AGRADECIMIENTOS

A la Srita. Lourdes Rojas por su asesoría en la elaboración y obtención de las microscopías electrónicas por parte del CINVESTAV y al sargento Jesús Paniagua por su trabajo para la elaboración de las mismas por parte del Hospital Central Militar. Al Dr. Eduardo del Rey Pineda, Jefe del Bioterio de la ESM por su apoyo en este trabajo. Finalmente al Dr. José Luis Gómez y a la Dra. Isela Rendón P por su colaboración.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Carey B Ean and Kaufman HE. Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 1974; 13: 164-168.
2. Aquevella JV, Van Horn DL, J Haggetty J. Corneal preservation using M*K medium. *Am J Ophthalmol* 1975; 8: 791-799.
3. Van Horn DL, Shultz P, Bruin JD. Endothelial survival in corneal tissue stored in M-K medium. *Am J Ophthalmol* 1975; 80: 642-647.
4. Kaufman HE, Varnell ED, Kaufman S, Beuerman RW, Barron BA. K sol corneal preservation. *Am J Ophthalmol* 1985; 100: 299-304.
5. Hwang DG, Nakamura T, Trousdale MD. Combination antibiotic supplementation of corneal storage medium. *AMJ Ophthal* 1993; 115 (3): 299-307.
6. Stein RM, Laibson PR. Comparison of chondroitin. Sulphate to Mc Carey-Kaufman medium for corneal storage *AM J Ophthal* 1987; 104: 490-493.
7. Smith M, Popplewel J, Nakarnura T, Trousdale MD. Efficacy and safety of gentamicin and streptomycin in Optisol-gs, a preservation medium for donor corneas. *Cornea* 1995; 14 (1): 49-55.
8. Lass JH, Musch DC, Gordon JF, Laing RA. Epidermal growth factor and insulin use in corneal preservation. Results of a Multicenter trial. The Corneal Preservation Study Group. *Ophthalmology* 1994; 101 (2): 352-359.
9. Erdmann L, Ehlers N. Long-term results with organ cultured, cryo preserved human corneal grafts. Re-examination of 17 patients. *Acta Ophthalmol* 1993; 71 (5): 703-706.
10. Shimaski J, Yamada M, Tsubota K. Corneal transplantation with donor corneas stored in moist chamber and chondroitin sulfate containing medium. *Cornea* 1993; 12 (2): 104-108.
11. Volke Dieben HJ, D'Amaro J, Kok-Van Alphen CC. Elisabeth pels the survival of organ-cultured donor corneas. *Brightbill Frederick Corneal Surgery* 1991; 102-105.
12. Berbard E. Mc Carey DH,D, Storage of donor corneal tissue. 1980 Annual Meeting of American Academy of Ophthalmol 1980; (4).
13. Borderie VM, Kantelip BM, Delbosc BY, Oppermann MT, Laroche L. Morphology, histology, and ultrastructure of human C31 organ-cultured corneas. *Cornea* 1995; 14 (3): 300-310.
14. Baumann G, Fries U, Schnaudigel OE. Viability of corneal endothelium after long-term storage AT* + 4 degrees c in optisol. *Ophthalmologe* 1994; 91 (5): 624-627.
15. Geerards AJ, Kok JH. Extreme temporary thinning after keratoplasty of organ-cultured corneas. *Corn A* 1993; 12 (4): 277-278.
16. Salla S, Redbrake C, Frantz A. Employment of bioluminescence for the quantification of adenosine phosphates in the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 521-526.
17. Busin M, Schmidt J, Koch J. Physiologic analysis of corneal healing after epikeratophakia. *Ophthalmology* 1992; 99: 415-417.
18. Galán-Chapa E, Carrasco R y G, Bailón U, Bécerril MA, Padilla RJ, Campos RR. Valoración experimental del lente corneal tallado para epikeratofaquia. *Rev Soc Mex Oftalmol* 1993; 67: 230-235.
19. Galán-Chapa E, Bécerril MA, Padilla RJ, Campos RR. Estudio histopatológico de epikeratofaquia. Memoria de la IV Reunión Nacional de Histología. México 1992.
20. Galán-Chapa E, Bécerril MA, Padilla RJ, Campos RR. Estudio Histopatológico del injerto de lente corneal procesado para epikeratofaquia en perros. *Acta Médica* 1994; 30 (117-118): 9-15.
21. Redbraque C, Salla S, Franz A. Changes in human donor corneas preserved for longer than 4 weeks. *Cornea* 1998; 17 (1): 62-65.