



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULDADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MÁSTER EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA  
ESPECIALIDAD FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA

Curso académico 2017-2018

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

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

**Silvia Rodríguez Fernández**

**21 de junio de 2018**

## Declaración

El presente Trabajo de Fin de Máster, de título “Criopreservación de córneas; estudio de la viabilidad celular endotelial y de la histomorfología de la córnea” se ha realizado en un marco colaborativo entre el SERGAS (INIBIC) y la UDC.

Ambas directoras, Silvia M<sup>a</sup> Díaz Prado y M<sup>a</sup> Esther Rendal Vázquez, autorizan a la presentación de este TFM por D<sup>a</sup> Silvia Rodríguez Fernández para ser defendido el día 21 de junio de 2018 ante el tribunal calificador correspondiente.

En A Coruña, 14 de junio de 2018,

Firmado



Silvia María Díaz Prado

Firmado



María Esther Rendal Vázquez

# Índice

1. Listado de abreviaturas -----	IV
2. Índice de figuras y tablas -----	VI
3. Resumen -----	VII
4. Introducción -----	1
4.1. La córnea -----	1
4.1.1. El endotelio -----	1
4.2. El trasplante de córnea -----	2
4.3. La donación de córneas -----	3
4.4. La conservación de córneas -----	4
4.4.1. La criopreservación -----	6
4.4.1.1. La base de la criopreservación: el cambio de estado del agua -----	6
4.4.1.2. Los efectos del hielo en las células -----	7
4.4.1.3. Los agentes crioprotectores -----	8
4.4.1.4. Antecedentes de criopreservación en córnea -----	10
5. Objetivos -----	12
6. Material y Métodos -----	13
6.1. Obtención de muestras de tejido corneal -----	13
6.2. Criopreservación -----	13
6.3. Adición de <i>CPAs</i> y congelación -----	13
6.3.1. Criopreservación lenta -----	13
6.3.2. Criopreservación rápida -----	15
6.4. Descongelación y retirada de <i>CPAs</i> -----	16

6.4.1. Criopreservación lenta -----	16
6.4.2. Criopreservación rápida -----	17
6.5. Extracción del endotelio -----	17
6.6. Ensayo de viabilidad celular sobre endotelio-----	18
6.6.1. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre un cultivo de células mesenquimales KP-----	19
6.6.2. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: I.-----	20
6.6.3. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: II. -----	21
6.6.4. Ensayo de viabilidad celular sobre endotelio de los cinco grupos de córneas -----	21
6.6.4.1. Análisis de imágenes-----	22
6.7. Análisis de la estructura histológica -----	22
7. Resultados-----	24
7.1. Ensayo de viabilidad celular sobre endotelio-----	24
7.1.1. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre un cultivo de células mesenquimales KP-----	24
7.1.2. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: I.-----	25
7.1.3. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: II. -----	25
7.1.4. Valoración de la celularidad endotelial y de la viabilidad celular sobre endotelios corneales-----	26
7.2. Análisis histomorfológico-----	32
8. Discusión-----	36
9. Conclusiones-----	43

10. Agradecimientos .....	44
11. Bibliografía .....	45
12. Anexos .....	51
12.1. Informe del Comité de Ética de la Investigación (CEI) .....	51
12.2. Difusión de resultados .....	53

## 1. Listado de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
bomba Na <sup>+</sup> /K <sub>+</sub>	Bomba sodio potasio
Calceína AM	Calceína acetoximetil éster
cél/mm <sup>2</sup>	Células /milímetro cuadrado
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CPA	<i>Cryoprotector Agent</i>
DALK	<i>Deep Anterior Lamellar Keratoplasty</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEK	<i>Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP6	Dimetilsulfóxido-Propilenglicol (6M)
ECD	<i>Endothelial Cell Density</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEBA	<i>European Eye Bank Association</i>
Fiji	<i>Fiji is just ImageJ</i>
FTIC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
g	Gramo
HEPES	<i>Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic</i>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotásico
KCl	Cloruro potásico
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
l	Litro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
MSCGM	<i>Mesenchymal Stem Cell Growth Medium</i>
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>

<i>PK</i>	<i>Penetrating Keratoplasty</i>
PVP	Polivinilpirrolidona
<i>RPMI</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>T<sub>f</sub></i>	<i>Temperature of freezing</i>
<i>T<sub>g</sub></i>	<i>Temperature of glass transition</i>
VS55	Vitrification Solution 55% w/v of CPAs
μg	Microgramo
μl	Microlitro

## 2. Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Esquema de la estructura de la córnea y anatomía de la parte anterior del globo ocular; mecanismo de secreción de iones bicarbonato del endotelio corneal.....	2
<b>Figura 2.</b> Ejemplo de parámetros endoteliales medidos mediante microscopía especular.....	4
<b>Figura 3.</b> Respuesta celular ante la formación de hielo extracelular en ausencia y presencia de CPAs. ....	9
<b>Figura 4.</b> Esquema del ensayo de viabilidad celular sobre un cultivo de células KP.....	20
<b>Figura 5.</b> Imágenes obtenidas tras la tinción de las células en cultivo KP en el ensayo de viabilidad celular sobre células en cultivo KP.. ....	24
<b>Figura 6.</b> Imágenes obtenidas tras la tinción de los endotelios en el ensayo de viabilidad celular sobre endotelio: I. ....	25
<b>Figura 7.</b> Imágenes obtenidas tras la tinción de los endotelios en el ensayo de viabilidad celular sobre endotelio: I. ....	26
<b>Figura 8.</b> Imágenes del endotelio II del Grupo Control.....	28
<b>Figura 9.</b> Imagen del endotelio II del Grupo 2. ....	30
<b>Figura 10.</b> Imágenes de los endotelios de los cinco grupos.....	31
<b>Figura 11.</b> Detalle de los epitelios de las córneas.....	34
<b>Figura 12.</b> Detalle del endotelio de las córneas. ....	35
<b>Tabla I.</b> Diferencias entre dos técnicas de conservación de córneas.....	5
<b>Tabla II.</b> Composición de los medios de adición progresiva de CPAs de los Protocolos 1 y 2.....	15
<b>Tabla III.</b> Composición de los medios de adición de CPAs de los Protocolos 3 y 4.....	16
<b>Tabla IV.</b> Resultados del ensayo de viabilidad celular.....	27

### 3. Resumen

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la eficacia de cuatro protocolos de criopreservación diferentes atendiendo a la viabilidad celular endotelial y a la estructura de las córneas tras su descongelación.

Un total de n=3 córneas fueron criopreservadas con cada uno de los protocolos siguientes: criopreservación lenta con albúmina (Grupo 1), criopreservación lenta sin albúmina (Grupo 2), criopreservación rápida mediante vitrificación con VS55 (Grupo 3) y criopreservación rápida mediante vitrificación con DP6 (Grupo 4). Tras la descongelación, se realizó sobre dos córneas de cada grupo un ensayo de viabilidad para evaluar la celularidad y la viabilidad de las células endoteliales. Paralelamente, se realizó la tinción de tricrómico de Masson en una córnea descongelada de cada grupo para analizar la estructura histomorfológica.

Las córneas del Grupo 4 mostraron, cualitativamente, más celularidad que las córneas del Grupo 3, seguidas de las córneas del Grupo 1 y Grupo 2. Respecto a la viabilidad, el Grupo 1 mostró un 66,79% de células viables, el Grupo 2 presentó muy pocas células viables, y los grupos 3 y 4, ninguna. Los daños de la criopreservación se observaron en los desprendimientos del endotelio en los Grupos 2, 3 y 4, en las oquedades amplias del estroma en los Grupos 1, 3 y 4, y en el estrechamiento y pérdida de células y de volumen celular en el epitelio de todos los grupos.

La criopreservación con cualquiera de los cuatro protocolos utilizados aportan celularidades endoteliales altas tras la descongelación, mostrando la mayor celularidad la criopreservación rápida. Sin embargo, la viabilidad celular endotelial se ve más afectada en la criopreservación rápida que en la criopreservación lenta, que sí retiene cierta viabilidad celular. El endotelio, el epitelio y el estroma de la córnea son capas sensibles a los daños de la criopreservación, en especial durante la criopreservación rápida.

## Resumo

O obxectivo deste traballo foi a avaliación da eficacia de catro protocolos de criopreservación diferentes, atendendo á viabilidade celular endotelial e á estrutura das córneas tras a súa desconxelación.

Un total de  $n=3$  córneas foron criopreservadas con cada un dos protocolos seguintes: criopreservación lenta con albumina (Grupo 1), criopreservación lenta sen albumina (Grupo 2), criopreservación rápida mediante vitrificación con VS55 (Grupo 3) e criopreservación rápida mediante vitrificación con DP6 (Grupo 4). Tras a desconxelación, realizouse sobre dúas córneas de cada grupo un ensaio de viabilidade para avaliar a celularidade e a viabilidade das células endoteliais. Paralelamente, realizouse a tinguidura de tricrómico de Masson nunha córnea desconxelada de cada grupo para analizar a estrutura histomorfolóxica.

As córneas do Grupo 4 mostraron, cualitativamente, máis celularidade que as córneas do Grupo 3, seguidas das córneas do Grupo 1 e Grupo 2. Respecto á viabilidade, o Grupo 1 mostrou un 66,79% de células viables, o Grupo 2 presentou moi poucas células viables, e os grupos 3 e 4, ningunha. Os danos da criopreservación observáronse nos desprendementos do endotelio nos Grupos 2, 3 y 4, nos ocos amplos do estroma nos Grupos 1, 3 y 4, e no estreitamento e perda de células e de volume celular do epitelio de todos os grupos.

A criopreservación con calquera dos catro protocolos utilizados aportan celularidades endoteliais altas tras a desconxelación, mostrando a maior celularidade a criopreservación rápida. Sen embargo, a viabilidade celular endotelial vese máis afectada na criopreservación rápida que na criopreservación lenta, que si retén certa viabilidade celular. O endotelio, o epitelio e o estroma da córnea son capas sensibles aos danos da criopreservación, en especial durante a criopreservación rápida.

## **Abstract**

The aim of this study was the evaluation of four protocols of cryopreservation, attending to the cell endothelial viability and to the cornea structure after thawing.

A total of n=3 corneas were cryopreserved using the following: slow cryopreservation with albumin (Group 1), slow cryopreservation without albumin (Group 2), fast cryopreservation with vitrification using VS55 solution (Group 3), fast cryopreservation with vitrification using DP6 solution media (Group 4). After thawing, a viability assay was performed over two corneas to evaluate the cellularity and viability of endothelial cells. A Masson staining was performed in one thawed cornea of each group.

Corneas in Group 4 showed the huge cellularity, followed by corneas of Group 3, Group 1 and Group 2. Corneas of Group 1 showed 66,79% of viable cells, while in Group 2 there were very few viable cells, and no viable cells in Groups 3 and 4. Cryoinjuries were observed in endothelium detachment in Groups 2, 3 and 4 and in the holes among collagen fibres of stroma in Groups 1, 3 and 4. Also, the thinner epithelial layer and its cell losing in all the groups are cryoinjuries.

Cryopreservation with any of the four protocols allow a high endothelial cellularity after thawing. Fast cryopreservation offers the best result in cellularity. Despite of all, endothelial cell viability is affected with fast cryopreservation. Slow cryopreservation retains some cell viability. Endothelium, epithelium and stroma are three sensitive layers of cornea that suffer cryoinjuries, in special, when the fast cryopreservation is carries out.

## **4. Introducción**

### **4.1. La córnea**

La córnea humana es un tejido fino de unos 0,5 mm de grosor y 1,2 cm de diámetro (1), situada en la parte anterior del globo ocular y rodeada por la esclera. Las funciones de este tejido son la protección del globo ocular frente a agentes externos y la participación en la visión (1,2). Su papel dentro de la visión es permitir el paso de la luz, refractándola en el interior del ojo gracias a dos de sus características intrínsecas: la forma y la transparencia. El poder refractivo de la córnea es de dos tercios del total (1,3,4).

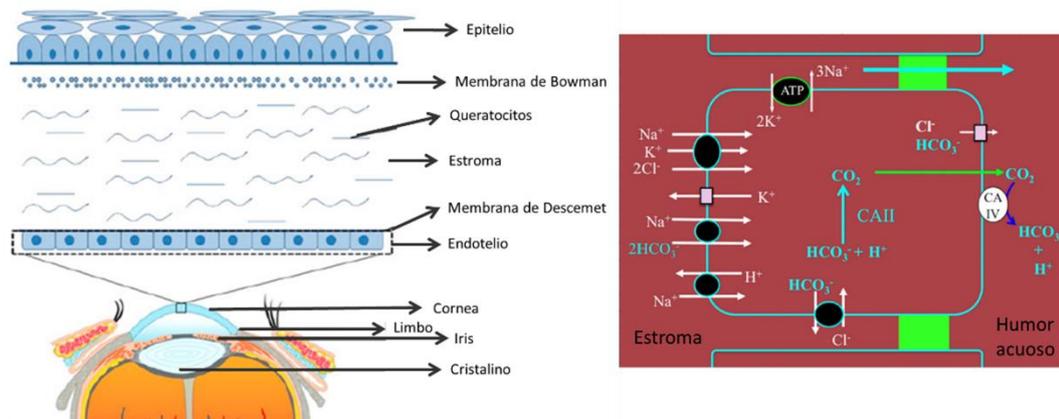
La córnea se compone de cinco capas (1–4) (Figura 1). En contacto con el exterior se encuentra el epitelio de tipo escamoso no queratinizado, con 5-7 capas de células que descansan sobre una membrana basal (3). Le sigue la membrana de Bowman, formada principalmente por colágeno I y V y por proteoglicanos (4). La capa central y más ancha de la córnea es el estroma. Está constituida por unas células llamadas queratocitos, por colágeno I, que se dispone en haces de forma ordenada, y por proteoglicanos (2). Éstos son los responsables de que el estroma presente hasta un 78% de contenido en agua (4). Gracias a esta estructura, esta capa soporta las fuerzas de tensión provocadas por la presión en el interior del ojo (1). La cuarta capa es la membrana de Descemet. Esta membrana está compuesta por diferentes tipos de colágenos y lamininas, y es realmente la membrana basal de la última capa de la córnea: el endotelio (4).

#### **4.1.1. El endotelio**

La capa más interna de la córnea es el endotelio. Esta monocapa de células hexagonales actúa como filtro de nutrientes y otras moléculas entre el resto de capas de la córnea y el humor acuoso, ya que la córnea es avascular (1,4,5). De estas células también depende la transparencia, la hidratación y el grosor de la córnea (1,2,4,6,7), características que están relacionadas entre sí (6). Las células endoteliales contrarrestan la entrada pasiva de

agua y de solutos desde el humor acuoso con un sistema de transporte activo de iones bicarbonato y mediante bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Figura 1) (7–9). En esta función también juegan un papel importante las anhidrasas carbónicas, que convierten el  $\text{CO}_2$  en iones bicarbonato (8).

La capacidad de regeneración del endotelio es limitada (1,10), ya que las células endoteliales están arrestadas en fase G1 del ciclo celular (10). Con la edad, la densidad de células del endotelio disminuye (1).



**Figura 1.** Esquema de la estructura de la córnea y anatomía de la parte anterior del globo ocular (izquierda); mecanismo de secreción de iones bicarbonato del endotelio corneal (derecha). CA: Carbonic Anhydrase. Imágenes tomadas con modificaciones de (5) (izquierda) y (8) (derecha).

## 4.2. El trasplante de córnea

La córnea o alguna de sus capas puede verse afectada por algún tipo de enfermedad, bien por una causa primaria como una distrofia corneal o un queratocono (aumento anormal de la curvatura de la córnea), bien por causas secundarias como las que aparecen tras una operación de cataratas. En numerosas ocasiones, estas enfermedades llevan a una pérdida de visión y el único tratamiento disponible hasta ahora es el trasplante de córnea (1).

El trasplante de córnea, llamado queratoplastia, es el tipo de trasplante más realizado en el mundo y de mayor éxito (11). Existen varios tipos de trasplantes, que, de forma general, se dividen entre queratoplastias penetrantes (PK, *Penetrating Keratoplasty*), en las que se utiliza toda la córnea, y queratoplastias lamelares, donde se usan una o varias capas de

la córnea. Respecto a estas últimas, las más comunes son la *DMEK* (*Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty*) en la que se trasplanta la membrana de Descemet y el endotelio, y la *DALK* (*Deep Anterior Lamellar Keratoplasty*), que es un trasplante profundo del epitelio y de la mayor parte del estroma (12,13).

### **4.3. La donación de córneas**

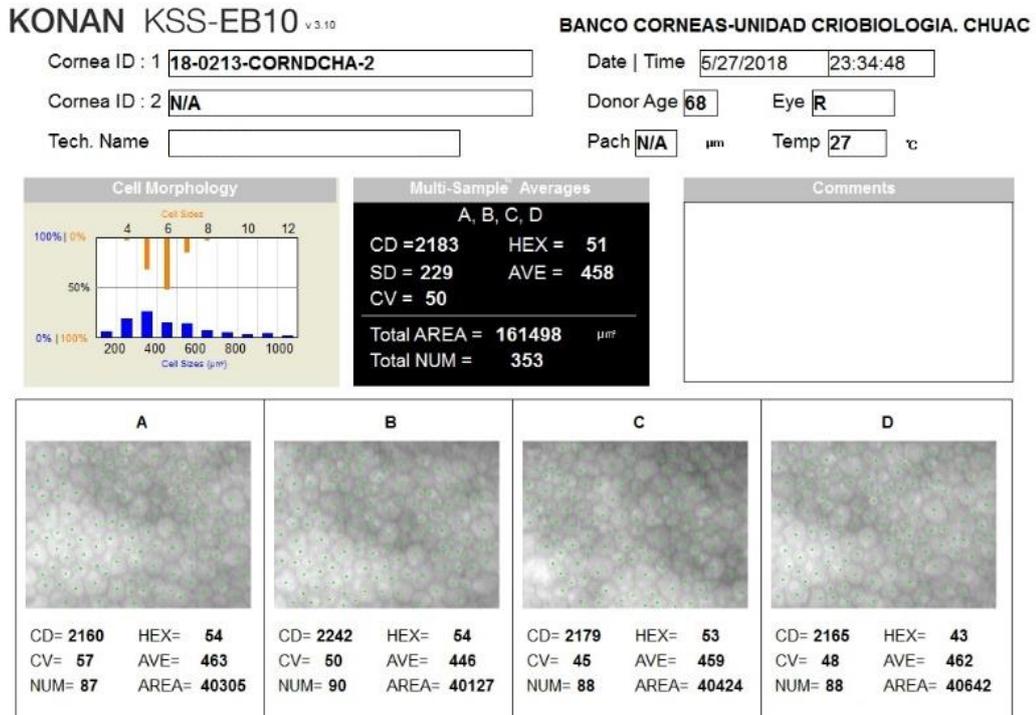
Las córneas utilizadas para trasplantes son donadas por fallecidos, los cuales han debido de cumplir unos criterios de inclusión relevantes a su historia clínica y social. Entre los criterios referentes a la historia clínica del paciente se contemplan la causa de la muerte, antecedentes de cirugías oculares, ciertos tumores con riesgo a metástasis en tejidos oculares, algunos tipos de infecciones, tatuajes...(13,14). En este aspecto, la córnea es un tejido muy permisivo a la hora de ser donado, gracias a su avascularidad (13).

De cumplir esos criterios de inclusión, las córneas son extraídas en menos de 24 horas después de la muerte del donante, previo consentimiento informado de la familia (13–15).

Las córneas deben guardar una serie de características óptimas que son comprobadas mediante un análisis microbiológico y un análisis de la morfología e integridad de las capas de la córnea, del diámetro central de la zona clara de la córnea y de las características del endotelio (13).

Las características de la córnea más críticas a la hora de que un trasplante sea exitoso son las que implican al endotelio (1,11). El endotelio de la córnea donada debe ser totalmente funcional y para ello requiere que la densidad celular endotelial (*ECD*, *Endothelial Cell Density*) sea superior a 2.000 células/mm<sup>2</sup> (límite dispuesto por la *EEBA*, *European Eye Bank Association*) (1,13,16). Otros dos parámetros que son indicativos de la calidad del endotelio son el polimorfismo (la forma de las células debe ser

hexagonal) y el polimegatismo (deben tener un tamaño homogéneo) (13,16,17) (Figura 2).



**Figura 2.** Ejemplo de parámetros endoteliales medidos mediante microscopía especular. Se miden los parámetros endoteliales en 4 regiones diferentes del endotelio de la córnea (A, B, C y D). CD: Cell Density, SD: Standard Deviation (de la densidad celular); CV; Coefficient of Variation (coeficiente de variación del tamaño de las células), HEX: hexagonality (porcentaje de células hexagonales).

Tras descartar también otras anomalías corneales como la *guttas* (protuberancias en forma de pequeñas gotas de la membrana de Descemet), irregularidades epiteliales, opacidades estromales... detectadas mediante la lámpara de hendidura, la córnea se almacena en un banco de tejidos (13).

#### 4.4. La conservación de córneas

En los bancos de tejidos se utilizan principalmente dos técnicas de conservación de córneas: en hipotermia a 4°C y en cultivo a 28-37°C (1,13,14,16,17). Existen varias diferencias entre estos dos tipos de conservación (Tabla I), aunque ambos métodos son igual de efectivos y mantienen las córneas en buen estado para las queratoplastias (1).

El límite del almacenamiento de las córneas lo marca la funcionalidad y la integridad del endotelio: aumenta el daño conforme pasan los días (1,13).

Esto hace que, transcurrido el tiempo óptimo de almacenamiento que le corresponde a cada técnica de conservación, se descarten.

Si el conteo de células endoteliales de una córnea es menor de 2.000 cél/mm<sup>2</sup> (entre 1.500 y 2.000 cél/mm<sup>2</sup>) y cumple el resto de criterios de inclusión, en algunos bancos de tejidos se suele criopreservar. Las córneas criopreservadas se utilizan para realizar trasplantes tectónicos a modo de “parche”, con la finalidad de salvar el ojo en una urgencia mientras el paciente espera por una córnea para serle trasplantada (16). Estas córneas no requieren que sus células estén vivas y sean funcionales (13,18).

**Tabla I.** Diferencias entre dos técnicas de conservación de córneas (1,13,14,19).

	<b>Conservación en frío</b>	<b>Conservación en cultivo</b>
<b>Temperatura</b>	2 – 8°C	28 – 37°C
<b>Tiempo de conservación óptimo</b>	7 – 8 días	21 – 28 días
<b>Control microbiológico</b>	Menos riguroso	Más riguroso
<b>Evaluación ECD</b>	Microscopía especular	Microscopía óptica de campo claro o de contraste de fases
<b>Manipulación</b>	Menor	Mayor
<b>Equipo e infraestructuras</b>	Menos costoso	Más costoso

No obstante, aunque hoy en día las córneas criopreservadas se utilicen en clínica de este modo, desde hace décadas se buscan protocolos de criopreservación que permitan que las córneas sean funcionales, y aptas para realizar una queratoplastia.

El motivo principal por el que comenzó esta búsqueda fue (6,20), y sigue siendo, la baja disponibilidad de este tejido para trasplantes. A pesar del aumento en las donaciones (11), actualmente sigue existiendo un desequilibrio entre el número de donantes de córneas y el de personas que necesitan una queratoplastia (20).

La criopreservación se ha postulado como la técnica que permitiría una conservación de las córneas durante un largo período de tiempo y que evitaría la “caducidad” a la que se ven sometidas con las técnicas de conservación convencionales (1,6,20–22).

#### **4.4.1. La criopreservación**

La criopreservación es un proceso que consiste en mantener, durante un largo período de tiempo, células, tejidos o cualquier material biológico a temperaturas por debajo de  $-80^{\circ}\text{C}$ , llegando a alcanzar los  $-140^{\circ}\text{C}$  en la mayoría de los casos (23). El objetivo de este proceso es detener cualquier actividad biológica, incluyendo todas las reacciones físicas y químicas, a bajas temperaturas (24).

##### **4.4.1.1. La base de la criopreservación: el cambio de estado del agua**

En una solución acuosa, las moléculas de agua están en movimiento (muestran alta energía cinética), y forman entre ellas estructuras dinámicas que se reorganizan constantemente. Cuando la temperatura cae por debajo del punto de congelación ( $T_f$ , *Temperature of freezing*) del agua, se produce la **crystalización**, es decir, la formación de cristales de hielo (21,24–26). Esto provoca que el agua pase a un nuevo estado de equilibrio en el que las moléculas están ordenadas formando estructuras hexagonales estáticas (con baja energía cinética): los cristales de hielo. A estos cristales se les unen más moléculas de agua hasta formar un sólido cristalino (26).

En la naturaleza el agua contiene solutos. Los cristales de hielo que crecen en un proceso de congelación excluyen de su estructura a los solutos, quedando éstos relegados a la parte de agua que todavía es líquida. En estas zonas, el punto de congelación del agua baja, ya que la concentración de solutos ha aumentado y los cristales de hielo tardarían más tiempo en formarse, pues estas sustancias bloquean el movimiento de las moléculas de agua (17–19,21). La cristalización pararía cuando se llegase a un equilibrio termodinámico entre el estado sólido y líquido del agua (23).

Si una solución tiene una alta concentración de solutos y la temperatura baja muy rápido, sobrepasando el punto de congelación, las moléculas de agua no pueden formar cristales de hielo porque su energía cinética ha bajado muy rápido y no pueden moverse para unirse unas a otras. En este punto se alcanza la temperatura de transición vítrea, ( $T_g$ , *Temperature of glass transition*), donde las moléculas de agua forman un sólido amorfo no cristalino en el que permanecen “desordenadas” como si estuviesen en fase líquida. A este proceso descrito se le llama **vitrificación** (21,25).

La cristalización y la vitrificación pueden darse en una solución durante un mismo proceso de congelación. Como se comentó anteriormente, si se produce la cristalización en una dilución, se creará una fracción de agua líquida con una concentración de solutos alta. Si la temperatura sigue bajando, como las moléculas de agua se ven limitadas en movimiento, y no son capaces de acercarse unas a otras para seguir formando cristales, se puede producir en esas zonas la vitrificación (25).

#### **4.4.1.2. Los efectos del hielo en las células**

En las células, los cristales de hielo pueden provocar la muerte celular directa o indirectamente de diferentes formas (1,21,23,24,26,27).

Si la temperatura de congelación baja de forma muy lenta y alcanza la  $T_f$ , la formación de hielo empezará antes en el medio extracelular. El incremento externo de la concentración de solutos (de cristales de hielo) provoca un desequilibrio osmótico ante el que las células reaccionan mediante la deshidratación (24,27). Este desequilibrio puede afectar al pH de las células, a las proteínas, que pueden desnaturalizarse, y también a las membranas lipídicas. Además, las células también se deforman a causa del hielo extracelular.

Si la temperatura baja demasiado rápido, la formación de cristales de hielo ocurre tanto en el exterior como en el interior de las células, ya que no se les da tiempo suficiente a regularse osmóticamente. El hielo interno puede dañar directamente estructuras celulares internas, como orgánulos, y la

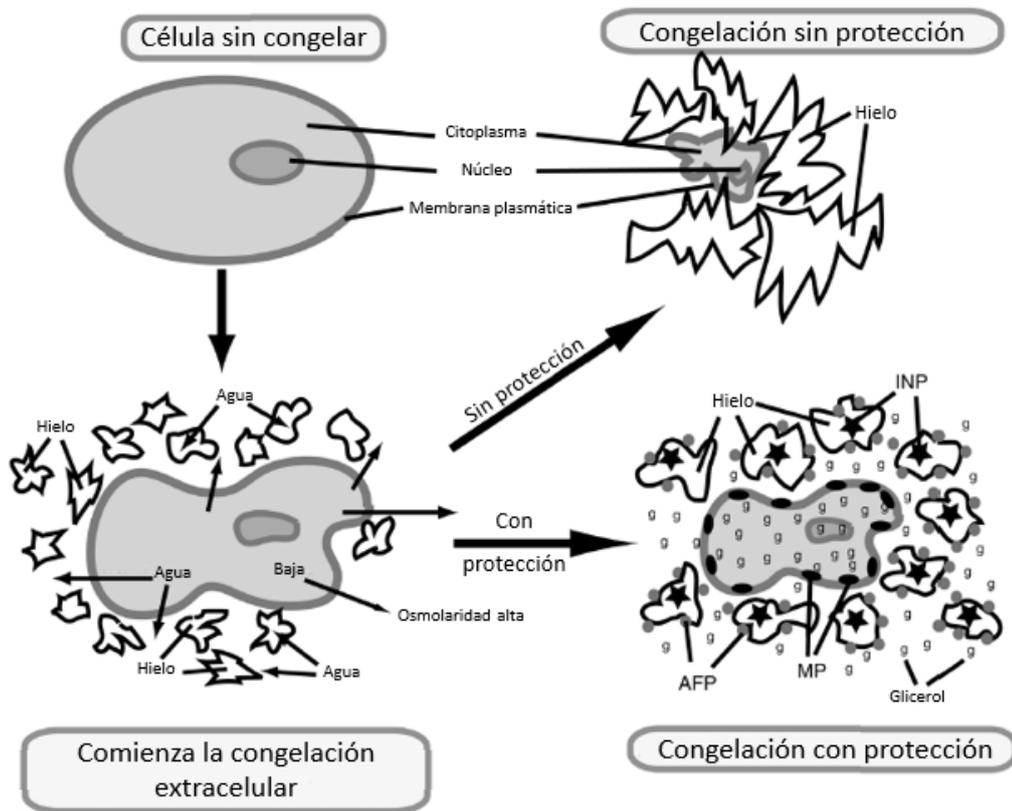
membrana celular (24), siendo incluso más peligroso que el hielo externo (27).

Del mismo modo que el proceso de congelación puede afectar a la formación de cristales de hielo y a la regulación osmótica de las células, la descongelación puede dañar a las células de la misma forma (24). En un proceso de descongelación de un sólido vítreo se pueden formar cristales de hielo (recristalización) y crecer, proceso que se llama desvitrificación, al igual que puede ocurrir en una descongelación lenta de un sólido cristalino en la que se produce recristalización (21,25).

#### **4.4.1.3. Los agentes crioprotectores**

En la naturaleza existen diferentes organismos que han desarrollado adaptaciones para sobrevivir a bajas temperaturas: peces, anfibios, réptiles, insectos, plantas, bacterias... El fundamento de la criopreservación y de algunas de las adaptaciones que utilizan son similares (Figura 3). Algunos de ellos utilizan, por ejemplo, la vitrificación en presencia de unas sustancias que ellos mismos producen llamadas agentes crioprotectores (*CPAs*, *Cryoprotectant Agents*). Los *CPAs* regulan el cambio de estado del agua y/o protegen diferentes partes de las células durante la congelación y descongelación (28–30). Así, los crustáceos del género *Artemia* permiten la vitrificación de los quistes que contienen el embrión gracias a su bajo contenido en agua, a la alta concentración de trehalosa en el interior de las células y a la presencia de proteínas de choque térmico que protegen a los componentes celulares (28,31).

Para criopreservar células o tejidos se utilizan soluciones que contienen *CPAs* en altas concentraciones, en las que se embebe el material biológico.



**Figura 3.** Respuesta celular ante la formación de hielo extracelular en ausencia y presencia de CPAs. Una célula sin CPAs será dañada por la rápida formación de cristales extracelulares y se deshidratará. Si los CPAs están presentes, sufrirá una leve deshidratación, y la formación de hielo extracelular estará controlada. El glicerol reduce la pérdida de volumen de la célula, regulando su deshidratación; las proteínas anticongelantes se unen a los cristales de hielo para evitar que éstos crezcan más; las proteínas nucleantes de hielo controlan el crecimiento de los cristales de hielo sobre ellos. AFP: Antifreezing Protein, MP: Membrane Protectants, INP: Ice-Nucleating Protein. Imagen tomada y modificada de (28).

En el campo de la Criobiología, se diferencia entre dos tipos de criopreservación a los que, en este trabajo, pondremos los nombres de “**criopreservación lenta**” y “**criopreservación rápida**”. En la primera, durante la congelación se pueden formar cristales de hielo, ya que la temperatura baja despacio, y se usan concentraciones altas de CPAs para controlar la formación de hielo. En la segunda, la temperatura baja tan rápido que se produce el proceso de vitrificación. Se realiza en presencia de una concentración todavía más alta de CPAs para evitar la formación de hielo (23,24,26).

Los CPAs se clasifican como agentes penetrantes o no penetrantes, dependiendo de si atraviesan la membrana celular o se quedan en el medio extracelular. El primer crioprotector descubierto fue el glicerol, un agente

penetrante, al que le siguió el dimetilsulfóxido (DMSO) (24,26,32). El DMSO se une a las cabezas de los fosfolípidos dándole estabilidad a la membrana lipídica a bajas temperaturas (26). Otras sustancias son la formamida, polímeros, mezclas complejas como las proteínas séricas, la albúmina, alcoholes, como el mencionado glicerol o el 1,2-propilenglicol, o los glúcidos como la dextrosa (D-glucosa) (21,24,26,32,33). De muchos de ellos, se desconoce cómo protegen a las células (26).

Sin embargo, aunque los *CPAs* pueden ejercer un efecto protector en el proceso de congelación y descongelación, algunos de ellos son tóxicos a las altas concentraciones empleadas para la criopreservación. La toxicidad de los *CPAs* es dependiente de la concentración, de la temperatura y del tipo celular (24,26,32,33).

Los *CPAs* penetrantes son los más tóxicos para las células. Estas sustancias crioprotectoras interaccionan con algunos componentes celulares, afectando a procesos como el transporte o al correcto funcionamiento de diversas rutas metabólicas (26,32,33).

#### **4.4.1.4. Antecedentes de criopreservación en córnea**

La criopreservación de las células en suspensión ha sido y es exitosa. Un ejemplo claro lo da la criopreservación de embriones para técnicas de fertilización *in vitro* (21,23,24,26,34). La criopreservación rápida de embriones se realiza de manera rutinaria en los bancos de tejidos, llegando a conseguir en el mejor de los casos un 98% de viabilidad de los embriones tras descongelar (34).

La transición de la criopreservación de células a la criopreservación de tejidos no ha resultado tan sencilla como se esperaba (21). Los tejidos son estructuras complejas formadas por varios tipos celulares. Estas células tienen diferentes umbrales a la toxicidad de los *CPAs*, y estarán más o menos expuestos a ellos dependiendo de su localización. También son más sensibles al hielo extracelular, ya que éste puede rasgar el tejido y con ello alterar la estructura óptima y funcional del tejido. Por este motivo, la

criopreservación rápida se ha postulado como la mejor técnica para conservar tejidos que requieran tener una viabilidad alta, como la córnea, el cartílago o los vasos sanguíneos. De esta modo, la formación de hielo se evitaría (7,21–24,26). Sin embargo, esto hace que se agrave el problema de la toxicidad de los CPAs (21–23,28,33).

Respecto a la córnea, en la década de los 60 comenzaron las primeras criopreservaciones de córnea entera utilizando glicerol, DMSO, 1-2, propilenglicol, formamida, povidona (PVP, polivinilpirrolidona)... Las córneas utilizadas han sido principalmente de conejos (6,9,35–38), cerdos (39), humanos (6,24,40) y otros primates (6). Los resultados han sido poco satisfactorios y a veces, contradictorios. No obstante, han servido para ser progresivamente conscientes de los efectos negativos de la criopreservación en la córnea (6,18,21,23) y de que, cuando se prueba una técnica de preservación en córnea, el mínimo requerimiento es que el endotelio sea viable y funcional por ser la capa más delicada (1,6,21,36,39).

## **5. Objetivos**

### **Objetivo general:**

Evaluar la eficacia de cuatro protocolos de criopreservación diferentes atendiendo a la viabilidad celular y a la estructura de las córneas tras descongelar.

### **Objetivos específicos:**

- Valoración de la celularidad endotelial de las córneas criopreservadas tras la descongelación.
- Evaluación de la viabilidad celular de los endotelios las córneas criopreservadas tras la descongelación.
- Evaluación de la estructura histológica de las córneas criopreservadas tras la descongelación.

## 6. Material y Métodos

### 6.1. Obtención de muestras de tejido corneal

Un total de 19 córneas procedentes de 14 donantes de  $65 \pm 6$  años de media y almacenadas en medio Eusol-C (AlchimiA, Italia) en hipotermia ( $4^{\circ}\text{C}$ ), han sido proporcionadas por el Banco de Tejidos del CHUAC (Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña). La densidad celular endotelial es de  $2.160 \pm 423$  cél/ $\text{mm}^2$ , sin tener en cuenta las 5 córneas de las que no hay registro de este parámetro. Se han formado 5 grupos de  $n=3$  córneas: Grupo Control (de córneas en hipotermia) y Grupos 1, 2, 3 y 4 (córneas que posteriormente han sido criopreservadas). Se han dejado 4 córneas para la optimización del ensayo de viabilidad celular, 2 conservadas en hipotermia a  $4^{\circ}\text{C}$  como máximo durante 7 días, y 2 criopreservadas de forma lenta con albúmina antes de 7 días. El grupo de córneas conservadas a  $4^{\circ}\text{C}$  se ha mantenido a esa temperatura hasta la realización del ensayo de viabilidad celular y de la evaluación histológica, antes de 7 días. Los grupos de córneas criopreservadas se han congelado antes de 7 días o al 7<sup>o</sup> día, y en los casos de las córneas descartadas por falta de receptor, se han congelado al 7<sup>o</sup> u 8<sup>o</sup> día.

### 6.2. Criopreservación

El proceso de criopreservación incluye primero la adición de CPAs y congelación, y después la descongelación y retirada de los CPAs de las córneas. **Los Protocolos 1, 2, 3 y 4 se corresponden, respectivamente, a los utilizados para los Grupos 1, 2, 3 y 4 de córneas.** A continuación, los cuatro protocolos son descritos separándolos por tipos de criopreservación: criopreservación lenta y criopreservación rápida.

### 6.3. Adición de CPAs y congelación

#### 6.3.1. Criopreservación lenta

Para la criopreservación lenta se han utilizado dos protocolos proporcionados por la Dr. E. Rendal, bióloga del Banco de Tejidos del

CHUAC, que se utilizan de manera rutinaria. El Protocolo 1 (con albúmina) es usado para la criopreservación de córneas de uso tectónico (Procesado de córnea criopreservada; Ref.: UCBBT-PE-PSS-CCP-00-17). El Protocolo 2 (sin albúmina) es el utilizado para la criopreservación de válvulas cardíacas (Protocolo de Tejidos Vasculares Ref.: UCBBT-PE-PSS-PTVS-00-10). En este último se sustituye el medio *RPMI* (*Roswell Park Memorial Institute*) por medio 199. Los protocolos son los siguientes.

### **Protocolo 1 y 2**

Se han preparado tres disoluciones de medio 199 1X (Gibco, España) con albúmina humana al 20% (Grifols, España) y cantidades crecientes de DMSO (Sigma, España) (Tabla II, Protocolo 1), y tres disoluciones de medio 199 1X con cantidades crecientes de DMSO (Tabla II, Protocolo 2). Se han manteniendo todos los componentes y las disoluciones finales a 4°C. Una a una, las córneas a 4°C se han transferido cuidadosamente a dos placas de seis pocillos enfriadas en la que se habían vertido las seis diluciones en los pocillos correspondientes de sendas placas. Cada córnea se ha dejado 3 minutos en cada una de las disoluciones, pasándola cuidadosamente de la disolución correspondiente de menor concentración de crioprotectores a la de mayor. Transcurridos los tres últimos minutos en la dilución 3.P1 y 3.P2, cada córnea ha sido introducida en un criovial enfriado y se ha añadido 5 ml de la dilución 3.P1 a las córneas del Grupo 1 y 5 ml de 3.P2 a las córneas del Grupo 2. Los crioviales se han dejado en agitación a 4°C durante 10 minutos, y posteriormente se han transferido al congelador biológico CM-2000 (Carbueros Medica, España), al que se le había programado la rampa de congelación utilizada de manera rutinaria en el Banco de Tejidos del CHUAC para la criopreservación de córneas. Esta rampa se divide en varios segmentos: la cámara de congelación y la muestra se mantienen a 4°C durante 15 minutos, al que le sigue una bajada de la temperatura de 1°C/minutos hasta los 40°C, y de 5°C/minutos hasta los -120°C. Terminado el ciclo de congelación, los crioviales han sido introducidos en un tanque de nitrógeno en la fase gas.

**Tabla II.** Composición de los medios de adición progresiva de CPAs de los Protocolos 1 y 2. Cantidades de CPAs para un volumen final de 30 ml.

	Protocolo 1 (con albúmina)			Protocolo 2 (sin albúmina)		
	1.P1	2.P1	3.P1	1.P2	2.P2	3.P2
<b>Medio 199 (ml)</b>	21,9	21,3	20,4	29,4	28,8	27,9
<b>DMSO (ml)</b>	0,6	1,2	2,1	0,6	1,2	2,1
<b>Albúmina (ml)</b>	7,5	7,5	7,5			

### 6.3.2. Criopreservación rápida

Se ha preparado la solución Euro-Collins 5X siguiendo el protocolo de BrockBank y col (41). Brevemente, se han diluido 18,25 mg de  $K_2HPO_4$  (Merck, España), 5,1 mg de  $KH_2PO_4$  (Merck), 2,8 mg de KCl (Merck), 2,1 mg de  $NaHCO_3$  (Panreac Quimica, S.A.U., España) y 87,38 mg de dextrosa (Panreac Quimica) en 500 ml de agua destilada, dejándolo en agitación 24 horas y se ha almacenado a 4°C.

A continuación, se detallan los dos protocolos utilizados para la criopreservación rápida, siguiendo las pautas de Crespo A (42).

#### Protocolo 3 y 4

Para el Grupo 3 y 4 se han preparado los medios de criopreservación para la adición de CPAs correspondientes (*VS55* y *DP6*), en las concentraciones que figuran en la Tabla III. Tras la preparación, se ha dejado 24 horas en agitación y se han almacenado a 4°C. Cada córnea a 4°C se han transferido cuidadosamente a un criovial enfriado y se les ha añadido gota a gota 4 ml de medio *VS55* o *DP6* a 4°C, según correspondiese, cubriendo el medio posteriormente con 1 ml de isopentano frío. Los crioviales han sido transferidos a la fase líquida del isopentano de un vaso de precipitados que se ha introducido en nitrógeno líquido. De esta forma, el isopentano forma dos fases: una sólida que es la que ha quedado a la altura del nitrógeno líquido, y una líquida que ha quedado por encima del nitrógeno líquido. Se han dejado los crioviales suspendidos en la fase líquida del isopentano

durante 10 minutos tras los que se han transferido rápidamente a la fase gas de un tanque de nitrógeno.

**Tabla III.** Composición de los medios de adición de CPAs de los Protocolos 3 y 4. Cantidades de CPAs para un volumen final de 1l. HEPES: Hydroxyethyl piperazineethanesulfonic.

	<b>Protocolo 3 (VS55)</b>	<b>Protocolo 4 (DP6)</b>
<b>HEPES (g)</b>	2,4	2,4
<b>1,2-Propanodiol (ml)</b>	162,53	220,37
<b>DMSO (ml)</b>	220,13	213,09
<b>Euro-Collins 5X (ml)</b>	200	Hasta 1 l
<b>Formamida (ml)</b>	123,07	
<b>Agua destilada (ml)</b>	Hasta 1 l	

## **6.4. Descongelación y retirada de CPAs**

### **6.4.1. Criopreservación lenta**

Para la descongelación y retirada de CPAs de las córneas criopreservadas de forma lenta se han seguido los protocolos utilizados de rutina en el Banco de Tejidos del CHUAC para descongelar córneas criopreservadas (Procesado de córnea criopreservada; Ref.: UCBET-PE-PSS-CCP-00-17) y válvulas cardíacas (Protocolo de Tejidos Vasculares; Ref.: UCBBT-PE-PSS-PTVS-00-10).

#### **Protocolo 1**

Se han retirado los crioviales del tanque de nitrógeno y se han dejado a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente, se han introducido en un baño a 37°C durante 2 minutos, en movimiento, hasta que se ha deshecho el hielo. A continuación, se han traspasado las córneas cuidadosamente a un primer pocillo de una placa de 6 pocillos fría con albúmina humana al 20% a 4°C y se ha dejado 5 minutos. Pasado el tiempo, se ha transferido a un segundo pocillo con albúmina fría dejándolo el mismo tiempo, y se ha realizado un tercer lavado de la misma forma, dejándolo en albúmina hasta la extracción del endotelio o hasta la inclusión en parafina.

## **Protocolo 2**

Se han retirado los crioviales del tanque de nitrógeno y se han dejado a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente, se han introducido en un baño a 37°C hasta que se ha descongelado el hielo. A continuación, se han traspasado las córneas y su medio cuidadosamente a un pocillo de una placa de 6 fría. Se han retirado 2 ml del medio de congelación, y se ha añadido el mismo volumen de suero salino frío. A partir de ese momento, se han hecho diluciones progresivas para retirar los crioprotectores de la córnea, terminando con la córnea en únicamente suero salino a 4°C.

### **6.4.2. Criopreservación rápida**

Para la descongelación de las córneas criopreservadas de forma rápida se ha utilizado el protocolo de descongelación y retirada de CPAs utilizado por Crespo A (42).

## **Protocolo 3 y 4**

Se han retirado los crioviales del tanque de nitrógeno y se han dejado a temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente, se han introducido en un baño a 37°C hasta que se han descongelado. A continuación, se han traspasado las córneas y su medio cuidadosamente a un pocillo de una placa de 6 pocillos fría. Se han retirado 2 ml del medio de congelación, y se ha añadido el mismo volumen de Euro-Collins 5X frío. A partir de ese momento, se han hecho diluciones progresivas (V/V) con Euro-Collins 5 X para retirar los crioprotectores de la córnea, terminando con la córnea en Euro-Collins 5X a 4°C.

### **6.5. Extracción del endotelio**

La extracción del endotelio (y de la membrana de Descemet) de las córneas almacenadas a 4°C y de las criopreservadas ha sido realizada de forma manual por el oftalmólogo Marcelino Álvarez Portela. Se ha empleado para ello la técnica quirúrgica utilizada para la extracción del injerto para una

*DMEK*, como describen Parekh y col (43), con alguna modificación. El proceso es el siguiente.

La córnea se dispone con el endotelio hacia arriba encima de un *punch* con mecanismo de vacío específico para trepanar córneas con 10 mm de diámetro (e.Janach, Italia). Se hace una trepanación parcial que no atraviesa la totalidad del estroma, y se tiñe durante 1 minuto con azul tripán al 0,06% (AJL Ophthalmic, Italia) para ver la marca de trepanación. Se lava con PSS-L (AlchimiA, Italia), un tampón salino utilizado para lavar las córneas donadas tras la valoración con azul tripán. Manteniendo la córnea siempre húmeda con PSS-L y bajo la lupa de un estereoscopio, con un gancho de clivaje (e.Janach, Italia) se levanta el borde trepanado del endotelio circunferencialmente, de forma suave. Posteriormente se despega del estroma con unas pinzas de punta fina (e.Janach, Italia) dejando 1 o 2 mm unidos al estroma, o retirándolo completamente y depositándolo con las pinzas sobre un portaobjetos adherente (Thermo Scientific). Sobre el portaobjetos, el endotelio unido a la membrana de Descemet, que por tendencia natural se enrolla sobre sí mismo debido a la elasticidad del colágeno, se desenrolla y se estira por capilaridad con ayuda de microesponjas que absorben el PSS-L.

## **6.6. Ensayo de viabilidad celular sobre endotelio**

Para el ensayo de viabilidad celular se utiliza el kit *LIVE/DEAD Cell Imaging* (Invitrogen). Este kit permite ver aquellas células con actividad esterasa que son capaces de hidrolizar la calceína AM (acetoximetil éster), generando un producto fluorescente verde hidrófilo, la calceína, que queda retenida en el citoplasma de aquellas células con membrana celular intacta. Este tipo de células son viables. Al mismo tiempo, al ADN (Ácido desoxirribonucleico) de las células que presenten las membranas celulares y nucleares dañadas se unirá el Componente Rojo no permeabilizante del kit, el cual emite fluorescencia roja. Este tipo de células serán no viable. Para marcar los núcleos de las células, y así detectar **presencia de células**, se utiliza *DAPI*

(4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) o Hoechst, que se unen al ADN y emiten fluorescencia azul.

Con el fin de optimizar la técnica, se han realizado tres experimentos previos a la realización del ensayo sobre los endotelios de las córneas criopreservadas y conservadas en hipotermia. De esta forma se busca el mejor protocolo para visualizar la presencia de células tomando como referencia los núcleos azules, y los diferentes tipos de células que puedan aparecer con las diferentes combinaciones posibles de los fluoróforos. El primer experimento se ha realizado sobre un cultivo de una línea celular mesenquimal KP-hMSC (44), que a partir de este momento denominaremos células KP, y los dos últimos sobre endotelios de córneas conservadas en hipotermia y criopreservadas de forma lenta con albúmina.

#### **6.6.1. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre un cultivo de células mesenquimales KP**

Se han cultivado las células KP en medio *MSCGM* (*Mesenchymal Stem Cell Growth Medium*; Lonza, España) en una placa de cultivo adherente de 100 mm<sup>2</sup>. Tras alcanzar el 80% de confluencia, se han tratado las células con tripsina-EDTA (*Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*) 2X, y se han subcultivado 5x10<sup>3</sup> células en cuatro pocillos de una placa de 24 pocillos con medio *MSCGM*. Transcurridas 24 horas, se ha retirado el medio y se ha lavado tres veces los pocillos con suero salino para retirar las esterasas que podría contener el medio de cultivo. Dos de los pocillos han sido permeabilizados con acetona. A continuación, se ha procedido a realizar el ensayo de viabilidad celular siguiendo las instrucciones recomendadas por la casa comercial del kit. Brevemente, se han mezclado la calceína AM y el Componente Rojo obteniendo una dilución madre 2X, y se han añadido 100 µl a cada uno de los pocillos, incubando 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, las células de los cuatro pocillos se han lavado una vez con PBS (*Phosphate Buffer Saline*), y se ha añadido en dos de ellos (permeabilizado y sin permeabilizar) 100 µl de *DAPI* (Roche) con concentración de 10 µg/ml y, del mismo modo, 100 µl de

Hoechst (Sigma) con concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  en los dos pocillos restantes (Figura 4) . El tiempo de incubación de Hoechst ha sido de 5 minutos. Se ha lavado una vez con *PBS* para retirar los restos de Hoechst. Las células han sido visualizadas y fotografiadas con el microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse Ti (Nikon) equipado con una cámara digital en el que se han tomado imágenes utilizando los filtros *DAPI*, *FITC* (*Fluorescein isothiocyanate*) y *TexasRed* y el programa informático *NIS-Elements* (Nikon).

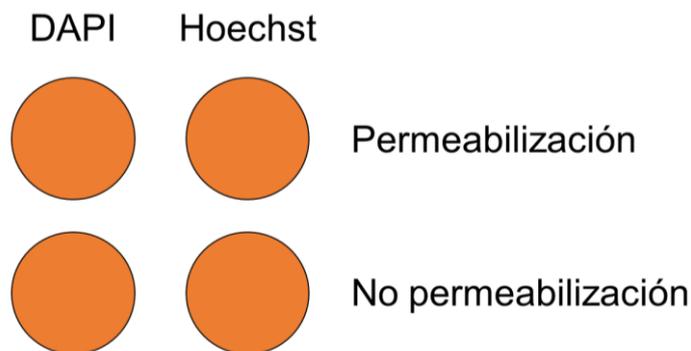


Figura 4. Esquema del ensayo de viabilidad celular sobre un cultivo de células KP.

#### 6.6.2. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: I.

Los endotelios han sido extraídos y se han colocado sobre portaobjetos adherentes. A continuación, sin permeabilizar, se ha realizado la tinción con la mezcla de Calceína AM y Componente Rojo, y posteriormente con Hoechst, tal y como se ha descrito en el apartado 6.6.1 durante la optimización del ensayo sobre un cultivo de células KP. Los lavados, en este caso, se han realizado con PSS-L. Los endotelios han sido visualizados y fotografiados con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 (Olympus España S.A., España), equipado con una cámara digital Olympus DP70 (Olympus España S.A.) con la que se han tomado imágenes utilizando los filtros *DAPI*, *FITC* y *TexasRed*, y el programa informático de captación de imágenes *cellSens 1.16* (Olympus S.A.).

### **6.6.3. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: II.**

Los endotelios han sido extraídos y se han colocado en un portaobjetos adherente. A continuación, sin permeabilizar, se ha realizado la tinción con la mezcla de Calceína AM y Componente Rojo, y posteriormente con Hoechst tal y como se ha descrito en el apartado 6.6.1 durante la optimización del ensayo sobre un cultivo de células KP. El tiempo de incubación del Hoechst, en este caso, es de 45 minutos (17,45), y los lavados han sido realizados con PSS-L. Finalmente, los endotelios han sido visualizados y fotografiados con el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP70 con la que se han tomado imágenes utilizando los filtros dicróicos *DAPI*, *FITC* y *TexasRed* y el programa informático de captación de imágenes *cellSens 1.16*.

Tras realizar la optimización del ensayo de viabilidad celular, se ha continuado con los endotelios de los grupos de córneas criopreservadas y del grupo control.

### **6.6.4. Ensayo de viabilidad celular sobre endotelio de los cinco grupos de córneas.**

Inmediatamente después de la descongelación, se ha realizado la extracción parcial del endotelio, permaneciendo unido al estroma corneal. A continuación, los endotelios han sido teñidos sobre la misma córnea (17,46), utilizando la mezcla de calceína AM y Componente Rojo. Transcurridos 15 minutos, se ha realizado un lavado con PSS-L, y se ha añadido Hoechst dejándolo incubar 45 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, el oftalmólogo M Álvarez ha retirado el endotelio de las córneas bajo la lupa y la luz de un estereoscopio, con ayuda de unas pinzas, y manteniendo el endotelio húmedo con PSS-L. Este proceso ha tenido que realizarse de forma rápida ya que se podría producir el fenómeno de *photobleaching*. Los endotelios se han colocado sobre un portaobjetos adherente con ayuda de PSS-L y una microesponja. Posteriormente se han llevado al microscopio de fluorescencia Olympus

BX61 y se han fotografiado bajo un aumento de 10X con la cámara digital Olympus DP70.

#### **6.6.4.1. Análisis de imágenes**

El análisis de imágenes ha sido realizado con el programa informático de análisis de imagen de libre acceso FIJI (*Fiji Is Just ImageJ*) (disponible en <http://fiji.sc/>). Brevemente, se han cogido al azar 4 imágenes de 1.360x1.024 px de cada endotelio, obtenidas con el filtro *DAPI*. Con estas imágenes, se ha realizado un contaje de núcleos. Se han seleccionado al azar varias regiones de interés (*ROIs, Regions of Interest*) de 250x250 px que fuesen representativas, poniendo un límite de un máximo de 30 *ROIs* por endotelio para poder contabilizar aproximadamente entre 1.000 y 1.500 núcleos. Se ha realizado un ajuste de contraste y brillo, y del valor umbral de color de los núcleos, siendo necesario en ocasiones eliminar ciertas áreas o incluir otras de forma manual. Las *ROIs* se han binarizado y en los casos necesarios, segmentado, para así analizar el número de partículas (núcleos) dentro de éstas (Figura). Posteriormente, la información de las *ROIs* de cada fotografía ha sido superpuesta sobre las imágenes tomadas con el filtro *FITC* y *TexasRed*. Las imágenes tomadas con el filtro *TexasRed* han sido convertidas de imagen tipo *RGB* a escala de grises para poder visualizar mejor los núcleos marcados de rojo. Con ambas imágenes, se ha realizado un contaje manual de los diferentes tipos de combinaciones de colores que se ha encontrado en las células endoteliales.

#### **6.7. Análisis de la estructura histológica**

Para el análisis de la estructura histológica de las córneas de Grupo Control y Grupo 1, 2, 3 y 4 se ha realizado el tricrómico de Masson. Esta tinción es utilizada para visualizar las fibras de colágeno (que son ácidas), que son teñidas de azul por el azul de anilina, y distinguir al mismo tiempo las células. El citoplasma de las células, que es básico, es teñido con la fucsina que le aporta color rosado, y los núcleos que son estructuras ácidas, son teñidos con la hematoxilina férrica que le da un color morado-gris. El protocolo realizado para esta tinción se describe a continuación.

Las preparaciones histológicas, previamente desparafinadas, se han hidratado mediante pases en xilol y en un gradiente decreciente de alcoholes (alcohol de 100° y alcohol de 96°), terminando en agua corriente. A continuación, los portaobjetos se han introducido en alumbre férrico. Transcurridos 30 minutos, se han lavado con agua corriente y se han sumergido en hematoxilina férrica durante 10 minutos. Las preparaciones se han lavado con agua corriente y se han dejado en ácido pícrico durante 6 minutos. Tras un lavado con agua corriente, se han introducido en fucsina de Ponceau durante 8 minutos a la que le ha seguido el ácido fosfomolibdico durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se han sumergido en azul de anilina durante 12 minutos. Finalmente, se han lavado con agua corriente y se han deshidratado mediante pases por un gradiente creciente de alcoholes (de 96° y de 100°), terminando en xilol. Se han montado los cortes de las muestras con *DePeX* (BHD VWR International LTD, Inglaterra) y se han visualizado y fotografiado con el microscopio Olympus BX61 equipado con una cámara digital Olympus DP70.

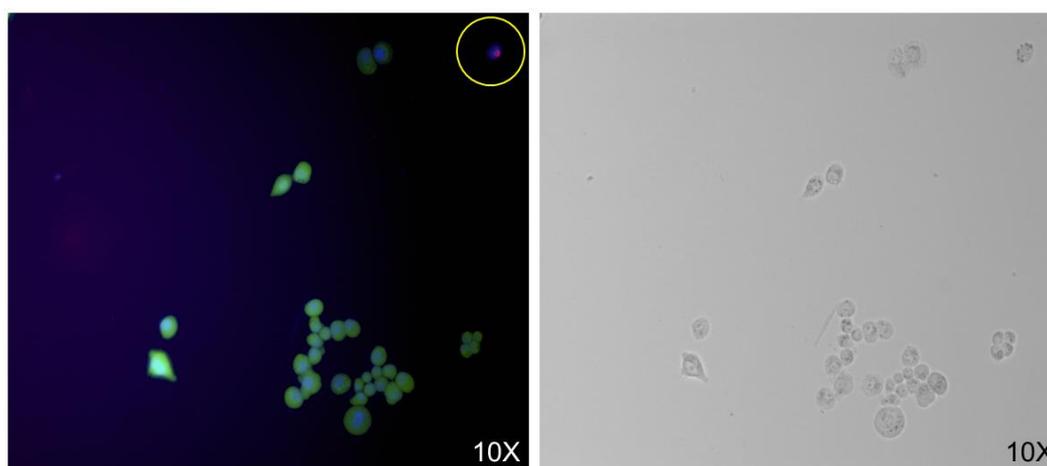
## 7. Resultados

### 7.1. Ensayo de viabilidad celular sobre endotelio

A continuación, se exponen los resultados de la optimización del protocolo de viabilidad celular sobre el endotelio.

#### 7.1.1. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre un cultivo de células mesenquimales KP

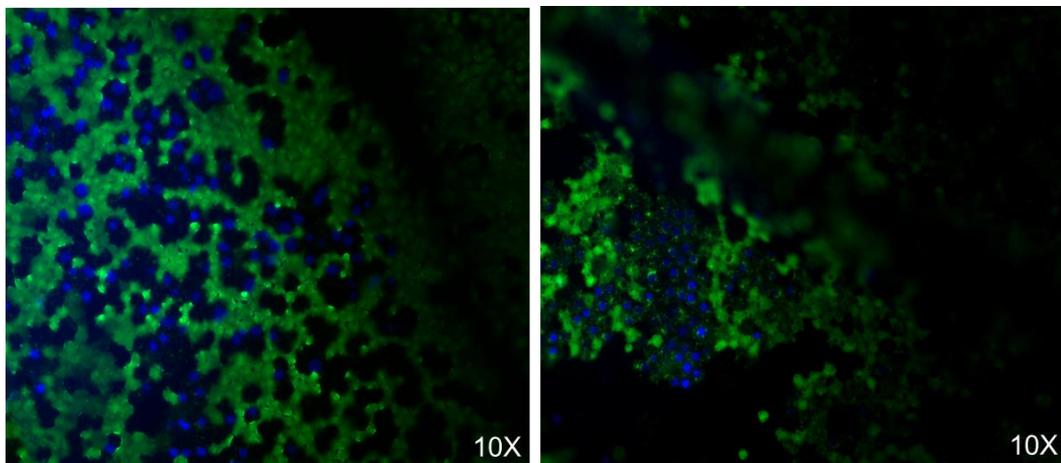
Las células en cultivo de la línea mesenquimal KP que fueron permeabilizadas, han mostrado positividad para el Componente Rojo y para Hoechst o *DAPI* (fluorescencia roja y azul, respectivamente), indicativo de células no viables. En las células que no fueron permeabilizadas y se utilizó *DAPI*, se han observado “células” con positividad para Calceína AM (fluorescencia verde), pero negativas para Hoechst; y células en muy bajo número positivas para Hoechst y para el Componente Rojo. Por otro lado, en las células sin permeabilizar en las que se utilizó Hoechst, ha habido presencia de células positivas para Calceína AM y para Hoechst (fluorescencia verde y azul), indicativo de células viables, y algunas células no viables en menor número (Figura 5).



**Figura 5.** Imágenes obtenidas tras la tinción de las células en cultivo KP en el ensayo de viabilidad celular sobre células en cultivo KP. Se muestran células sin permeabilizar y con positividad para calceína AM, Hoechst, y, señalado con un círculo, una célula positiva para Hoechst y para el Componente Rojo (izquierda). Imagen de las mismas células tomada en campo claro (derecha).

### 7.1.2. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: I.

Con un tiempo de incubación de Hoechst de 5 minutos, en los endotelios de la córnea almacenada en hipotermia y de la córnea criopreservada se han observado dos tipos de células: aquellas que han presentado positividad sólo para calceína AM, y aquellas que han mostrado positividad sólo para Hoechst. En el endotelio de la córnea criopreservada también se han observado células con leve positividad para calceína AM y para Hoechst (Figura 6).

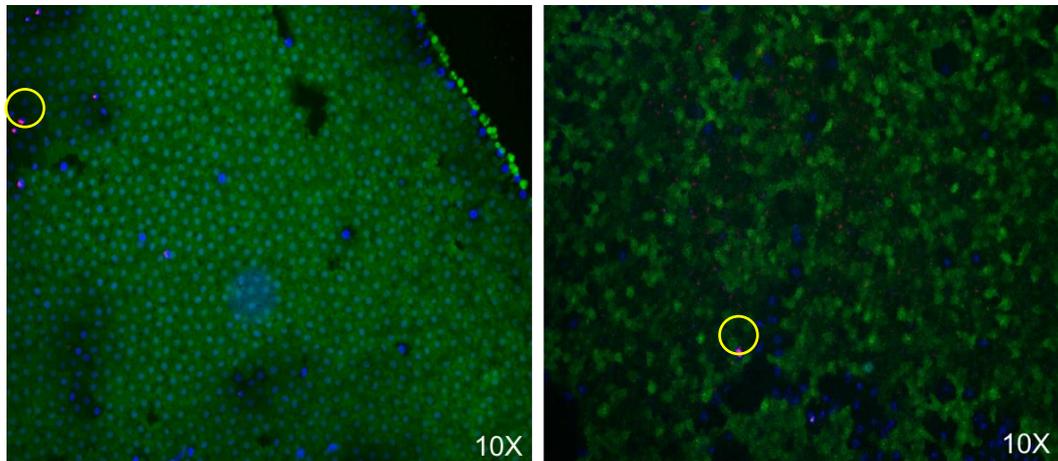


*Figura 6. Imágenes obtenidas tras la tinción de los endotelios en el ensayo de viabilidad celular sobre endotelio: I. Endotelio de la córnea conservada en hipotermia (izquierda), y del endotelio de la córnea criopreservada (derecha).*

### 7.1.3. Optimización del ensayo de viabilidad celular sobre endotelio corneal: II.

Con un tiempo de incubación de Hoechst de 45 minutos, en los endotelios de la córnea conservada en hipotermia y de la córnea criopreservada se han observado tres tipos de células: células viables con positividad para calceína y para Hoechst, células no viables con positividad para Hoechst y para el Componente Rojo y células con positividad sólo para Hoechst. En el endotelio de la córnea criopreservada, la fluorescencia del Hoechst en

los núcleos de las células que son positivas para Calceína AM es tenue pero perceptible (Figura 7).



**Figura 7.** Imágenes obtenidas tras la tinción de los endotelios en el ensayo de viabilidad celular sobre endotelio: 1. Endotelio de la córnea conservada en hipotermia (izquierda), y del endotelio de la córnea criopreservada (derecha). En la imagen del endotelio de la córnea criopreservada, debido al solapamiento, no se perciben los núcleos tenues sobre las células verdes intensas. Círculo amarillo: células con positividad para Hoechst y para el Componente Rojo (células no viables).

#### **7.1.4. Valoración de la celularidad endotelial y de la viabilidad celular sobre endotelios corneales**

Mediante la tinción con Calceína AM, Componente Rojo y Hoechst se ha realizado la valoración de la celularidad endotelial y de la viabilidad celular.

La colocación del endotelio en los portaobjetos tras la tinción sobre la córnea ha sido dificultosa, provocando pliegues y dobleces en el tejido que han dificultado el enfoque de las células en el microscopio.

Debido a ello, no ha sido posible realizar un conteo de células por endotelio, por lo que se ha decantado por un ensayo cualitativo de la celularidad del endotelio. También, por este motivo, se han seleccionado *ROIs* al azar en aquellas zonas de las imágenes donde había sido posible realizar un buen enfoque del endotelio para realizar la evaluación de viabilidad celular.

Se ha utilizado una media de  $25 \pm 4$  *ROIs* representativos por endotelio y se ha realizado un conteo de células (núcleos) de  $1.202 \pm 246$  células en cada endotelio. En un endotelio II del Grupo 1 no se ha podido alcanzar los 1.000 núcleos, a pesar de haber definido 29 *ROIs* entre las 4 imágenes. El

número de células de cada tipo se ha expresado como porcentaje de cada tipo celular por cada endotelio. El tipo celular viene definido por la combinación de la positividad para los componentes de la tinción. Los resultados se reflejan en la Tabla IV.

**Tabla IV.** Resultados del ensayo de viabilidad celular. Se muestran los porcentajes de cada tipo celular dependiendo de la positividad para los colorantes y el número total de células contadas por endotelio. Las flechas señalan alta (flecha hacia arriba) y leve (flecha hacia abajo) positividad a calceína AM. Para el endotelio II del Grupo 2 no se ha realizado contaje, dada la gran acelularidad de la membrana de Descemet. El endotelio II del grupo 4 no muestra contaje debido a la pérdida de la muestra durante la descongelación.

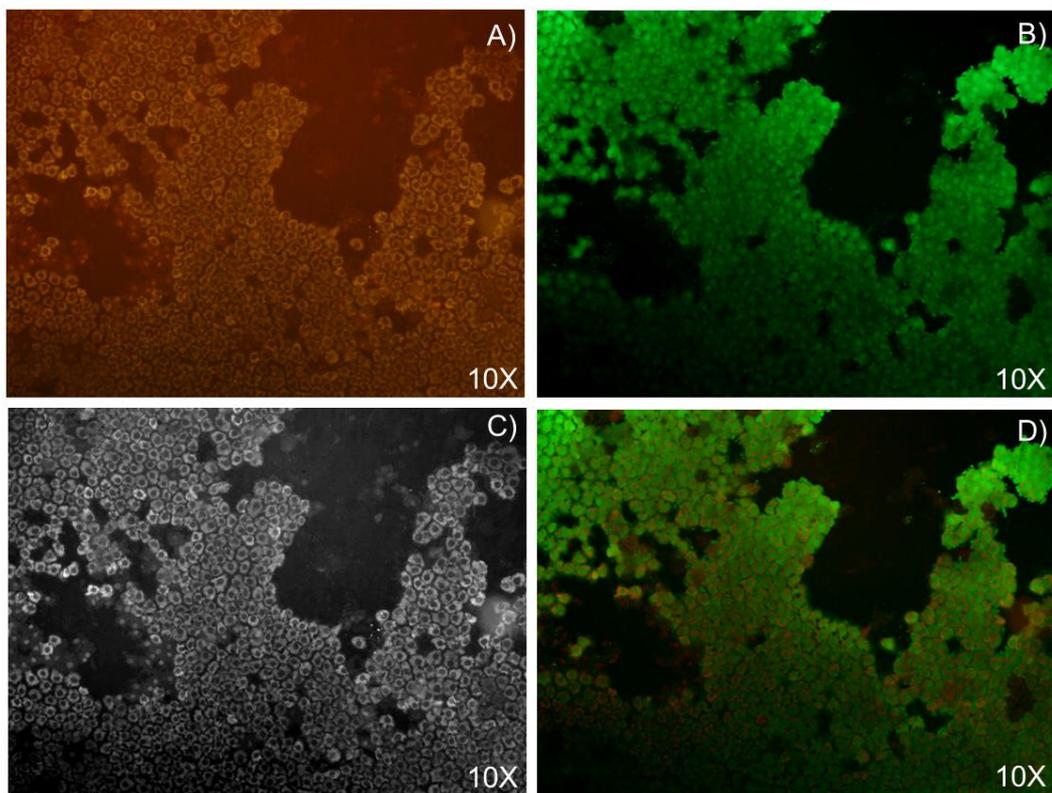
Endotelio	Hoechst Calceína ↑	Hoechst Calceína ↓	Hoechst Calceína C. Rojo	Hoechst	Hoechst C. Rojo	Total células
<b>Grupo Control: conservación en hipotermia</b>						
I	99,66%	0%	0%	3,34%	0%	1.258
II	87,77%	4,45%	4,52%	3,26%	3,26%	1.349
<b>Grupo 1: criopreservación lenta con albúmina</b>						
I	66,79%	30,81%	2,32%	0,09%	0,18%	1.123
II	0%	92,17%	7,83%	0%	0%	626
<b>Grupo 2: criopreservación lenta sin albúmina</b>						
I	0%	100%	0%	0%	0%	1.351
II	-	-	-	-	-	-
<b>Grupo 3: criopreservación rápida mediante vitrificación con medio VS55</b>						
I	0%	99,11%	0,15%	0,74%	0,15%	1.346
II	0%	100%	0%	0%	0%	1.239
<b>Grupo 4: criopreservación rápida mediante vitrificación con medio DP6</b>						
I	0%	100%	0%	0%	0%	1.326
II	-	-	-	-	-	-

### Grupo Control: córneas conservadas en hipotermia

Los endotelios de las dos córneas conservadas en hipotermia han presentado mucha celularidad y algún área acelular alargada, y pequeños

huecos sin células en medio de zonas densamente pobladas (Figura 10, A).

Las células han mostrado una viabilidad muy alta, representando este tipo un  $92,22\% \pm 6,29\%$  del total contabilizado. Se han visto también, aunque en menor número, células con una leve positividad para calceína AM y para Hoechst ( $2,22\% \pm 3,14\%$ ); células positivas sólo para Hoechst ( $3,30\% \pm 0,06\%$ ); células con leve positividad para calceína y positividad para Hoechst y para el Componente Rojo ( $2,26\% \pm 3,20\%$ ), y células no viables con positividad para Hoechst y el Componente Rojo ( $1,63\% \pm 2,30\%$ ) (Figura 8) (Tabla IV).



**Figura 8.** Imágenes del endotelio II del Grupo Control. Se muestra la positividad del Componente Rojo (A, C, y D), y la positividad a la calceína AM (B y D).

### **Grupo 1: córneas criopreservadas con albúmina**

De los dos endotelios extraídos, el I ha presentado más zonas de la membrana de Descemet desnudas (acelulares) que las córneas frescas, siendo más amplias, y presentando mayor número de huecos irregulares (Figura 10, B). El endotelio II ha sido muy dañado a la hora de la

manipulación. Ha presentado menor número de células adheridas a la membrana de Descemet.

Respecto a la viabilidad celular, para el endotelio I, un 66,79% de sus células han sido viables (elevada positividad para calceína AM), y un 30,81% de células han presentado leve positividad para calceína AM respecto al total contabilizado. Ha sido posible percibir, aunque en menor porcentaje, células con positividad para Hoechst (0,09%), células con positividad para los tres fluoróforos (2,32%), y células no viables positivas para Hoechst y el Componente Rojo (0,18%).

El endotelio II, como se ha comentado anteriormente, ha presentado menor número de células adheridas a la membrana de Descemet y se han encontrado muchas células sueltas o formando un grupo de células unidas entre sí con una leve actividad esterasa alrededor del endotelio (Figura 10). No obstante, las células que han quedado adheridas han mostrado una leve actividad esterasa (92,17%) y ha habido algunas que han presentado una leve actividad esterasa y núcleos marcados con Hoechst y con el componente rojo (7,83%) (Tabla IV).

### **Grupo 2: córneas criopreservadas sin albúmina**

El endotelio I, ha presentado más zonas denudadas amplias que los grupos anteriores en la membrana de Descemet, y huecos sin células en medio de zonas densamente pobladas (Figura 10, C).

Atendiendo al contaje de núcleos, se ha observado que el 100% de las células ha mostrado una leve positividad para calceína AM (Tabla IV). Sin embargo, se ha observado una elevada positividad para calceína AM en unos cúmulos verdes que presentaban morfología típica de las células endoteliales, pero sin positividad para Hoechst (Figura 10, C). Aunque en baja cantidad, se han encontrado células sueltas alrededor del endotelio (no contabilizadas) con leve positividad para calceína AM y Hoechst y células sólo positivas para Hoechst.

El endotelio II ha sido muy dañado a la hora de la manipulación y se ha doblado a la hora de colocarlo sobre el portaobjetos, dificultando el enfoque. En las zonas que han quedado en monocapa ha presentado muy baja celularidad, aunque sí hay cúmulos de calceína con morfología de células endoteliales, sin positividad para Hoechst, y células con una leve positividad para calceína AM (Figura 9). Se han encontrado muchas células sueltas o formando un grupo de células unidas entre sí con intensa actividad esterasa, leve o ninguna, alrededor del endotelio.

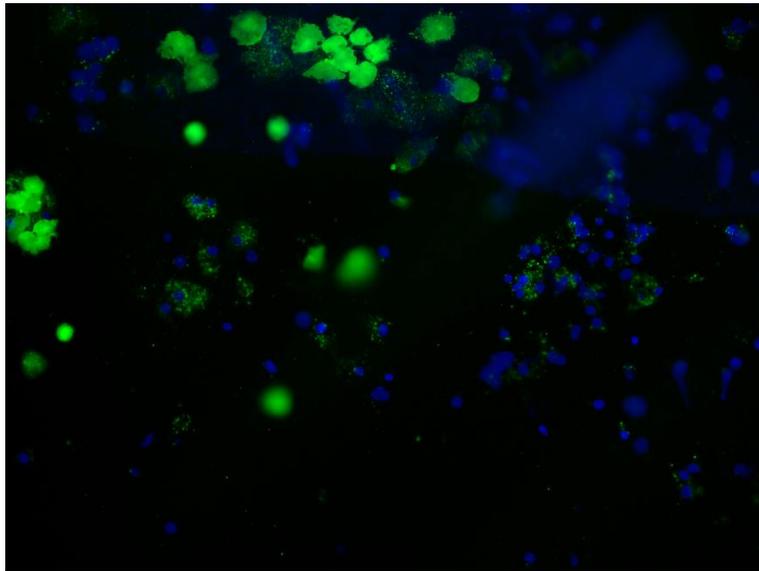


Figura 9. Imagen del endotelio II del Grupo 2.

### **Grupo 3: córneas criopreservadas mediante vitrificación VS55**

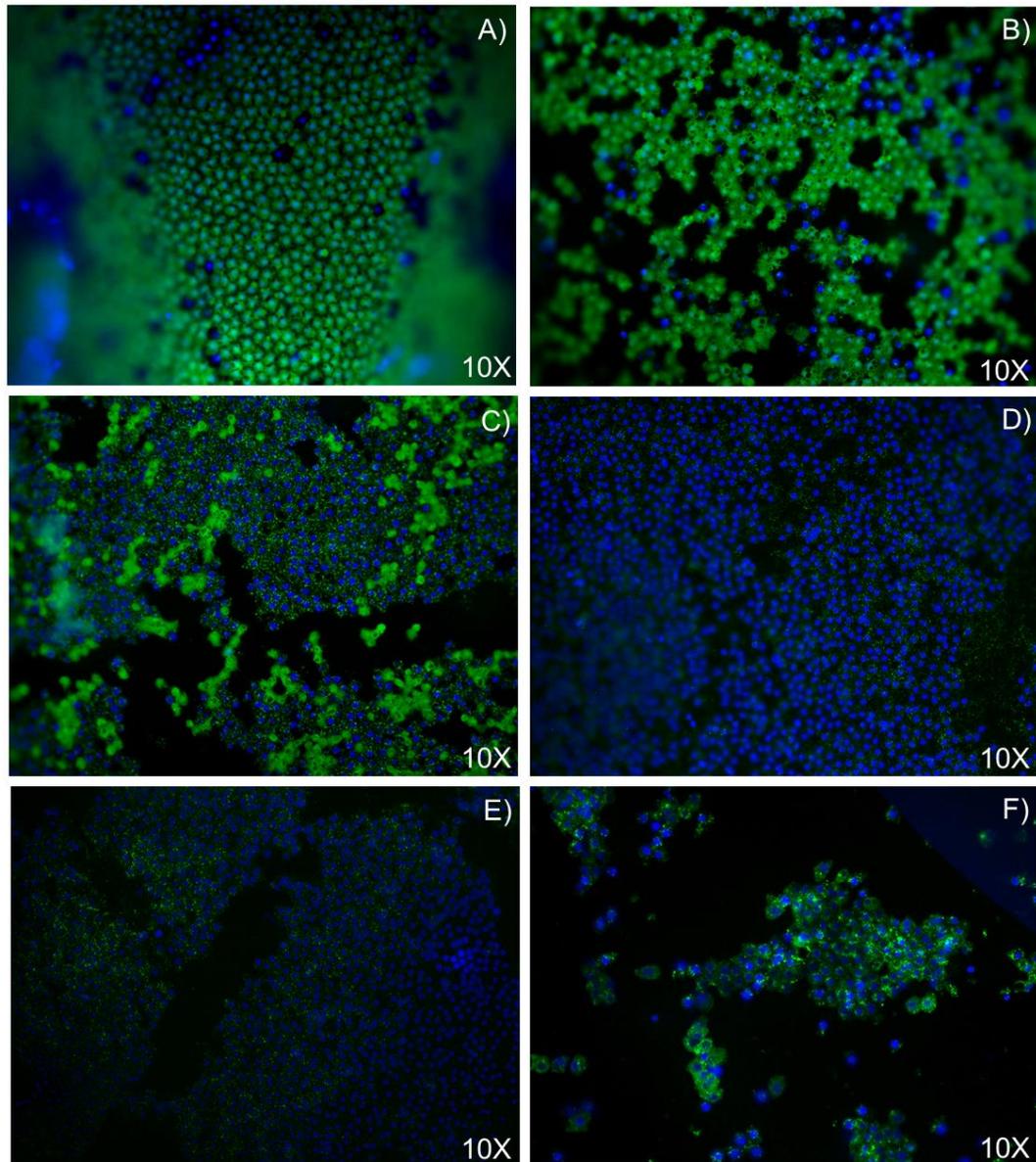
Ambos endotelios de las dos córneas criopreservadas con medio VS55 han presentado, en general, más zonas desnudas amplias que las córneas frescas, aunque el número de células endoteliales es, a primera vista, mayor que el de los endotelios de los grupos anteriores. Se encuentran también huecos sin células en zonas de alta celularidad (Figura 10, D).

La gran mayoría de las células contabilizadas han mostrado una leve positividad para calceína AM (un  $99,55 \pm 0,63\%$ ). En el endotelio I se han visto, aunque en muy bajo porcentaje, células con positividad sólo para Hoechst (0,74%) y células que han presentado positividad para los tres fluoróforos (0,15%) (Tabla IV).

### **Grupo 4: córneas criopreservadas mediante vitrificación DP6**

El endotelio de la córnea criopreservada con medio DP6 ha mostrado zonas desnudas más amplias que los dos grupos anteriores, aunque el número de células adheridas a la membrana de Descemet es alto, con una densidad aparente similar a la del grupo 3, aunque menor (Figura 10, E).

Respecto a la viabilidad celular, ha presentado un 100% de células con positividad leve para calceína AM (Tabla IV).



**Figura 10.** Imágenes de los endotelios de los cinco grupos. A) Endotelio de córnea del Grupo 1; B) Endotelio de córnea del Grupo 2; C) Endotelio de córnea del Grupo 3; D) Endotelio de córnea del Grupo 4; E) Endotelio de córnea del Grupo 5; F) Cúmulo de células encontrado en las inmediaciones del endotelio de la córnea II del Grupo 1.

## **7.2. Análisis histomorfológico**

El análisis histomorfológico se ha realizado sobre una córnea de cada grupo. Atendiendo principalmente al epitelio, al estroma y al endotelio, se describen a continuación el estado de cada una de esas capas.

### **Grupo Control: córneas conservadas en hipotermia**

Las diferentes capas de la córnea están bien definidas, exceptuando el epitelio en el centro del corte, donde presenta un corte longitudinal y no continua (Figura 11, A). El estroma muestra entre las fibras del colágeno ciertas oquedades pequeñas, y el endotelio se encuentra unido a la membrana de Descemet (Figura 12, A).

### **Grupo 1: córneas criopreservadas con albúmina**

El epitelio de la córnea está adherido, pero “dentado” por ciertas zonas, con células deformes, y en otras es más estrecho de lo normal, con las diferentes capas de las células muy juntas entre sí con células aplanadas (Figura 11, B). El estroma muestra oquedades grandes entre los haces de colágeno. El endotelio está intacto y adherido a la membrana de Descemet (Figura 12, B).

### **Grupo 2: córneas criopreservadas sin albúmina**

El epitelio de la córnea no se encuentra adherido a la membrana de Bowman en ciertas zonas, y en otras en otras es más estrecho de lo normal, con las capas más externas con células planas y las células más internas pequeñas (Figura 11, C). El estroma muestra pequeñas oquedades entre los haces de colágeno. El endotelio no se está unido a la membrana Descemet (Figura 12, C).

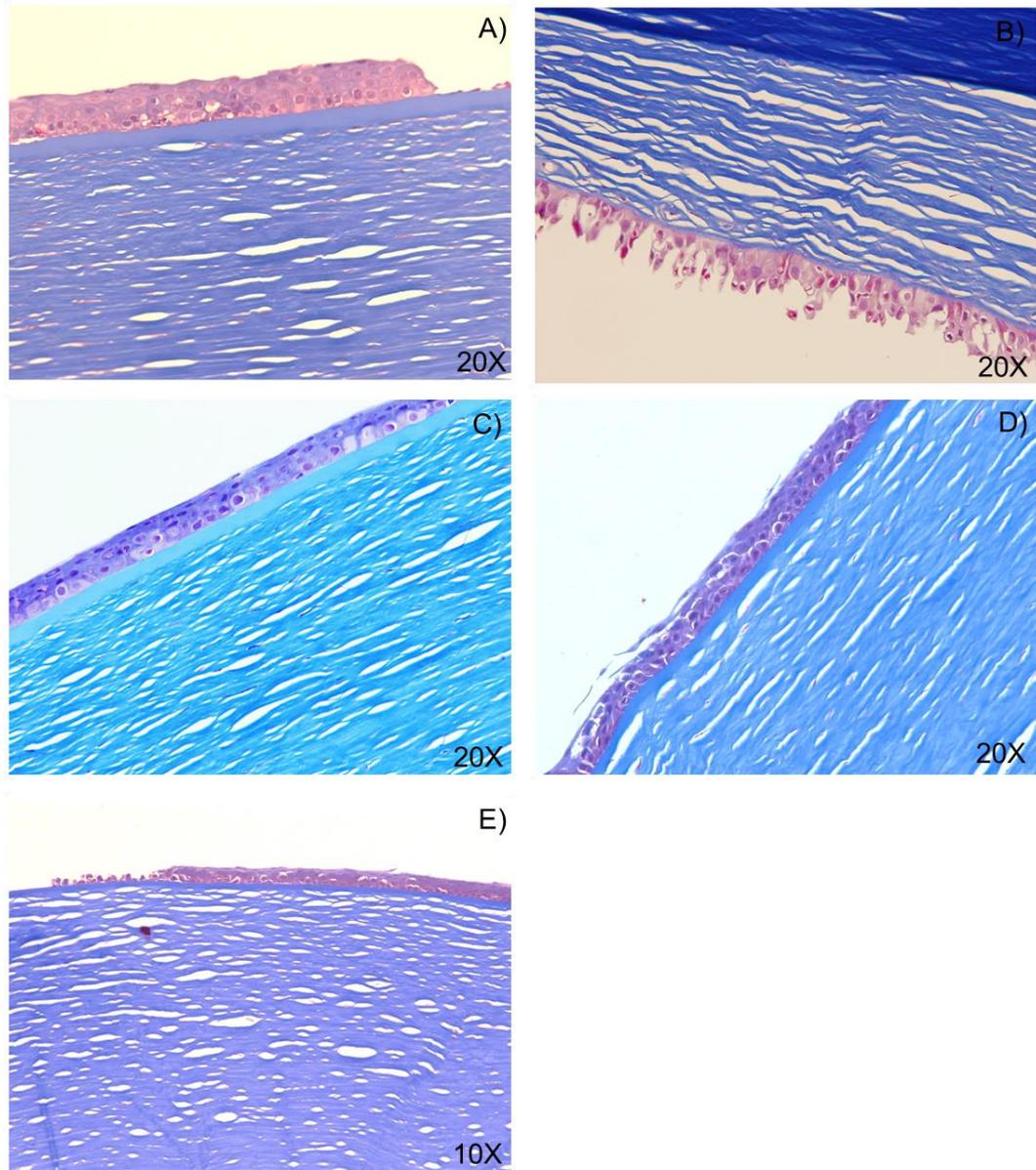
### **Grupo 3: córneas criopreservadas mediante vitrificación VS55**

El epitelio, más estrecho de lo normal, y el endotelio permanecen adheridos en los laterales de la muestra a la membrana de Bowman y a la de Descemet, respectivamente, mientras que se desprende en el centro

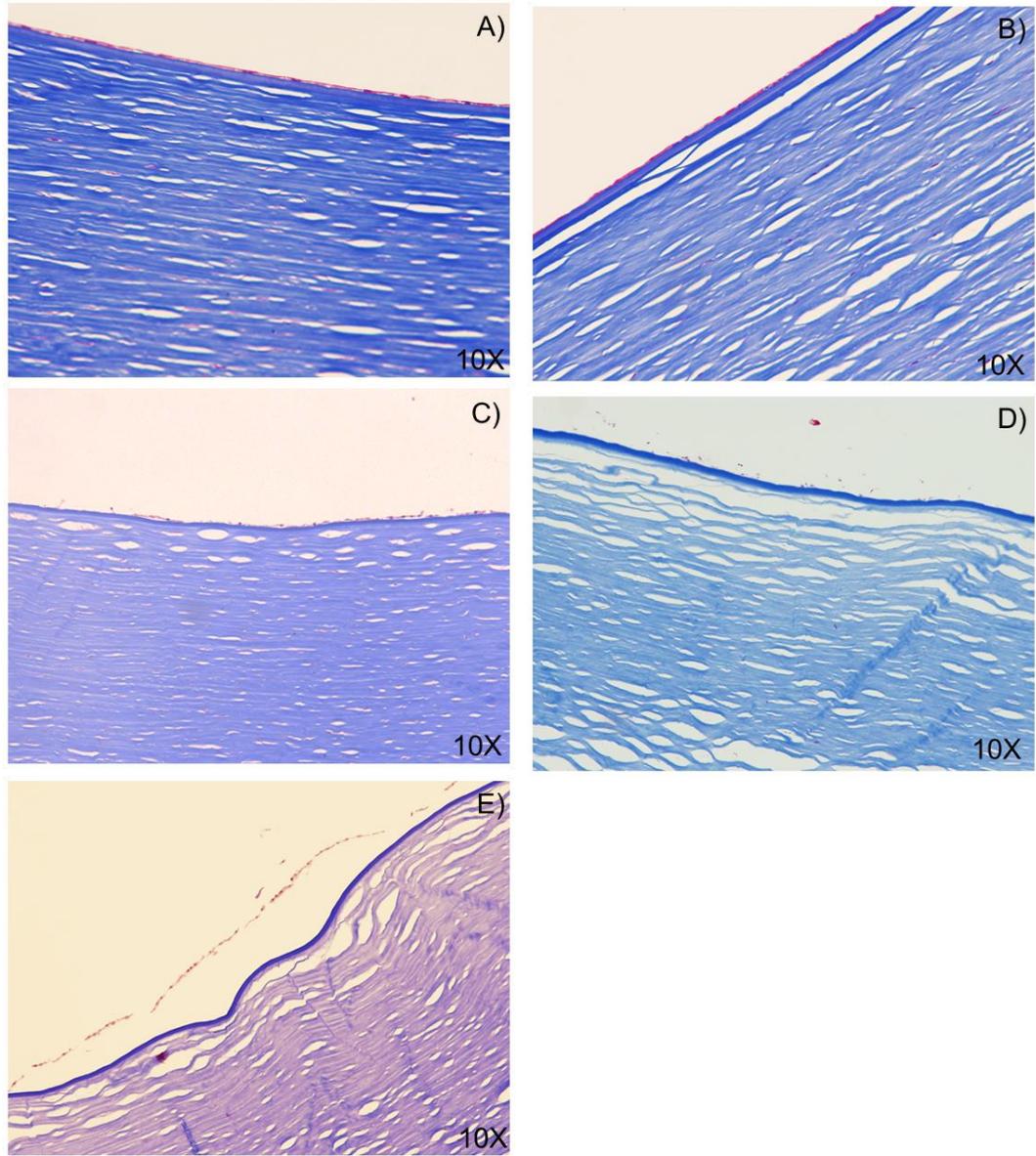
(Figura 11, D, y Figura 12, D). Se aprecian oquedades amplias en el estroma.

#### **Grupo 4: córneas criopreservadas mediante vitrificación DP6**

El epitelio permanece adherido en los laterales de la muestra, mientras que se desprende en el centro; en ciertas partes, se hace más estrecho, con células más pequeñas (Figura 11, E). Se aprecian oquedades amplias en el estroma. Respecto al endotelio, se encuentra unido a la membrana de Descemet en los laterales, pero no en el centro (Figura 12, E).



**Figura 11.** *Detalle de los epitelios de las córneas. Cortes transversales de córneas con tinción de Tricrómico de Masson: A) Grupo Control, B) Grupo 1, C) Grupo 2, D) Grupo 3, E) Grupo 4.*



**Figura 12.** *Detalle del endotelio de las córneas. Corte transversal de córneas con la tinción tricrómico de Masson. A) Grupo 1, B) Grupo 1, C) Grupo 2, D) Grupo 3, E) Grupo 4.*

## 8. Discusión

Los trasplantes de córnea o de las lamelas corneales son la única solución a numerosas patologías oculares, las cuales suelen ir acompañadas de la pérdida de visión. Una de las limitaciones que presenta este tipo de trasplante es el tiempo de conservación de las córneas donadas que, en el mejor de los casos, es de sólo 4 semanas (1,13,14,19). Al transcurrir ese tiempo, las córneas son descartadas. Desde hace décadas se ha planteado la necesidad de mejorar los métodos de conservación que permitiesen preservar las córneas durante un largo período de tiempo. El método propuesto por aquel entonces y actualmente es la criopreservación (6,20).

En los estudios que se han realizado hasta ahora sobre criopreservación de córneas no se ha llegado al protocolo óptimo de criopreservación, pero sí se ha ido dando pequeños pasos analizando los comportamientos de la córnea ante el proceso de criopreservación, y en especial, del endotelio.

El endotelio es la capa más sensible de la córnea que regula su transparencia, hidratación y grosor (6,7). Por esta razón, una córnea para ser trasplantada debe tener un endotelio viable y funcional.

En este estudio se han utilizado cuatro protocolos diferentes de criopreservación, dos de ellos de criopreservación lenta y otros dos de criopreservación rápida, para criopreservar córneas. Se ha comparado la celularidad endotelial, la viabilidad celular endotelial y la histomorfología de las córneas tras ser descongeladas, centrándose en los daños que podrían haber sido provocados por el proceso de criopreservación.

La extracción del endotelio y el ensayo de viabilidad celular con calceína *AM* se realizó de forma similar a la de otros estudios en los que se comparan protocolos de transporte y de preservación de córneas en cultivo o en hipotermia (17,45,47–49), descrita con detalle por Parekh y col. (43).

Antes de realizar la evaluación de la celularidad y de la viabilidad de las células endoteliales, se ha optimizado el protocolo de la tinción con calceína. De esta forma se optimizaron los tiempos de incubación de los

fluoróforos utilizados, primero en un cultivo de la línea celular mesenquimal KP, y posteriormente en endotelio. De esta forma se logró que el Hoechst, con un tiempo de incubación largo (a diferencia de las células KP en cultivo), penetrase en las células vivas del endotelio corneal.

No ha sido posible realizar un conteo exacto de células totales por endotelio extraído. Las dobleces y los pliegues del endotelio no han permitido contabilizar las células de toda el área endotelial. Por este motivo, se decantó por hacer un ensayo cualitativo de la integridad del endotelio. De esta forma, atendiendo a la cantidad de núcleos positivos para Hoechst se ha realizado una aproximación de las diferencias en la celularidad entre grupos de criopreservación.

Se ha observado que las córneas que habían sido criopreservadas de forma rápida presentaban más cantidad de células adheridas que las criopreservadas de forma lenta. Esto se contradice con otros estudios en los que se afirma que son más susceptibles a perder células los endotelios de las córneas criopreservadas de forma rápida (50). No obstante, esa afirmación se basa en los resultados obtenidos de un cultivo de células endoteliales en monocapa sobre colágeno I. Las condiciones en las que están las células *in vitro* y en un tejido son diferentes.

Por otro lado, es notable la presencia de zonas acelulares alargadas en todos los endotelios. Estas zonas han sido descritas con anterioridad en este tipo de extracciones de endotelio, pero también es posible encontrarlos de forma natural en endotelios de córneas que no han sido extraídos (17).

También se han encontrado otras regiones acelulares. Éstas están en medio de zonas densamente pobladas de células, o a los laterales de las zonas descritas con anterioridad, tanto en los dos grupos de criopreservación lenta como en los de criopreservación rápida. Esta observación también fue realizada por otros autores los cuales explican que estas pérdidas de células en las córneas criopreservadas podrían deberse a daños en el citoesqueleto y en las adhesiones celulares (50,51). No obstante, estos huecos también han sido visibles en los endotelios del

Grupo Control, por lo que no se puede concluir que sean daños de la criopreservación.

Así mismo, es necesario tener en cuenta que la técnica de extracción y posterior manipulación del endotelio para realizar el ensayo de viabilidad celular daña al endotelio. Las zonas acelulares que se encuentran en los márgenes de los endotelios se han creado durante la trepanación y extracción del endotelio (17), siendo un aspecto negativo de este tipo de ensayos destructivos de viabilidad celular.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es necesario tomar con precaución los resultados obtenidos, ya que son cualitativos y dependientes del observador, el tamaño muestral utilizado es muy pequeño y los daños por manipulación del endotelio son importantes. Sería interesante realizar un estudio con un mayor tamaño muestral que permitiese ver las diferencias en la celularidad endotelial. Sería recomendable tener en cuenta el conteo endotelial previo a la criopreservación y la utilización de un método menos destructivo para realizar un conteo de células endoteliales sobre la córnea.

Como se ha indicado anteriormente, las células endoteliales deben ser viables y funcionales para que una córnea sea trasplantada. En la literatura consultada se han descrito diferentes técnicas para testar la viabilidad celular endotelial en córneas preservadas. Éstas incluyen desde la microscopía óptica y la electrónica hasta las tinciones como el azul tripán y el rojo alizarina (6). Otras tinciones empleadas también se basan en la actividad enzimática elevada que deberían de tener las células viables (6). Un ejemplo de ello es el utilizado para este estudio, donde se ha empleado la calceína *AM* que es hidrolizada por las esterasas del citoplasma, como son las anhidrasas carbónicas que participa en regulación de la hidratación de la córnea. La calceína resultante queda retenida en las células con membranas celulares intactas (17,47). No hay constancia en la bibliografía consultada de haber realizado este tipo de tinción con calceína *AM* sobre endotelios de córneas criopreservadas, pero sí de haber utilizado otra

sustancia que es hidrolizada por las esterasas: el diacetato de fluoresceína (38).

Partiendo del análisis de imágenes y del conteo de núcleos en las *ROIs*, se ha comprobado que las córneas del Grupo 1 (criopreservadas de forma lenta con albúmina) contenían células viables con intensa actividad esterasa mientras que en el Grupo 2 (criopreservadas de forma lenta sin albúmina), la presencia de células viables era escasa. En los dos grupos de córneas criopreservadas de forma rápida, las células viables eran inexistentes.

En cuanto a las células no viables, en los grupos de córneas criopreservadas no ha alcanzado el 1% del total de células de cada endotelio. Curiosamente, es mayor el número de células no viables en las córneas control, con un 3,6% de media. Sin embargo, la tinción con el componente rojo en ocasiones ha sido muy tenue, lo que puede indicar que quizás se haya subestimado la cantidad de células no viables.

En un estudio realizado por Romano y col, se ha descrito unas “células intermedias” con positividad sólo para Hoechst que aparecen en este tipo de ensayos con calceína *AM*. Son definidas como células que ya no son viables, pero que todavía no tienen las membranas dañadas (45). De este tipo de células se han encontrado muy pocas en los grupos de córneas criopreservadas (<1%), representando un 3% en los endotelios de las córneas control. Por el contrario, también se han observado células donde están presentes los tres componentes de la tinción. No se han encontrado este tipo de células en la bibliografía consultada. Esto indica, en un principio, que en esas células todavía hay restos de actividad esterasa, pero las membranas ya están dañadas. Esta observación es podría considerarse como uno de los inconvenientes de este tipo de ensayos enzimáticos de viabilidad celular. Después de la muerte celular, todavía es posible que haya cierta actividad enzimática (6)

Otro tipo celular que se ha descrito en este trabajo, y que predomina en ambos grupos de córneas criopreservadas de forma rápida, y también está

presente en las córneas criopreservadas sin albúmina, es aquel que muestran células con una leve actividad esterasa. Estas células podrían equivaler a las definidas por Steinhardt y col como “células moribundas” (*dying cells*) (49).

Este último tipo de células podría relacionarse con los estudios de funcionalidad del endotelio mediante perfusión. Con este tipo de pruebas, varios autores han testado la capacidad del endotelio de controlar la hidratación de la córnea tras ser descongelada (36,37). En ellos se ha visto que, a concentraciones altas de crioprotectores y tras la descongelación, el endotelio no es capaz, normalmente, de controlar la hidratación de la córnea, y ésta se hincha. Pasadas unas horas, la córnea recupera su grosor, o se acerca al que tenía antes de ser criopreservada, lo que es indicativo de que ha recuperado su funcionalidad (35–37,39).

Por esta razón, las “células moribundas” podrían equivaler a las células endoteliales que no son capaces de controlar la hidratación de la córnea y que necesitan tiempo para estabilizarse. No obstante, es necesario tener en cuenta que muchos de estos estudios se han hecho sobre córnea de conejo, la cual posee un endotelio con capacidad regenerativa, cosa que no sucede en el endotelio humano (51).

Por otra parte, también se sabe que, en ocasiones, los daños producidos por toxicidad de los CPAs suelen provocar apoptosis y necrosis en las células horas después de la descongelación, y las “células moribundas” podrían también ajustarse a este perfil (23,24,33).

Otro aspecto dañino de la criopreservación en tejidos es la formación de hielo, considerado un problema a evitar, incluso más que en la criopreservación de células en suspensión (21,24,26). En este estudio, con el análisis histomorfológico mediante la tinción del tricrómico de Masson se buscaba detectar posibles roturas o espacios donde se hubiesen formado cristales de hielo que alterasen la estructura tisular de las córneas.

Son apreciables las oquedades amplias entre los haces del estroma en las córneas criopreservadas del Grupo 1, 3 y 4 que han podido ser causadas durante el proceso de criopreservación. Este daño había sido descrito con anterioridad por otros autores (52), y se cree que se puede ocurrir durante la descongelación al sufrir una rehidratación mayor de lo normal, debida a que las células endoteliales no la regulan. En cuanto al endotelio, se han mostrado desprendimientos en los Grupos 2, 3 y 4. La causa de los desprendimientos puede estar relacionada con los daños producidos en la adhesión celular de las células endoteliales, expuesto anteriormente (50). Este resultado contradice a la celularidad descrita en los endotelios de los grupos de córneas criopreservadas de forma rápida mediante vitrificación, que eran los que presentaban una mayor celularidad.

El epitelio es el que ha mostrado más irregularidades. En los cuatros grupos de criopreservación, esta capa de la córnea es más estrecha de lo normal. Se pierden capas superficiales, y sus células son más pequeñas de lo normal y aplanadas. En algunos lugares, se desprende de la membrana de Bowman. Este resultado coincide con lo observado por Van Horn y col., que analizaron los cambios de la histomorfología de la córnea criopreservada mediante microscopía electrónica de barrido (52). El cambio de volumen de las células puede ser debido a un desajuste en la ósmosis provocado durante la incorporación y/o retirada de los CPAs (21,24,26). El epitelio que aparece “dentado” en la córnea criopreservada con albúmina, ha podido quedar deforme debido a la formación de hielo extracelular (52).

Con todo, es necesario tener en cuenta que al ser utilizada solamente una córnea por grupo para realizar la evaluación histomorfológica, no es posible distinguir daños por criopreservación de los posibles artefactos de la técnica.

Todos estos resultados son un punto de partida con el que comenzar a ajustar técnicas para la valoración del estado de las córneas tras la criopreservación. De esta forma, se podrá seguir mejorando o descartando protocolos de criopreservación, que algún día serán utilizados en la práctica

clínica. Además, también es necesario analizar en un futuro las posibles repercusiones de los *CPAs* utilizados en este trabajo, sus concentraciones, y el sistema de adición y retirada de los mismo, pues son otros de los factores claves de un correcto funcionamiento de un protocolo de criopreservación.

## 9. Conclusiones

- La criopreservación lenta y la criopreservación rápida mediante vitrificación aportan celularidades endoteliales altas tras la descongelación, mostrando la mayor celularidad la criopreservación rápida.
- La viabilidad celular endotelial tras la descongelación se ve afectada en la criopreservación rápida mediante vitrificación, mientras que las córneas criopreservadas de forma lenta con albúmina retienen cierta viabilidad celular.
- El endotelio, el epitelio y el estroma de la córnea son capas dañadas durante la criopreservación, que se ven más afectadas por la criopreservación lenta que por la criopreservación rápida mediante vitrificación.

## 10. Agradecimientos

Este estudio se ha llevado a cabo gracias al apoyo de:

- Servizo Galego de Saúde (SERGAS)
- La Unidad de Criobiología/Banco de Tejidos del CHUAC
- La Unidad de Oftalmología del CHUAC
- La Oficina de Coordinación de Trasplantes
- Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)
- Universidade da Coruña (UDC)

Por orden de aparición en escena, me gustaría agradecer a mi directora de TFM, Silvia Díaz, por haberme dado la oportunidad de poder participar en el mundo de la investigación.

A mi otra directora, Esther Rendal, por ser insistente y proporcionar un tema sobre en el que curiosear.

A los implicados en este trabajo, en especial, Marcelino Álvarez, por el tiempo libre que empleó en ayudarme con este trabajo.

A Alejandro Salinas, por ser el enlace entre familias y el Banco de Tejidos, sin quien no hubiese sido posible conseguir las muestras.

A Bea Cruz por haberme enseñado las técnicas histológicas necesarias.

A las dos chiquillas del Grupo de Terapia y Medicina Regenerativa, María Piñeiro y Rocío Castro, quienes me han ayudado a ponerme al día en el laboratorio.

Y por último... A Carlos Barcia y Sofía Salutregui... ellos saben por qué.

## 11. Bibliografía

1. Armitage W. Preservation of human cornea. *Transfus Med Hemother* 2011;38:143–7.
2. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Vol. 49, *P Prog Retin Eye Res*. 2015;49:1–16.
3. Ramos T, Scott D, Ahmad S. An Update on Ocular Surface Epithelial Stem Cells: Cornea and Conjunctiva. *Stem Cells Int*. 2015; 2015:601731.
4. Massoudi D, Malecaze F, Galiacy SD. Collagens and proteoglycans of the cornea: importance in transparency and visual disorders. *Cell Tissue Res*. 2016;363:337–49.
5. Parekh M, Ferrari S, Sheridan C, Kaye S, Ahmad S. Concise Review: An Update on the Culture of Human Corneal Endothelial Cells for Transplantation. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(2):258–64.
6. Taylor MJ. Clinical cryobiology of tissues: Preservation of corneas. *Cryobiology*. 1986;23(4):323–53.
7. Taylor MJ, Hunt CJ. Tolerance of corneas to multimolar dimethyl sulfoxide at 0 degrees C. Implications for cryopreservation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30(3):400–12.
8. Bonanno JA. Molecular mechanisms underlying the corneal endothelial pump. *Exp Eye Res*. 2012;95(1):2–7.
9. Armitage WJ. Survival of corneal endothelium following exposure to a vitrification solution. *Cryobiology*. 1989;26(4):318–27. 9
10. Joyce NC. Proliferative capacity of corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2012;95(1):16–23.
11. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(2):167–73.

12. Maharana P, Sahay P, Singhal D, Garg I, Titiyal J, Sharma N. Component corneal surgery: An update. *Indian J Ophthalmol*. 2017;65(8):658.
13. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application, 3rd edition. Ed: European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare (EDQM). Strasbourg: Council of Europe; 2017
14. Navarro Martínez-Cantulleraa, Calatayud Pinuagab M. Obtención de tejido corneal para queratoplastia. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2016; 91(10): 491–500.
15. Protocolo de obtención de tejido ocular en donantes fallecidos por parada cardiorespiratoria. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña; A Coruña.
16. Parekh M, Salvalaio G, Ferrari S, Amoureux MC, Albrecht C, Fortier D, et al. A quantitative method to evaluate the donor corneal tissue quality used in a comparative study between two hypothermic preservation media. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(4):543–54.
17. Pipparelli A, Thuret G, Toubreau D, He Z, Piselli S, Lefèvre S, et al. Pan-corneal endothelial viability assessment: Application to endothelial grafts predissected by eye banks. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):6018–25.
18. Krabcova I, Jirsova K, Bednar J. Rapid cooling of the amniotic membrane as a model system for the vitrification of posterior corneal lamellae. *Cell Tissue Bank*. 2014;15(1):165–73.
19. Elisabeth P, Hilde B, Ilse C. Eye bank issues: II. Preservation techniques: Warm versus cold storage. *Int Ophthalmol*. 2008;28(3):155–63.
20. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, Langer R, Roth AE, Church GM, et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol*. 2017;35:530–42.

21. Taylor MJ, Song YC, Brockbank KGM. Vitrification in Tissue Preservation: New Developments. En: Fuller BJ, Lane N, Benson EE, editores. *Life in the Frozen State*. Ed. CRC Press. 2004. p.603-641.
22. Brockbank KGM, Chen ZZ, Song YC. Vitrification of porcine articular cartilage. *Cryobiology*. 2010;60(2):217–21.
23. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. 2009;5:90–6.
24. Bakhach J. The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues. *Organogenesis*. 2009;5:19–26.
25. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification. *Cryobiology*. 2010;60:11–22.
26. Elliott GD, Wang S, Fuller BJ. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*. 2017;76:74–91.
27. Pegg DE. The relevance of ice crystal formation for the cryopreservation of tissues and organs. *Cryobiology*. 2010; 60(3 Suppl):S36-44.
28. Storey JM, Storey KB. Cold Hardiness and Freeze Tolerance. En : Storey KB, editores. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Ed. John Wiley & Sons. 2005. p. 473-503.
29. Bredow M, Walker VK. Ice-Binding Proteins in Plants. *Front Plant Sci*. 2017;8: 2153.
30. Storey KB, Storey JM. Molecular Physiology of Freeze Tolerance in Vertebrates. *Physiol Rev*. 2017;97(2):623–65.
31. MacRae TH. Stress tolerance during diapause and quiescence of the brine shrimp, *Artemia*. *Cell Stress Chaperones*. 2016;21(1):9-18
32. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res*. 2017;6(1):12–8.

33. Best BP. Cryoprotectant Toxicity: Facts, Issues, and Questions. *Rejuvenation Res.* 2015;18(5):422–36.
34. Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. Vol. 86, *Theriogenology*. 2016. p. 1637–44.
35. Armitage WJ, Hall SC, Routledge C. Recovery of endothelial function after vitrification of cornea at - 110°C. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(7):2160–4.
36. Wusteman MC, Simmonds J, Vaughan D, Pegg DE. Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose. *Cryobiology.* 2008;56(1):62–71.
37. Routledge C, Armitage WJ. Cryopreservation of cornea: A low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing. *Cryobiology.* 2003;46(3):277–83.
38. Madden PW, Taylor MJ, Hunt CJ, Pegg DE. The Effect of Polyvinylpyrrolidone and the Cooling Rate during Corneal Cryopreservation. *Cryobiology.* 1993;30(2):135–57.
39. Wusteman MC, Armitage JW, Wang LH, Busza AL, Pegg DE. Cryopreservation studies with porcine corneas. *Curr Eye Res.* 1999;19(3):228–33.
40. Bourne WM, Nelson LR. Human corneal studies with a vitrification solution containing dimethyl sulfoxide, formamide, and 1,2-propanediol. *Cryobiology.* 1994;31(6):522–30.
41. Brockbank KGM, Chen Z, Greene ED, Campbell LH. Vitrification of heart valve tissues. *Methods Mol Biol.* 2015;1257:399–421.
42. Area Crespo A. Criopreservación y Vitricación de Córneas Humanas [Internet]. A Coruña. Universidade da Coruña; 2016. [Acceso: 07 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/2183/17775>
43. Parekh M, Baruzzo M, Favaro E, Borroni D, Ferrari S, Ponzin D, et al. Standardizing Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Graft

- Preparation Method in the Eye Bank—Experience of 527 Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Tissues. *Cornea*. 2017;36(12):1458–66.
44. Hung S-C, Yang D-M, Chang C-F, Lin R-J, Wang J-S, Low-Tone Ho L, et al. Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16E6/E7 genes. *Int J Cancer*. 2004;110(3):313–9.
  45. Romano V, Parekh M, Ruzza A, Willoughby CE, Ferrari S, Ponzin D, et al. Comparison of preservation and transportation protocols for preloaded Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 2018;102(4):549–55.
  46. Gauthier AS, Garcin T, Thuret G, He Z, Jullienne R, Trone MC, et al. Very early endothelial cell loss after penetrating keratoplasty with organ-cultured corneas. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(8):1113–8.
  47. Bhogal M, Balda MS, Matter K, Allan BD. Global cell-by-cell evaluation of endothelial viability after two methods of graft preparation in Descemet membrane endothelial keratoplasty. *Br J Ophthalmol*. 2016;100(4):572–8.
  48. Wolle MA, Demill DL, Johnson L, Lentz SI, Woodward MA, Mian SI. Quantitative Analysis of Endothelial Cell Loss in Preloaded Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty Grafts. *Cornea*. 2017;36(11):1295–301.
  49. Steinhardt RA, Alderton JM. Poloxamer 188 enhances endothelial cell survival in bovine corneas in cold storage. *Cornea*. 2006;25(7):839–44.
  50. Ebertz SL, McGann LE. Cryoinjury in endothelial cell monolayers. *Cryobiology*. 2004;49(1):37–44.
  51. Wusteman MC, Boylan S, Pegg DE. Cryopreservation of rabbit corneas in dimethyl sulfoxide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1997;38(10):1934–43.

52. Van DL, Debruin J, Edelhauser HF. Functional and Ultrastructural Changes in Cryopreserved Corneas. Arch Ophtalmol. 1973;90:312–8.

## 12. Anexos

### 12.1. Informe del Comité de Ética de la Investigación (CEI)



**XUNTA DE GALICIA**  
CONSELLERÍA DE SANIDADE  
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica  
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia  
Secretaría Xeral. Consellería de Sanidade  
Edificio Administrativo San Lázaro  
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA  
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

#### DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE A CORUÑA-FERROL

Sonia Pértega Díaz, Vicesecretaria del Comité de Ética de Investigación de A Coruña-Ferrol

#### CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 17/04/18 el estudio:

**Título:** Regeneración endotelial corneal: células madre endoteliales y proliferación celular endotelial.

**Promotor:** Silvia M.ª Díaz Prado

**Enmienda:** enmienda nº1

**Código del Promotor:**

**Código de Registro:** 2017/594

Y que este Comité emite un **INFORME FAVORABLE** de conformidad con sus procedimientos normalizados de trabajo y tomando en cuenta los requisitos éticos, metodológicos y legales exigibles a los estudios de investigación con seres humanos, sus muestras o registros, que dicha enmienda sea incorporada al estudio de investigación que se está realizando en los centros aprobados.

**Y HACE CONSTAR QUE:**

1. El Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol cumple los requisitos legales vigentes (Ley 14/2007 de Investigación Biomédica y el Decreto 63/2013 por el que se regulan los comités de ética de investigación en Galicia).

2. La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de A Coruña-Ferrol es:

**Lucía Fuster Sanjurjo (Presidenta).** Farmacéutica. Especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada Ferrol

**Angel Lopez-Silvarrey Varela. (Vicepresidente).** Médico especialista en Pediatría. Área de Gestión Integrada A Coruña

**Natalia Cal Purriños. (Secretaria).** Licenciada en Derecho. Fundación “Profesor Novoa Santos”. A Coruña

**Sonia Pértega Díaz. (Vicesecretaria).** Matemática. Área de Gestión Integrada A Coruña

**Juana M<sup>a</sup> Cruz del Río.** Trabajadora social. Consellería de Sanidad

**Portal González Lorenzo.** Médica especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada Ferrol

**Begoña Graña Suárez.** Médica especialista en Oncología Médica. Área de Gestión Integrada A Coruña

**Carmen Mella Pérez.** Médica especialista en Medicina Interna. Área de Gestión Integrada Ferrol

**Alejandro Pazos Sierra.** Médico. Universidad de A Coruña

**Gonzalo Peña Pérez.** Médico especialista en Cardiología. Hospital de San Rafael. A Coruña

**Carlos Rodríguez Moreno.** Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada Santiago

**José M<sup>a</sup> Rumbo Prieto.** Diplomado en Enfermería. Área de Gestión Integrada Ferrol

**María Isabel Sastre Gervás.** Farmacéutica Atención Primaria. Área de Gestión Integrada A Coruña

Para que conste donde proceda y a petición del promotor / investigador, en A Coruña

La Vicesecretaria

PERTEGA  
DIAZ, SONIA  
(AUTENTICACIÓN)

Firmado digitalmente por PERTEGA  
DIAZ, SONIA (AUTENTICACION)  
Nombre de reconocimiento (DN):  
c=ES, serialNumber=72596773W,  
sn=PERTEGA, givenName=SONIA,  
co=PERTEGA DIAZ, SONIA  
(AUTENTICACION)  
Fecha: 2018.04.26 11:40:55 +02'00'



## 12.2. Difusión de resultados

**“V Jornadas de Investigación BioIntegraSaúde 2015”** organizadas por el Instituto de Investigación Biomedica de Ourense, Pontevedra y Vigo (IBI), Instituto de Investigación Biomedica de A Coruña (INIBIC) e Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS) el día 29 de mayo de 2018. **Comunicación tipo póster.** Título: Detección de viabilidad celular sobre endotelio corneal. Autores: **Rodríguez-Fernández S**, Álvarez-Portela M, Rendal-Vázquez MA, Montero-Salinas A, Piñeiro-Ramil M, Castro-Viñuelas R, de Rojas MV, Sánchez-Ibáñez J, Fuentes-Boquete IM, Díaz-Prado S.

**“II Annual Meeting CINBIO: Novel methods for diagnosis and therapy in biomedicine”** organizadas por el Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO) de la Universidad de Vigo (UVi) el día 25-26 de junio de 2018. **Aceptación de Comunicación tipo póster.** Título: Cell viability assay in corneal endothelium. Autores: **Rodríguez-Fernández S**, Álvarez-Portela M, Rendal-Vázquez MA, Montero-Salinas A, Piñeiro-Ramil M, Castro-Viñuelas R, de Rojas MV, Sánchez-Ibáñez J, Fuentes-Boquete IM, Díaz-Prado S.