

SIGNIFICATIVA PROLONGACIÓN DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN DE LA CÓRNEA MANTENIENDO SUS TENSIONES Y CURVATURA NATURALES

Roque Alejandro Maffrand* Sofía Parisi de Fabro

Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba

Resumen

El logro de trasplantes de córnea exitosos ha sido preocupación constante de los investigadores dedicados a identificar factores de riesgo, que van desde la técnica quirúrgica propiamente dicha hasta los diversos procedimientos de almacenamiento de tejidos, como los que llevan a cabo los modernos laboratorios llamados bancos de ojos. No obstante, las investigaciones integrales son escasas y continúan enfatizando la conservación del material donante en medios de cultivos que aseguran como máximo hasta cuatro días de viabilidad de dicho tejido.

Este trabajo tuvo como finalidad el mejoramiento de la calidad del tejido corneal donante, considerando que el mantenimiento de las tensiones y curvatura naturales de la córnea y el medio de nutrición en la etapa de conservación, son factores importantes que coadyuvan para la preservación de las características tisulares normales de esta estructura.

Se llevaron a cabo experiencias con conejos según un diseño de grupos experimentales secuenciales, en los cuales el estudio del comportamiento de cuatro parámetros de viabilidad, bajo diferentes medios de conservación y en función del tiempo, se dividió en cuatro grandes bloques. Dos de ellos correspondieron a los experimentos quirúrgicos para la evaluación de trasplantes de córneas conservadas y provenientes de los dos primeros grupos, y al estudio temporal de los parámetros de viabilidad para un método de conservación desarrollado y propuesto como alternativo, en el que se prioriza el mantenimiento de las tensiones y curvatura naturales de la córnea como así también su hidratación y nutrición.

Los resultados indicaron que el mantenimiento de las tensiones naturales del tejido corneal es un factor determinante en el proce-

so de conservación del mismo, conduciendo por ende a su viabilidad con vistas a su utilización en trasplantes. Dado que el sistema creado para la implementación del último bloque de grupos experimentales es, además, de fácil manipulación, este estudio significa también un aporte metodológico significativo para la etapa de almacenamiento y manejo del material biológico en el trasplante de córneas.

Palabras claves: córnea, medios de conservación, tiempo, tensiones, curvatura, sistema de bastidor, trasplante.

Abstract

The success of cornea transplantations has always been a concern of world researchers to identify risk factors from the proper surgical techniques up to the several tissue storage procedures, such as the ones used in the new laboratories called eyes banks. However, the integral research works are still limited at present and they continue putting emphasis in the donor cornea storage that guarantee up to for this tissue feasibility.

This research had the aim to contribute to the improvement of the corneal tissue quality taking into account the maintenance of its natural curvature and tensions combining them with some standard preservation solutions. This was achieved by means of a new mechanical system.

Assays with rabbits were designed according to a sequential experimental groups design. In these ones, the study of the feasibility parameters behavior under different conservation media, related to the time, was splitted into four blocks. The first and second ones attended the cornea conservation in the short and intermediate-terms culture mediums

Correspondencia dirigida al autor:

R.A. Maffrand - Caseros 10,1° "C" - Córdoba (5000). Rep. Argentina - e-mail: rmaffrand@cordoba.com.ar

as the ones at 4° C degree isolated cornea preservation and the usual ones such as the Mc Carey Kaufman, Optisol and Likorol solutions used in the eyes banks. The third one was designed for the surgical assays coming from the two named groups and the last one focused the time study of these parameters for a new conservation technique, developed as an alternative medium to keep the cornea tissue curvatures and tensions as well as its nutrition and hydration.

The results showed that tissue natural tensions maintenance is an significant factor in the conservation process, which involve the cornea feasibility for the its use in future transplantations. Since the new developed technique is very simple, this study is considered to be a significant contribution for the storage and biological material handling steps.

Key Words: Cornea conservations, media, time tensions, curvature trame sistem transplant.

Introducción

La conservación de tejidos, con vistas al logro de trasplantes exitosos, ha sido preocupación de numerosos investigadores que, desde fines del siglo pasado hasta nuestros días, han propuesto diferentes metodologías que permitan mantener la viabilidad de los mismos. No obstante los múltiples esfuerzos realizados, aún hoy esta problemática existe. (6, 9)

El trasplante de córnea fue encontrado en la literatura del siglo XVIII y realizado experimentalmente, en animales, en el siglo XIX. Específicamente, se le atribuye a Zirm, en el año 1905, la realización del primer trasplante corneal penetrante exitoso. Filatov (1935) mostró que el tejido de cadáver almacenado a 4°C podía ser usado como material donante. Este adelanto elevó en gran medida el número de ojos para almacenar y distribuir. (13)

A mediados de los años setenta surgieron los primeros reportes de las transmisiones de enfermedades a través del tejido donante a receptores sanos. Estos desarrollos crearon la necesidad de establecer estándares que aseguraran a los cirujanos y a sus pacientes un tejido de mayor calidad (Castroviejo, 1964; Doughman, 1997; Griffith, 1990). (7, 11, 14)

La córnea, con sus excepcionales características de transparencia y dureza, su trascendente rol en la visión, su función en los mecanismos de la óptica ocular, su gran significación como causante de la ceguera en el mundo y tantos otros aspectos, se constituye en una interesante y a la vez difícil temática a encarar. La dispersa y variada bibliografía, la realización de experiencias de controvertidas interpretaciones y los hallazgos clínicos contradictorios; hacen necesario abordar nuevos experimentos que permitan mejorar los resultados avanzando a la luz de nuevos conceptos y sistematizando los factores concurrentes, para obtener datos significativamente confiables.

En dicho proceso adquiere especial interés la conservación, ya que es una de las principales causas reconocidas que limitan la realización y el éxito del trasplante de córnea. Kenneth (1997) presenta una síntesis de las diversas sustancias, mezclas de conservación, tratamientos térmicos, recipientes herméticos, etc. propuestos en la bibliografía, no lográndose hasta la fecha éxitos razonables en la conservación a más de 15 días de la extracción de la córnea. Asimismo, es de destacar la escasa frecuencia de investigaciones integrales, esto es, estudios que abarquen todos los procedimientos. (17)

Citado por Lindstrom *et al.* (1990), Stocker en 1953 publicó su clásico tratado sobre el rol crucial que el endotelio juega en el mantenimiento de la transparencia corneal y Harris & Nordquist (1955) en el cambio de la temperatura de hidratación corneal, demostrando que este parámetro podía mantener su función mediante el almacenamiento a 4°C. (15, 19)

El uso de soluciones cryoprotectoras surgió para dar respuesta a la limitación de la viabilidad endotelial, cuyo potencial daño resulta del contacto con el iris al colapsar la cámara anterior durante la extirpación del segmento corneo-escleral (Bourne, 1986) (5). Si bien esta técnica tiene la ventaja de extirpar el endotelio desde el acuoso *post-mortem*, es un procedimiento complicado, que requiere de técnicos con entrenamiento específico y un equipo costoso (Sulewsky *et al.*, 1997). Esto sumado al hecho que el descongelamiento del tejido, realizado en el momento de la cirugía, es una etapa crítica y compleja, en la que se pueden dañar las células endoteliales, ha llevado a

que hoy, este método de conservación, sea poco utilizado.

Como criterios rectores para la preservación ideal de la córnea pueden mencionarse: el mantenimiento de la viabilidad endotelial y epitelial; la evaluación de dicha viabilidad; el mantenimiento de la córnea delgada y clara durante la preservación y la posibilidad de un tiempo ilimitado de preservación. Como así también asegurar la esterilización, permitir su transporte; ofrecer simplicidad técnica y proveer un tejido útil para la queratoplastia lamelar o queratoplastia penetrante (Doughman, 1997).(11)

En función de la problemática descrita y teniendo como hipótesis general que el mantenimiento de las tensiones y curvatura originales de la córnea durante su conservación tienen efectos positivos respecto a su viabilidad para ser usada en trasplantes, el presente trabajo tuvo como **objetivo general** determinar un método de conservación que permita prolongar la viabilidad del tejido corneal con vistas a su utilización en trasplante. Para tal fin, fueron establecidos los siguientes **objetivos específicos**: identificar los factores que influyen en la pérdida de la vitalidad y transparencia del tejido corneal *in vitro* e *in vivo*; establecer el comportamiento de los tejidos corneales utilizando diferentes combinaciones de los métodos habituales de conservación que se recomiendan en la literatura (17, 29); evaluar la importancia del mantenimiento de las tensiones y curvatura natural de la córnea para evitar la pérdida de su viabilidad; y diseñar un método que permita la manipulación de córneas teniendo en cuenta los principales factores que afectan la conservación de las mismas.

El método de experimentación-observación fue diseñado en unidades experimentales secuenciales de forma de conseguir evaluar temporal y progresivamente los parámetros (considerados) de viabilidad de los estratos corneales en conejos. En dicha evaluación fueron comparados diversos tratamientos, originados por combinaciones de término de almacenamiento y uso de un sistema desarrollado para la manipulación del tejido corneal. Como tratamientos de término corto fueron seleccionados los medios de conservación en cámara húmeda a 4° C, usada exitosamente por Filatov en 1934 (13) y el desarrollado por Bernand Mc

Carey y Herbert Kaufman (30). Los medios de cultivos Likorol y Optisol (5, 10, 18), fueron elegidos como de término intermedio.

Dado que uno de los principales problemas que se plantean en los procedimientos quirúrgicos de trasplante es el de la conservación de los órganos o tejidos que se habrán de utilizar, resulta de suma importancia mantener el material orgánico en las mejores condiciones posibles dado que el tiempo transcurrido desde el momento de su obtención hasta el de su utilización puede hacer fracasar el resultado de la intervención (Nartey *et al.*, 1990; Lass *et al.*, 1992). (18, 22)

El citado lapso no sólo está dado por el tiempo necesario para trasladar el material desde el lugar de la obtención hasta el del efectivo uso, sino también por el empleado en obtener datos del donante y del receptor, el destinado a todos los estudios necesarios para minimizar los problemas tanto de rechazo e incompatibilidad como de transmisión de enfermedades, y el utilizado para elegir y preparar al receptor.

Una vez que es retirado el órgano o tejido del cuerpo del donante, en forma inmediata comienza el proceso de descomposición del mismo, al que se le suma otro proceso importante, el de la pérdida de tensiones del tejido. Esta ausencia de las tensiones normales del tejido vivo, juntamente con el mencionado proceso de descomposición, determina que los términos relativos a su manipulación y conservación sean perentorios (Delbosc & Piquot, 1989).

Con la finalidad de preservar los tejidos y órganos extraídos de un donante se utilizan diferentes métodos, como por ejemplo el de la congelación, pero como ello produce alteraciones importantes, no resulta viable en todos los casos (Lindstrom, 1990), por lo que se recurre a la utilización de productos conservantes y/o al control de variables como la temperatura, presión, luminosidad y oxidación (Seedor *et al.*, 1987). (19, 26)

Con la finalidad de contar con un elemento que permitiera conservar y transportar córneas, preservándolos para su posterior utilización en trasplantes, este trabajo contribuye con la propuesta de un mecanismo novedoso de conservación basado en el diseño de un "bastidor" que permite, además, el transporte del material biológico.

Para realizar un estudio comparativo y así poder cotejar los resultados obtenidos es que se efectuaron las pruebas de extracción y conservación de globos oculares y córneas con los sistemas habituales y con éste propuesto.

Las pruebas se realizaron almacenando y conservando las córneas como lo aconsejan la práctica y la teoría médica actual, por una parte y utilizando la metodología y bastidor propuestos en el presente trabajo, por la otra.

Materiales y Métodos

El presente estudio se realizó utilizando como animales de laboratorio conejos (*Oryctolagus Cuniculus*), mantenidos y tratados en el bioterio de la II Cátedra de Histología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Las jaulas utilizadas para mantener estos animales fueron del tipo "Conejera Individual" y para su alimentación se escogió un producto balanceado que se comercializa como "Conejo Terminación", el cual suministra una dieta equilibrada, rica en energía, permitiendo a los animales mantener un excelente estado corporal.

Para cada experiencia se utilizaron grupos de entre 2 y 6 animales, totalizando para todas las experiencias 61 animales.

En la etapa de evaluación de tejidos, durante los diferentes procedimientos de mantenimiento, y hasta el momento de proceder al trasplante, fueron usadas técnicas de observación del estado de las córneas con biomicroscopio (lámpara de Hendidura Haig Staig 900) (Martonyi *et al.*, 1984). (21)

Con el objeto de reconocer y documentar el comportamiento del tejido corneal del conejo se utilizaron los métodos de conservación que se emplean en los bancos de ojos (Brightbill, 1993; Costa Vila *et al.*, 1995). (9) El esquema de valoración consistió en la observación del estado del epitelio y de la evolución del edema del parénquima corneal, el cual se pone de manifiesto por un aumento paulatino en su espesor y opacidad; en el seguimiento de la formación de pliegues de la membrana de Descemet, los cuales son de aparición más temprana en el centro que en la periferia; en la observación del estado del endotelio; en el con-

trol de la profundidad de la cámara anterior, la cual se reduce diariamente; y en el registro de todos aquellos aspectos que pudieran aportar otros indicios acerca del estado del tejido, como por ejemplo presencia de pigmentaciones y/o lesiones, aspecto de la conjuntiva, etc. (Arentsen, 1990). (2)

El estudio Citológico e Histológico fue llevado a cabo mediante microscopía óptica, realizándose cortes seriados del material de 5 mm. de espesor y utilizándose las técnicas de coloración que sugiere Samar & Ávila (1991). (25) El estudio ultraestructural, a través de microscopía electrónica fue usado para reconocer las modificaciones ultraestructurales que se producen durante la conservación de los tejidos a ser empleados posteriormente en los trasplantes. Esta etapa se subdividió en tres fases: cuatro horas en una mezcla de partes iguales de araldita y acetona 100%; pre-inclusión durante 24 horas; e inclusión final en araldita a 60°C durante 24 horas.

Las secciones fueron obtenidas en un ultramicrotomo Porter Blum Mt2. Cortes gruesos de 0,5-1 μ fueron coloreados con azul de toluidina 1% en solución acuosa de borato de sodio 1% y observados en el microscopio fotónico a los efectos de seleccionar áreas para microscopía electrónica. Las secciones finas, de 60-80 nm., fueron contrastadas con acetato de uranilo de plomo. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 101 a 80 Kv a magnificaciones que variaron entre 2000 y 8000X.

Para esta etapa se utilizaron los siguientes medios y procedimientos:

a) Cámara húmeda, conforme a lo propuesto por Barraquer & Rutllán (1982) (4) y Torres de Cardena *et al.* (1988), (29) conteniendo además un soporte de sostén para el globo ocular. Este soporte fue implementado con el objetivo de evitar el contacto con el algodón y con las paredes del frasco. Se utilizó una tapa permeable para dicho frasco, con pequeñas perforaciones protegidas con gasas para el paso de oxígeno.

b) Medios de Cultivo: Primero de Mc Carey Kaufman modificado, preparado por la Farmacia Methodist del Hospital de Houston, Texas 77030. Según sus fabricantes, este me-

dio puede conservar la córnea viable entre 3 a 4 días y hasta un máximo de 7 días (Capella et al., 1965; Waltman & Kaufman, 1970) (30); **Segundo** Likorol, el cual consiste en un medio nutritivo para la conservación de córneas a 4°C. Según sus fabricantes este medio puede conservar la córnea viable un máximo de 14 días (Piquot et al., 1990) (24); **Tercero** Optisol, para conservación de córneas también a 4°C

Los procedimientos se realizaron con microscopio quirúrgico Topcon OMS90. El material quirúrgico que fue requerido para los mismos constó de trépanos de Sais y Barron, porta agujas, pinza con diente delicada, sistema de guillotina para el corte de material donante, porta hojas de afeitar, tijeras de córnea y pinzas sin diente tirahilos.

El desarrollo de este trabajo fue programado en etapas secuenciales, denominadas **grupos experimentales** (Sokal & Rolph, 1983) (27), abarcando desde la valoración de las modificaciones del objeto de estudio a partir de la muerte, observando el desarrollo del estado del mismo con las distintas técnicas en tiempos sucesivos, luego de realizados los trasplantes.

El procedimiento de anestesia para los trasplantes fue establecido a partir de algunas observaciones preliminares (serie de experimentos) efectuadas en un subconjunto de animales (Avery, 1983) (3). El mismo pudo considerarse muy satisfactorio ya que, además de sencillo, logró la inmovilidad necesaria para realizar la microcirugía. El tiempo de anestesia resultó suficiente siendo la dosis regulable de acuerdo a los requerimientos. La sobrevivencia de los animales fue del 100%, manteniéndose estabilidad cardío-vascular y respiratoria, lo cual permitió evaluar el resultado del trasplante al cabo de 30 días o más.

Las drogas utilizadas se basaron en lo sugerido por Adamns (1973) (1) y Ceraso et al. (1980)(3). Kangas et al. (1990)(16) realizan una descripción de las propiedades físicas y farmacológicas de las mismas. La vía de administración utilizada fue la intramuscular, dividiendo los 10 mililitros empleados en cuatro aplicaciones de 2,5 mililitros una en cada pata, empezando por las traseras, en la región del muslo, para pasar luego a las delanteras. A su vez, se apoyó la analgesia, instilando localmente, previo a la trepanación y durante la cirugía,

evitando su contacto con el endotelio, una gota de un anestésico local, el Clorhidrato de Proparacafina 0,5% (Anestalcón). Se obtuvo un tiempo promedio de anestesia confortable (v.g. el animal inmóvil) de 40-50 minutos luego de la primera dosis que fue suficiente en la mayoría de los procedimientos.

A continuación se describen los mencionados grupos experimentales (GE) para el desarrollo de este estudio. Cabe señalar que dichos grupos representan pruebas, en las cuales se unificó la utilización de los medios de cultivo y los productos conservantes, con el fin de observar que la existencia de diferencias significativas en los resultados sean exclusivamente por la utilización del sistema propuesto como alternativo para abordar la problemática que este trabajo trata. Dicho sistema también será presentado en esta sección.

GE 0: Puesta a punto del material experimental – Prueba Piloto de valoración de las modificaciones de las capas de la córnea en el desarrollo.

El objetivo fue establecer criterios para la selección del material experimental, en función de los requerimientos biológicos y metodológicos. Con los animales disponibles, con peso entre 1.200 y 2.000 gramos, se observó dificultad para la valoración de la estructura de la córnea en aquellos con peso inferior a 1.500 gr. ya que la misma no presenta un completo desarrollo.

Por otro lado, la utilización de animales de raza neozelandesa y californiana, que poseen pelo blanco facilitó la observación de los parámetros de viabilidad seleccionados, para el seguimiento de las modificaciones del tejido corneal. En animales adquiridos con peso superior a 1.500 gr. se constató, en algunos de ellos, presencia de ulceraciones periféricas con vascularización anormal originadas¹ por un estado de malnutrición.

Se estableció entonces como población de estudio, animales blancos adquiridos con peso inferior a 500gr. y alimentados con dieta balanceada y controlada, hasta que evidenciaran buen desarrollo e integridad de sus tejidos corneales.

1 Consultas previas a Médicos Veterinarios.

A los fines de investigar la existencia de diferencias en los distintos estratos de la córnea según la edad y el peso de los animales, se sacrificaron, por desnucamiento, 4 animales de distinto peso, correspondiendo a edades de treinta (500 gr.), sesenta (1.000 gr.), noventa (1.500 gr.) y ciento veinte (2.000 gr.) días, respectivamente. Se extrajeron los globos oculares de cada uno de ellos y se fijó en formol 10% uno de los ojos de cada conejo, procediéndose a fijar la córnea del otro ojo, separada del resto del globo, en el mismo acto. A las 72 horas de fijación se procesaron los materiales para su observación histológica.

GE I: Valoración de los estratos corneales en córnea aislada conservada en cámara húmeda.

Se sacrificaron dos conejos y se realizó la enucleación separando las córneas del resto del globo ocular, las cuales fueron colocadas en cámara húmeda. La observación y fijación de dos córneas fue realizada a las 12 horas. Las dos restantes fueron observadas a las 24 horas.

GE II: Estudio de la viabilidad de la córnea en ojos enucleados en tiempos progresivos de animales conservados enteros a 4° C.

Se sacrificaron dos animales a los cuales se los colocó en refrigerador a 4°C., realizándose las observaciones y fijación del tejido en formol 10% a las 24 y 48 horas, respectivamente.

GE III: Valoración de los estratos corneales en estadios de conservación progresivos conservando los globos oculares completos en cámara húmeda

Para evaluar las modificaciones que se producen en los estratos de la córnea durante la conservación en cámara húmeda, se sacrificaron 5 animales, extrayéndoseles sus globos oculares. Los mismos fueron colocados en cámaras húmedas individuales y fijados en formol 10%, en lotes de dos. Luego de 12, 48, 72, 96 y 120 horas se realizaron las observaciones de los parámetros de viabilidad. Los globos oculares enteros fueron incluidos en parafina y observados a través de cortes con diversas coloraciones.

GE IV-V-VI: Valoración de las modificaciones producidas en tiempos progresivos durante la conservación en diferentes medios de cultivo.

Para evaluar las modificaciones producidas durante la conservación en medio de cultivo, se sacrificaron 8 animales. Los globos oculares fueron enucleados y separadas sus córneas, las cuales se colocaron individualmente en medio de cultivo Mc. Carey Kaufman (GE III), Likorol (GE IV) y Optisol (GE V) en frascos de 10 ml. La distribución de las córneas fue de ocho, cuatro, y cuatro respectivamente para cada grupo experimental.

La conservación fue realizada en refrigerador a 4°C, efectuando la fijación de las córneas en formol 10% durante 72 horas. Luego de 12, 24, 48, 72 y 96 horas de permanencia en el medio, se procesaron las mismas con inclusión en parafina, observados luego de cortes y a diversas coloraciones. Los medios de cultivo Optisol y Likorol fueron evaluados también a las 144 horas.

GE VII: Estudio por microscopía electrónica de las modificaciones en la estructura de las fibras del parénquima corneal.

Con el objetivo de estudiar cómo se producen las modificaciones en las fibras del parénquima corneal, un animal fue sacrificado extrayéndosele tejido de la zona paracentral. El ojo restante fue mantenido durante 24 horas en cámara húmeda y se le extrajo tejido de la zona paracentral, igual que al primero, para su procesamiento. Ambos fueron estudiados a través de microscopía electrónica.

GE VIII (A, B y C): Propuesta y Evaluación de tres procedimientos procurando mantener las curvaturas normales de la córnea.

Procedimiento A: se sacrificaron dos animales cuyos ojos, una vez enucleados fueron colocados en cámara húmeda. Se procedió a la colocación de dos gotas del medio de cultivo cada seis horas. Su fijación y las observaciones fueron realizadas a las 24, 48, 72, 96, 120, 142 y 166 horas.

Procedimiento B: Tomando en consideración los efectos perjudiciales que producen los tejidos uveales para el mantenimiento de la viabilidad de la córnea (Doughman, 1997; Mc Kinnon & Walters, 1976) (11), se desarrolló un sistema de "doble anillo con púas" que permite un sostén, a manera de bastidor, de la córnea. Se sacrificaron dos animales, se enuclearon sus ojos y se utilizó el citado sistema para sostener las cuatro córneas sumergi-

das en el medio de cultivo a 4°C. Las observaciones fueron realizadas a las 24, 48, 72, 96, 120 y 142 horas.

Procedimiento C: Teniendo presente la hipótesis planteada en este trabajo, esta etapa de experimentación fue llevada a cabo con el objetivo de mantener las curvaturas y las tensiones que naturalmente tiene la córnea. Aprovechando los beneficios de los medios de cultivo, se desarrolló un sistema de campana, sostenido por un sistema de resortes al doble anillo de púas (cuya presentación como así también sus características se describirán al final de esta sección), el cual permite mantener la tensión que normalmente tiene el globo ocular del conejo.

Se sacrificaron tres animales a los cuales se enuclearon los ojos mateniéndose sus córneas inmersas en medio de cultivo a 4°C y sujetas con este sistema. Las observaciones se realizaron diariamente hasta el día veinticinco.

GE IX: Verificación de la viabilidad de las córneas a través del trasplante durante el desarrollo de los distintos procedimientos de valoración.

Se llevaron a cabo operaciones con córneas frescas (entre tres y cuatro horas de conservación en cámara húmeda a 4°C), en cuatro animales, controlando los siguientes factores y sus respectivos niveles (Fernandez Meijide, 1992)(12): suturas: seda, 9-0, nylon, 9-0/10-0; modalidad: puntos separados, sutura continúa; tamaño de la trepanación en el receptor: 5,5; 6 y 7; tamaño del botón: 6; 6,5 y 7,5mm. De diámetro; medicación: antibióticos y corticoides locales.

Para el resto de los procedimientos que se describen a continuación se establecieron: sutura: Nylon 9-0 y 10-0, descartándose la seda dado que puede producir inflamación y atraer los vasos; modalidad: para realizar los cuatro puntos iniciales de posicionamiento del botón se utilizó nylon 9-0 ya que la trepanación en el receptor se agranda por dilatación de la abertura. El resto se completó con ocho puntos separados de nylon 10-0; tamaño de la trepanación del receptor: se utilizaron trepanaciones de 5,5; tamaño del botón: se seleccionó un botón de 6mm. de diámetro.

Previo a la cirugía, se colocó Pilocarpina y Dexametasona cada ocho horas durante los

dos días previos a la misma, con el fin de evitar la importante reacción fibrinosa que se produce en los ojos del conejo durante la cirugía. En la etapa post-quirúrgica se mantuvo sólo medicación local, consistente en Tobramicina y Dexametasona cada ocho horas.

Durante el procedimiento se utilizó Healon, previo a la trepanación, el cual se introdujo en la cámara anterior por paracentesis hasta armarla.

Con la metodología descrita se realizaron veintiuna operaciones utilizando para cada procedimiento hasta tres animales y estableciéndose como primer control a los cinco días después de la cirugía.

Transplantes Grupo I

1. **Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C durante 48 horas:** se mantuvieron los animales hasta treinta días después de la cirugía.
2. **Córneas conservadas a cámara húmeda a 4°C durante 72 horas.:** se mantuvieron los animales durante 15 días.

Transplante Grupo IV

1. **Córneas conservadas en medios de cultivo de Mc Carey Kaufman a 4°C durante 72 horas:** se mantuvieron los animales durante 30 días.
2. **Córneas conservadas en medios de cultivo de Mc Carey Kaufman a 4°C durante 96 horas:** se mantuvieron los animales 15 días.

Transplante Grupo V(a)

1. **Córneas conservadas en medio de cultivo Likorol, a 4°C durante 96 horas:** se mantuvieron los animales durante 30 días.
2. **Córneas conservadas en medio de cultivo Likorol, a 4°C durante 120 horas:** se mantuvieron los animales durante 10 días.

Transplante Grupo V(b)

1. **Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C en medio de cultivo Likorol co-**

locando gotas cada 6 horas sobre la córnea, durante 96 horas: a los fines de valorar la importancia de la nutrición del tejido y la conservación de su curvatura, se sacrificaron 2 animales, procediéndose a la extracción de sus globos oculares, los cuales se colocaron en cámara húmeda individual, en refrigerador a 4°C. Gotas de medio de cultivo Likorol fueron aplicadas cada 6 horas. Luego de 96 horas de conservación fueron realizados los trasplantes. Los animales transplantados fueron mantenidos durante 20 días.

- 2. Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C en medio de cultivo Likorol colocando gotas cada 6 horas sobre la córnea, durante 120 horas:** una de las córneas conservadas 120 horas fue transplantada. Se mantuvo al animal durante 15 días.

Transplante Grupo VIII

- 1. Córneas sujetadas con el sistema desarrollado para mantener las tensiones en medio de cultivo Likorol, a 4°C durante 10 días:** córneas de tres animales, que fueron separadas con el sistema propuesto, fueron transplantadas. Los animales se mantuvieron durante 30 días luego de la cirugía.
- 2. Córneas sujetadas con el sistema ideado de doble anillo y campana de mantención de las tensiones en medio de cultivo desarrollado Likorol:** con el sistema desarrollado se realizaron los trasplantes en tres animales.

-Descripción del sistema

El sistema propuesto en este trabajo consiste básicamente en un bastidor, el cual fue diseñado con el objetivo de permitir el retardo de las retracciones tisulares cadavéricas; evitar las deformaciones producidas por la manipulación con los métodos y elementos tradicionales; y posibilitar el examen bajo microscopio del órgano o tejido sujeto, todas las veces que se crea oportuno, sin que ello afecte a dicho tejido. El mismo puede observarse en la Figura 1.

Este dispositivo está compuesto por dos piezas de fijación de forma anular, una interna y otra externa, portadoras de una pluralidad de elementos longiformes de punta aguzada (púas) y un elemento capaz de trabar la posición relativa de una de las piezas con respecto a la otra. Las púas se disponen en forma angular respecto de uno de los bordes del anillo de fijación respectivo y se orientan en sentido opuesto a los del otro anillo de fijación. Un mecanismo de ajuste y un cono de infusión completan el bastidor propuesto. Esta pieza de ajuste se enrosca al cono de infusión permitiendo variar la presión ejercida por sus resortes laterales. La pieza de fijación interna posee un resalto en su superficie interna que configura un tope en el que apoya un cono de infusión constituido por dos porciones cilíndricas, una inferior, que apoya en el resalto y otra superior de diámetro reducido, la cual presenta un paso de rosca fileteado en su cara exterior.

Existe una tercera pieza de ajuste constituida por un cuerpo anular, provisto en su cara interna de un paso de rosca concordante con el citado de la porción superior del cono de infusión, sobre el cual puede roscarse, y que en su cara exterior posee cuatro resortes que se fijan a la superficie externa del anillo de fijación externo. Al enroscarse o desenroscarse sobre la porción superior del cono de infusión permite aumentar o disminuir la presión ejercida sobre la córnea, punto que se mantiene merced a la tensión de los resortes, una vez que éstos han sido fijados a las barras dispuestas en el anillo de fijación externo.

A su vez, el extremo superior del cono de infusión permite la ubicación de un tubo por el que se puede hacer pasar líquido conservante que, por ser huecas ambas porciones (la superior y la inferior) de dicho cono, entra en íntimo contacto con el tejido corneal. La Figura 2 muestra la conexión del tubo que permite la infusión permanente del medio de cultivo elegido sobre la cara interna de la córnea.

El material seleccionado para la construcción del bastidor fue el bronce por su maleabilidad, aunque se reconoce que podría ser más adecuado el plástico, el acero inoxidable, el platino u otro material inerte.

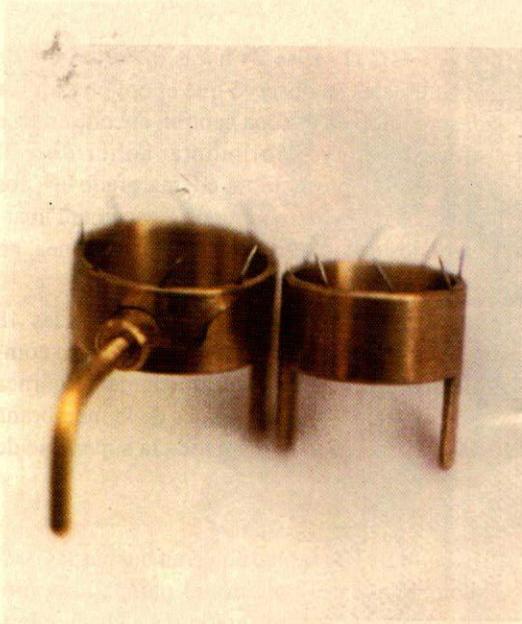


Figura 1: Bastidor consistente en un doble anillo de púas.

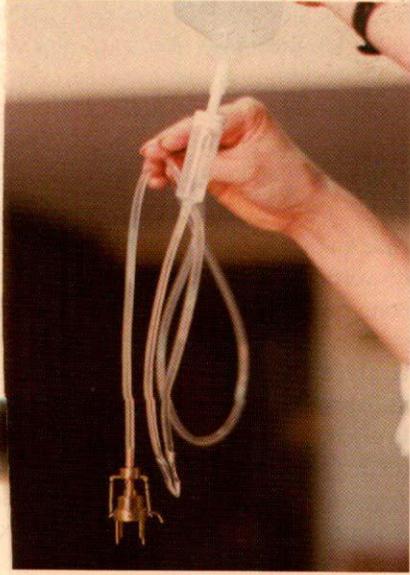


Figura 2: Sistema preparado para infundir el medio de cultivo.

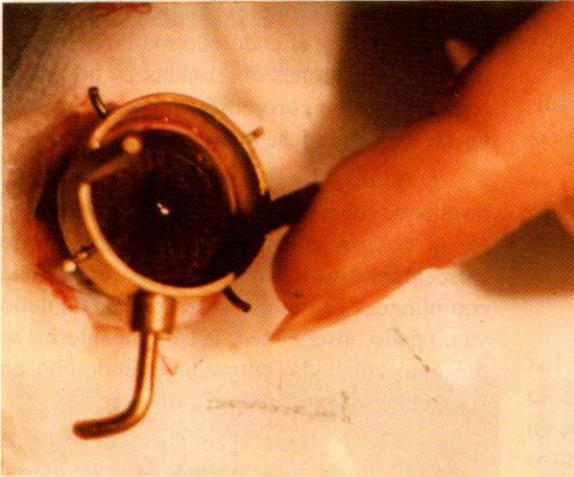


Figura 3: Bastidor fijado a la córnea de un conejo.

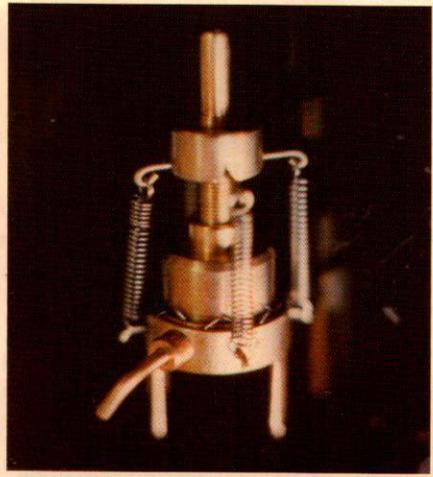


Figura 4a: Córnea retenida por el sistema desarrollado.

Para hacer funcionar el bastidor, se deben clavar las púas de ambos anillos de fijación (el interno y el externo) en el limbo corneal o un poco por fuera del mismo, en la esclerótica, y rotar en sentido opuesto valiéndose para ello de los brazos que se proyectan desde los bordes opuestos a los que alojan las púas. La Figura 3 permite observar el bastidor fijado al globo ocular habiendo "capturado" la córnea.

Conseguida la tensión deseada, ambos anillos se inmovilizan mediante el mecanismo de traba. Luego, se corta con el bisturí la córnea tomando los brazos de los anillos de fijación y tirando de ellos y se retiran los tejidos uveales (iris y cuerpo ciliar) del anillo escleral, traccionándolos con una pinza. Merced a la presión que se logra, se pueden realizar los cortes o incisiones sin que se produzcan

plegamientos perjudiciales para la integridad del tejido. La córnea queda así retenida por las púas de ambos anillos de retención y por el prensado realizado por el borde del cono de infusión y el resalto del anillo de fijación interior, como puede observarse en la Figura 4.

Dado que su cara posterior queda ubicada en dirección al cono de infusión, el líquido vertido a través de la porción superior del cono de infusión ejerce, por gravedad u otro sistema pertinente, una presión que mantiene la concavidad natural de la córnea. En caso de utilizarse la presión lograda por la gravedad, la diferencia de altura recomendada es de 40 a 50 cm., en la ciudad de Córdoba, República Argentina, para lograr la tensión adecuada, evitando el daño por defecto, o por exceso de la misma.

El bastidor así armado se coloca en un recipiente con el medio de cultivo elegido, a 4°C, pudiendo ser trasladado y manipulado según la necesidad.

Resultados

A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de los grupos experimentales descripto.

GE 0: se reconocen las características histológicas normales de los estratos corneales y su tinción en las diversas coloraciones.

GE I: se observó pérdida de los parámetros de viabilidad en un plazo de sólo 12 horas produciéndose edema importante en el parénquima corneal para los cuatro especímenes provenientes de dos animales. Los pliegues de la membrana de Descemet se observaron hasta la periferia. El epitelio se presentó muy friable y en la observación biomicroscópica pudo constatarse que el mismo se desprendió en lagunas. El endotelio se encontró francamente alterado.

A las 24 horas, las dos córneas restantes comenzaron a aplanarse disminuyendo su diámetro y mostrando pliegues groseros en la membrana de Descemet y desaparición del endotelio. La Figura 5 (a, b) ilustra estos fenómenos.

GE II: a las 24 horas de la muerte de los animales se observó que el epitelio estaba desprendido en la zona central, encontrándose el resto muy débilmente adherido. El parénquima presentó un edema grado ++, los pliegues de la membrana de Descemet abarcaron los dos tercios centrales de la córnea, no siendo posible observar el endotelio.

En el caso de la enucleación a las 48 horas de la muerte, se observó el epitelio completamente desprendido, un edema de córnea grado +++ y que los pliegues de la membrana de Descemet abarcaban toda la superficie de la córnea.

GE III: si bien aún eran buenas las condiciones para el epitelio, el parénquima presentó un ligero edema grado + y en la membrana de Descemet se insinuaban algunos pliegues en la zona central. El endotelio se mantuvo visible y la cámara anterior conformada.

A las 48 horas, el epitelio comenzó a edematizarse y el parénquima, la membrana de Descemet y el endotelio mantuvieron las mismas condiciones observadas 24 horas antes, lo que no se corroboró para la cámara anterior, encontrándose más estrecha.

A las 72 horas el epitelio estaba adherido aunque edematizado, el parénquima presentó un edema grado ++, la membrana de Descemet mostró un tercio de su superficie con pliegues centrales evidentes, el endotelio ya no pudo observarse y la cámara anterior se presentó aplanada, entrando el endotelio en contacto con el iris en la región periférica.

A las 96 horas, el epitelio edematoso se desprendió espontáneamente, el parénquima presentó un edema grado +++, observándose pérdida de la curvatura corneal. Los pliegues de la membrana de Descemet ocupaban dos tercios de su superficie, los cuales eran imborrables a la presión y la cámara anterior, totalmente aplanada, permitió el contacto total del iris con el endotelio.

Por último, a las 120 horas, el epitelio se mostró completamente macerado, el parénquima muy edematoso, evidenciando pérdida de la curvatura corneal y los pliegues de la membrana de Descemet abarcaron toda la superficie corneal. Al igual que 24 horas antes, el endotelio no se visualizó y el iris, adherido

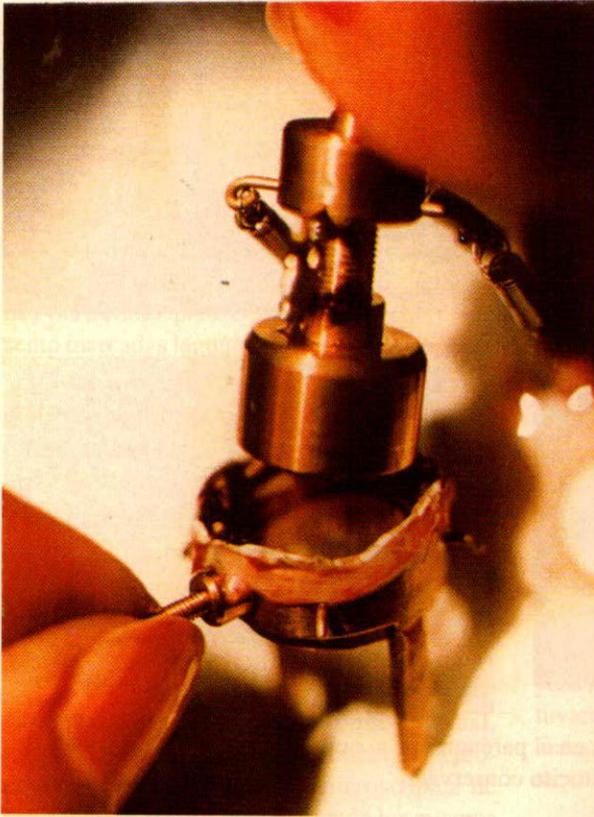


Figura 4b: Equipo ensamblado

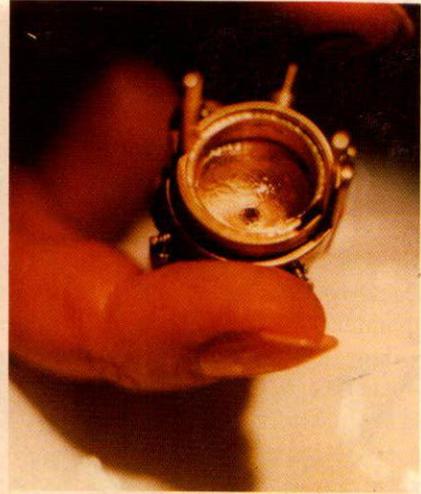


Figura 4c: Córnea montada en bastidor lado externo.

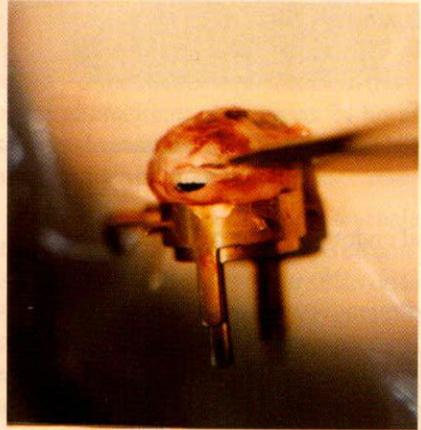


Figura 4d: Globo ocular emplazado en el bastidor. Proceso de incisión.

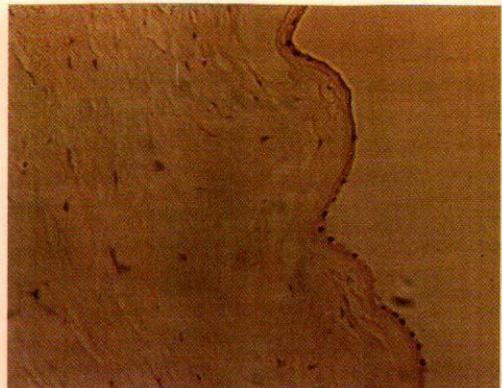
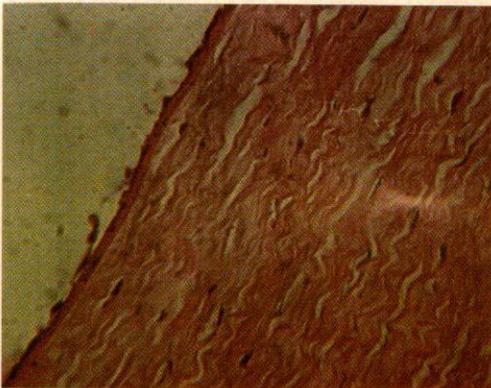


Figura 5: (a) Endotelio fragmentado; (b) Pliegues en la membrana de Descemet y desaparición del endotelio.

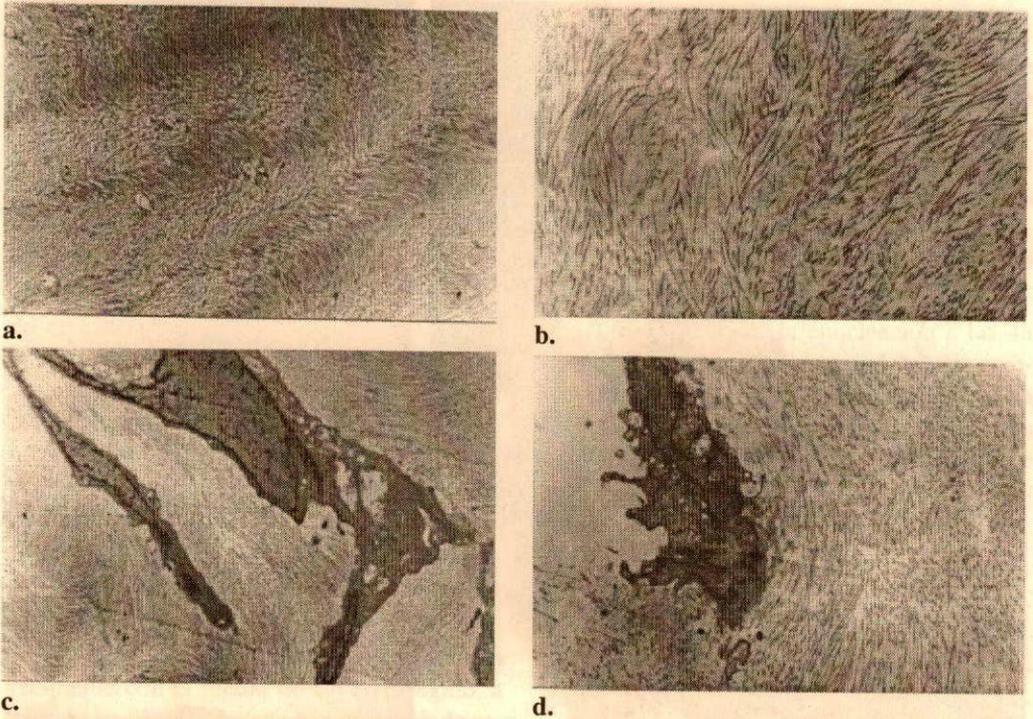


FIGURA 6: Modificaciones observadas en el parénquima. a- normal, b- córnea conservada, c- queratocito normal, d- queratocito conservado

al endotelio, se percibió con dificultad.

No obstante la vigencia de este procedimiento para la conservación de las córneas, las observaciones registradas indicaron que la viabilidad de las mismas en conejos se puede mantener hasta las 48 horas, ya que, a partir de ese período de tiempo, los parámetros de viabilidad seleccionados se van perdiendo.

GE IV-V-VI: a las 24 horas los tres medios de cultivo ensayados mostraron semejanzas en el comportamiento de los parámetros de viabilidad, esto es, el epitelio se mantuvo intacto, el parénquima no presentó edema, no se registraron pliegues en la membrana de Descemet y el endotelio se mostró completamente íntegro.

A las 48 horas, los parámetros evaluados no se modificaron para los medios de cultivo Likorol y Optisol. El medio de cultivo de Mc Carey Kaufman mostró, salvo en endotelio, algunas alteraciones: el epitelio aún adherido, registró un ligero edema; el parénquima presentó un edema grado + y los pliegues en la membrana de Descemet se insinuaron en una sexta parte de su superficie.

A las 72 horas, los medios de cultivo Optisol y Likorol mantuvieron sus parámetros

sin modificaciones, salvo para el epitelio, que presentó un ligero edema y la membrana de Descemet, que mostró pliegues centrales menores a un tercio de su superficie, en el segundo de ellos. El medio Mc Carey Kaufman mostró diferencias en la membrana de Descemet, en la cual se presentaron pliegues en un tercio de su superficie.

A las 96 horas, los medios de cultivo Optisol y Likorol tuvieron comportamientos similares, a diferencia del medio restante, para el cual el edema en el parénquima ya se presentó como de grado ++, los pliegues en la membrana de Descemet cubrieron las dos terceras partes de su superficie y el endotelio mostró alteraciones en la periferia.

Por último, la conservación a las 120 horas indicó diferencias significativas entre los tres medios de cultivo. En términos generales el Optisol fue el que menos alteraciones presentó en lo que se refiere a los parámetros de viabilidad, lo cual coincide con lo informado por Doughman (1997)(11) y el de Mc Carey Kaufman fue el más extremo para las modificaciones de los mismos. A saber, el epitelio, ya edematoso, pudo desprenderse para los medios de cultivo Likorol y de Mc Carey Kaufman; el

parénquima presentó edemas grado +, ++ y +++ para Optisol, Likorol y de Mc Carey Kaufman respectivamente; la membrana de Descemet mostró pliegues en sus dos tercios de superficie para los dos primeros medios, a diferencia del de Mc Carey Kaufman, en el cual dichos pliegues ocuparon la totalidad de su superficie; por último, el endotelio, exhibió alteraciones periféricas para Optisol y Likorol y presentó marcadas lagunas para el medio restante.

Estos resultados evidencian que aún en el medio de Mc Carey Kaufman se verifica el mantenimiento de los parámetros de viabilidad hasta un máximo de 4 días.

Las observaciones realizadas a las 144 horas para los medios Optisol y Likorol indicaron comportamientos semejantes al correspondiente al medio de cultivo de Mc Carey Kaufman para las 120 horas.

GE VII: la Figura 6 refleja las modificaciones observadas en el tejido corneal, infiriéndose que dichas alteraciones que se producen en la estructura ultramicroscópica de estos tejidos, son evidentes cuando los mismos todavía pueden considerarse perfectamente aptos para el trasplante.

GE VIII (A, B y C): los tres procedimientos presentaron diferencias significativas en el período de evaluación. Hasta el décimo día, se destacó la buena performance del procedimiento C ya que ninguno de los parámetros de viabilidad presentó modificaciones. Este desempeño fue diferente al de los dos restantes procedimientos implementados, el cual se describe a continuación.

Hasta las 48 horas, los tres procedimientos tuvieron idénticos comportamientos, sin alteraciones en los parámetros de viabilidad. Esto fue semejante para las 72 horas también, salvo para el procedimiento A, para el cual, si bien el epitelio y endotelio no presentaron alteraciones, la membrana de Descemet mostró pliegues en una porción menor a un tercio de su superficie y la cámara anterior evidenció aplanamiento.

A las 96 horas, los procedimientos A y B fueron semejantes salvo en la observación del parénquima. Esto es, el epitelio mostró edema, la membrana de Descemet presentó pliegues en un sexto de su superficie, el endotelio

se mantuvo sin alteraciones, la cámara anterior, al aplanarse, provocó el contacto del iris con la periferia y el parénquima, que para el procedimiento B continuó sin modificaciones, evidenció edema grado + para el denominado con A.

El edema del epitelio, a las 120 horas, no implicó su desprendimiento. El parénquima y la membrana de Descemet tuvieron semejantes comportamientos para los procedimientos A y B, esto es, un edema grado ++ y pliegues en dos tercios de la superficie de la membrana de Descemet. Se pudo constatar que el hidratar solamente la córnea cada seis horas, a diferencia del procedimiento B, no permitía visualizar el endotelio después del quinto día de conservación y además mostraba la mitad del iris adherido al endotelio.

A las 142 horas el epitelio, en ambos procedimientos, se desprendió fácilmente, el parénquima y la membrana de Descemet mantuvieron las alteraciones observadas 24 horas antes y la cámara anterior se aplanó totalmente.

El procedimiento B, si bien no señala un avance en lo que se refiere a tiempo de conservación, permite reconocer el perjuicio de la retracción que aplanar la córnea. Por lo tanto, para mejorar las condiciones de conservación con vistas al trasplante, fue necesaria la implementación del sistema descrito, el cual mantiene la presión que naturalmente posee la córnea.

El procedimiento centrado en la instilación de medio nutritivo cada seis horas en la córnea, mostró que, a las 166 horas de conservación, el epitelio se desprendía espontáneamente, el parénquima poseía un edema grado +++, los pliegues cubrían toda la superficie de la membrana de Descemet, el endotelio no se visualizaba y la cámara anterior desaparecía observándose así el aplanamiento de la córnea.

Esto implica una influencia positiva del mantenimiento de la curvatura y las tensiones de la córnea y se modifican los parámetros observados en el procedimiento con cámara húmeda.

Cabe destacar que luego del décimo día el procedimiento C mostró diferencias para los parámetros de viabilidad. Éstas son equivalentes a lo observado desde el quinto día para los otros dos procedimientos y dado que esto se

mantiene hasta el vigesimoquinto día, se puede afirmar que el mantenimiento de las tensiones y curvaturas de la córnea, constituye un factor fundamental a considerarse en la etapa de conservación y por ende de viabilidad de los tejidos corneales.

GE IX:

Transplantes Grupo I:

Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C durante 48 horas: a la semana se verificó la transparencia del injerto en su zona central, sin complicaciones. Este comportamiento se mantuvo, con ligera mejoría, hasta el último día de observación.

Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C durante 72 horas: hasta los primeros siete días la córnea se mantuvo opaca y la zona del injerto muy protuida, indicando la probable inviabilidad del material donante.

Transplante Grupo IV:

Córneas conservadas en medios de cultivo Mc Carey Kaufman a 4°C durante 72 horas: uno de los animales tuvo buenos resultados al momento del primer control, mientras que el otro mostró una pequeña hernia de iris, la cual no fue tratada, presentando la córnea opaca. Al décimo día, este individuo comenzó a presentar transparencia en la zona central indicando una mejoría, aunque con evidente vascularización. En este caso se consideró viable la córnea dada su evolución.

Córneas conservadas en medios de cultivo Mc Carey Kaufman a 4°C durante 96 horas: uno de los animales presentó infección al cuarto día, con abundantes secreciones. El otro mostró ausencia de transparencia y moderada protusión del botón al sexto día. Esto podría indicar que luego de las 96 horas, en conejos, el sistema de conservación utilizado pierde vigencia.

Transplante Grupo V (a):

Córneas conservadas en medio de cultivo Likorol a 4°C durante 96 horas: los animales presentaron buena evolución en todo el proceso de observación.

Córneas conservadas en medio de cultivo Likorol a 4°C durante 120 horas: uno de los animales presentó abundantes secreciones a los seis días y el otro falta de transparencia e importante protusión del botón. Se realizó entonces el mismo procedimiento en

otro animal evitando contaminación, hecho éste que se presentó como complicación en las córneas conservadas antes de ser transplantadas, obteniéndose resultados no satisfactorios.

Esto indicaría que estos medios de cultivo, en conejos, permiten conservar la aptitud hasta un máximo de cinco días presentándose luego falta de viabilidad y contaminaciones tanto en el botón aislado como en aquel injertado.

Transplante Grupo V (b):

Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C en medio de cultivo Likorol colocando gotas cada 6 horas sobre la córnea, durante 96 horas: el primer control realizado a los animales arrojó resultados satisfactorios.

Córneas conservadas en cámara húmeda a 4°C en medio de cultivo Likorol colocando gotas cada 6 horas sobre la córnea, durante 120 horas: en el primer control las córneas ya estaban opacas. Uno de los individuos mostró mejoría hacia el décimo día, consistente en el aclaramiento de un pequeño sector de la parte central. Al tercer control, las córneas se mostraron opacas y con protusión del botón.

Se infiere entonces que los parámetros de observación de la vitalidad de los tejidos son confiables. Esta prueba brinda indicios que si bien no demuestran una mejoría en el tiempo de conservación, comparada con el logrado con el medio de cultivo Likorol, sí muestran mejoría con respecto a cámara húmeda. Esto valoriza tanto la nutrición como el respeto relativo de las tensiones naturales de la córnea.

Transplante Grupo VIII:

Córneas sujetadas con el sistema desarrollado para mantener las tensiones en medio de cultivo Likorol, a 4°C durante 10 días: los animales mostraron buena evolución en el primer control a los 4 días.

Córneas sujetadas con el sistema ideado de doble anillo y campana de mantención de las tensiones en medio de cultivo Likorol: todos los animales tuvieron resultados satisfactorios. Los parámetros de viabilidad evaluados mantuvieron una correlación con los comportamientos de los procedimientos de transplante, siendo significativa la mejoría en los tiempos de conservación cuando se respetan las tensiones y curvaturas corneales.

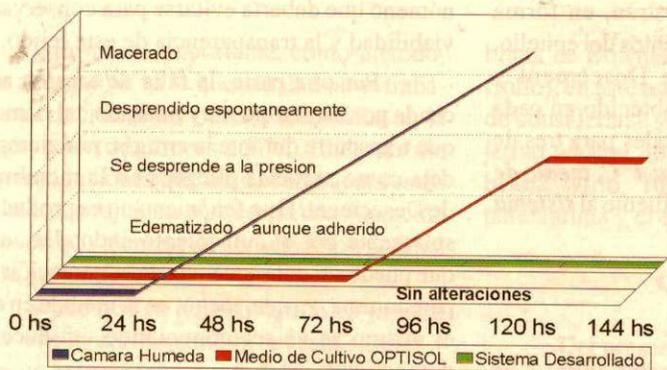


Figura 7: Performance del Epitelio en los medios cámara húmeda a 4° C, medio de cultivo Optisol y el correspondiente al sistema desarrollado en función del tiempo.

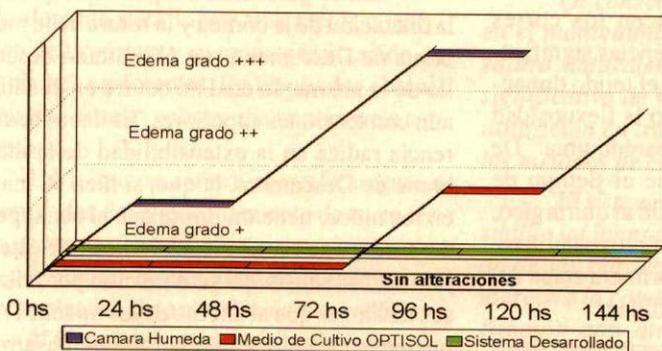


Figura 8: Performance del Parénquima en los medios cámara húmeda a 4° C, medio de cultivo Optisol y el correspondiente al sistema desarrollado en el tiempo.

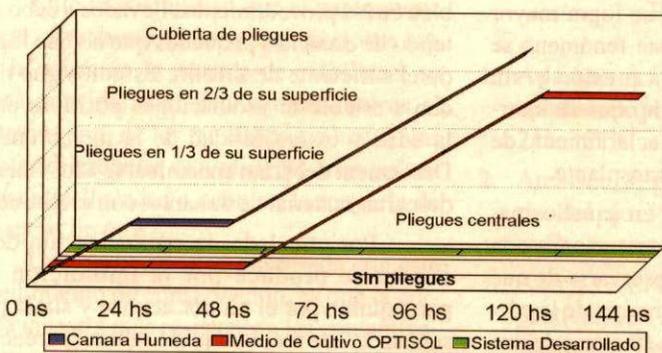


Figura 9: Performance de la Membrana de Descemet en los medios cámara húmeda a 4° C, medio de cultivo Optisol y el correspondiente al sistema desarrollado en función del tiempo.

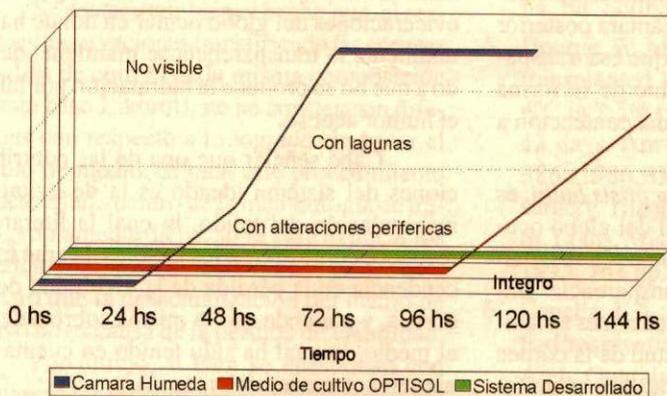


Figura 10: Performance del Endotelio en los medios cámara húmeda a 4° C, medio de cultivo Optisol y el correspondiente al sistema desarrollado en función del tiempo.

Las Figura 7-10 muestran, en forma comparativa, los comportamientos del epitelio, parénquima, membrana de Descemet y endotelio, respectivamente, obtenido en cada uno de los grupos experimentales para tres de los métodos *cámara húmeda a 4° C, medio de cultivo Optisol* y el correspondiente al *sistema desarrollado*.

Discusión

En un trasplante lamelar exitoso, es decir en el que se ha logrado la transparencia de la córnea, cuando se hacen los cortes histológicos se observan diferencias significativas entre el tejido receptor y el tejido donante, destacándose en el segundo la flexuosidad que presentan las fibras del parénquima. De esta manera resulta claro que el tiempo de hipotonía ocular previo, sumado al quirúrgico, podrían ser determinantes para provocar la retracción del tejido, como una primera etapa del proceso de pérdida de la viabilidad.

Además, cuando se inyecta suero fisiológico a 4°C en un globo ocular que ha estado en cámara húmeda, con la finalidad de devolverle sus tensiones naturales, se logra mayor transparencia de la córnea. Este fenómeno se consigue sólo aumentando la presión y sin modificar la temperatura, hecho que se interpreta como la única causa del aclaramiento de la córnea en el momento del trasplante.

La práctica indica que en aquellos pacientes en que se realizan evisceraciones con implante intraocular, puede observarse de qué manera se conserva la transparencia de la córnea. Ésta, con el tiempo, puede afectarse de una queratopatía en banda relacionada con la desecación de la superficie, ya que, en regiones protegidas por los párpados, mantiene la transparencia. A pesar de la falta de cámara posterior y endotelio, se puede afirmar que esa transparencia se debe al mantenimiento de su forma natural, lograda al colocarse una contención a la retracción.

Cuando se presenta una *ptisis bulbi*, es decir la claudicación tensional del globo ocular, la córnea, a pesar de ir reduciendo su tamaño, puede mantener cierta transparencia. Entonces, la conservación de las tensiones es también lo que conserva la magnitud de la córnea pudiéndose inferir, que la retracción es un fe-

nómeno que debería evitarse para conservar la viabilidad y la transparencia de este tejido.

Por otra parte, la falta de tensión adecuada por un tiempo muy limitado, tal como el que transcurre durante la cirugía, por ejemplo, deja como secuelas pliegues en la membrana de Descemet. Este fenómeno no es producido solamente por el sufrimiento endotelial, sino que puede ser consecuencia de la retracción del parénquima, ya que, luego, en la medida en que el mismo se va recomponiendo, produce su desaparición.

En el glaucoma congénito se produce la dilatación de la córnea y la rotura de la membrana de Descemet, por el limitado desarrollo de la misma, lo cual no ocurre en el adulto, aún con tensiones superiores. Es decir, la diferencia radica en la extensibilidad de la membrana de Descemet, la que, si bien es mayor en los niños, tiene un límite que al ser superado produce su ruptura. Esto indica que este tejido es más sensible a la retracción por falta de sus tensiones que al exceso de las mismas. Asimismo, es probable que la falta de desarrollo pueda ser una de las causas de las dificultades en implantes realizados en niños, como también en los procedimientos llevados a cabo con tejido de donantes pequeños que no han logrado el suficiente desarrollo. Estudios que tiendan a establecer asociaciones positivas entre la edad y extensibilidad de la membrana de Descemet deberían encaminarse a los fines de descartar material de donantes con escasa edad.

Por otro lado, la edematización de la córnea se produce por la imbibición del parénquima por el humor acuoso y sin la presencia de este medio líquido su transparencia e integridad se mantienen aunque falte totalmente el endotelio. Esto se demuestra cuando se realizan los implantes intraoculares, luego de las evisceraciones del globo ocular en donde habitualmente la transparencia se mantiene, debido a que no se produce la hidratación por faltar el humor acuoso.

Cabe señalar que una de las contribuciones del sistema ideado es la de evitar la manipulación del tejido, lo cual la literatura reconoce como uno de los factores de gran trascendencia en la pérdida de la viabilidad de la córnea, y por ende que la misma sobrenade en el medio, lo cual ha sido tenido en cuenta en numerosos procedimientos. (22)

Otro punto importante, como metodología alternativa, es lo que señalan otros trabajos, en relación a sus buenos resultados en la conservación de córneas a 37°C. El desarrollo de investigaciones que tengan en cuenta estos resultados, conjuntamente con la consideración de novedosas técnicas de conservación podrían ser de gran utilidad.

Dado que en la bibliografía en general no se encuentra ninguna propuesta similar y tampoco antecedentes que señalen la importancia de mantener las condiciones tensionales del tejido donante para lograr una mejor conservación de la córnea y su exitosa utilización en trasplantes perforantes, los resultados obtenidos en este estudio cobran una importancia significativa.

En lo que se refiere específicamente a los resultados del almacenamiento de corto término ensayado, puede concluirse que la acelerada pérdida de la vitalidad de la córnea, en ojos enucleados de animales conservados enteros a 4°C, pone en evidencia la necesidad de la pronta enucleación de los cadáveres una vez producida la muerte (Perkins *et al.*, 1981). (23)

Ante la posibilidad que el parénquima corneal, al retraerse, provoque alteraciones que sean la causa de la pérdida de viabilidad, se deberá considerar en situaciones futuras el mantenimiento de las tensiones, evaluando las posibles diferencias con respecto a las prácticas usuales llevadas a cabo en la mayoría de los bancos de ojos.

Una particularidad observada con este procedimiento de conservación, es que la córnea se muestra más resistente a las contaminaciones con hongos y bacterias, lo cual deberá confirmarse con nuevas investigaciones diseñadas para tal este fin.

Se destaca también el hecho que, al realizarse conservaciones transfiriendo las córneas a medios de cultivo de la misma composición (en este caso Likorol), no se constataron diferencias con respecto a lo logrado sin hacer el cambio de medio. Si bien este procedimiento fue descartado dentro de la metodología de trabajo propiamente dicha, sirve para explicar los beneficios del sistema desarrollado, ya que deja en claro que la desactualización del medio de cultivo no es causa de la pérdida de viabilidad.

Por último, si bien se cuestionan con frecuencia los trabajos experimentales realizados en conejos, ya que su córnea no posee mem-

brana de Bowman (o tiene muy escaso desarrollo), en este estudio esta particularidad puede considerarse sin importancia, ya que su objetivo general no se relaciona con esta membrana sino fundamentalmente con el parénquima y el endotelio.

Conclusión

Del presente trabajo puede extraerse la siguiente conclusión:

La conservación de la córnea basada en el mantenimiento de sus tensiones y curvatura naturales permite una prolongación significativa de su viabilidad, con vistas a su utilización en trasplante, en comparación a los métodos de conservación tradicionales.

El sistema de bastidor desarrollado posibilita tal mantenimiento y por ende el retardo de las retracciones tisulares cadavéricas, merced a la combinación de un dispositivo de fijación con otro de infusión del líquido conservante mediante presión.

Bibliografía

1. Adams, A. Ketamine in paediatric ophthalmic practice. *Anaesthesia*. 28: 212-213. 1973.
2. Arentsen, J. J. Cirugía del segmento anterior del ojo. 1º Ed. Bs. As. Editorial Médica Panamericana S.A. 1990. 384 pp.
3. Avery, G. S. Farmacología clínica y terapéutica. Adis Press, Sydney y Nueva York. Barcelona. Salvat. 1983. 1316 pp.
4. Barraquer, J. y J. Rutllán. Atlas de microcirugía de la córnea. 1º Ed. Barcelona. Ed. Scriba, S.A. 1982. 398 pp.
5. Bourne, W. M. Endothelial cell survival on transplanted human corneas preserved at 4°C in 2,5% chondroitin sulfate for one to 13 days. *Am J Ophthalmol*. 102(3): 382-386. 1986. BRIGHTBILL, F. S. Corneal surgery. Theory, technique and tissue. 2º Ed. St. Louis. Missouri. Mosby-Year book, Inc. 1993. 763 pp.
6. Capella, J. A.; Kaufman, H. E. y Robbins J. E. Preservation of viable corneal tissue. *Arch. Ophthalmol*. 74: 669-673. 1965.

7. Castroviejo, R. Atlas de queratectomías y queratoplastias. 1° Ed. Barcelona, Salvat Editores. S.A. 1964. 391 pp.
8. Ceraso, O.; Gimenez, J. C. y Hagman E. Anestesia balanceada con infusión continua I. V. de Ketamina. Comparación de la analgesia con morfina y procaína. Revista Argentina de Anestesia. 38. 2. 1980.
9. Costa Vila, J.; Canals, M. y Pita D. Eye bank and corneal transplant in 1944. Transplant Proc. 27(4): 2419-2425. 1995.
10. Delbosc, B. y X. Piquot. La conservation des cornées humaines. Convergence. Vol. 45-10F: 15-18. 1989.
11. Doughman, D. J. Cornea-Tissue storage. Mosby-Year book, Inc. St Louis, Missouri 63146. Krachmer J. H.; Mannis M. J. y E. J. Holland. 1997. Vol. I, Chapter 39. 976 pp.
12. Fernandez Meijide, R. Queratoplastias perforantes. Donante, receptor y adiestramiento quirúrgico. Arch Oftal de Bs. As. Vol LXVII: 81-116. 1992.
13. Filatov, V. P. Transplantation of the cornea. Arch Ophthalmol. 13:321-347. 1935.
14. Griffith, F. N. The promise of international eye banking. Int Ophthalmol. 14 (3): 205-210. 1990.
15. Harris, J. E. y Nordquist L. T. The hydration of the cornea I The transport of wather from the cornea. A. M. Ophtalmol 40:100, 1995.
16. Kangas, T. A.; Edelhauser, H. F. y Twining S. S. Loss of stromal glycosaminoglycans during corneal edema. Invest Ophthalmol Vis Sci. 31: 1994-1998. 1990.
17. Kenneth, R K. The real corneal challenge: International eye banking. Ocular Surgery News. Vol. 8, N° 2: 6-7. 1997.
18. Lass S, J. H.; Bourne, W. M.; Musch, D. C., Sugar, A. y Col. A randomised, prospective, double-masked clinical trial of Optisol vs. DexSol corneal storage media. Arch Ophthalmol 110 (10): 1404-1408. 1992.
19. Lindstrom, R. L.; Skelnik, D. L. y Lass J. Optisol-a new 4°C corneal preservation solution. Invest Ophthalmol Vis Sci. 31: 475-477. 1990.
20. Mc Kinnon, J. R. y Walters G. D. Cadaver storage time: an important factor in donor cornea survival. Arch Ophthalmol. 94: 217-220. 1976.
21. Martonyi, C. L.; Bahn, C. F. y Meyer R. F. Clinical slit lamp biomicroscopy and photo slit lamp biomicrography. J Ophthalmic Photogr. 7(3): 77-80. 1984.
22. Nartey, I. N.; Sherrard, E. S. y Steele A. D. M. Manipulative damage to the endothelium of infant and adult donor corneas. Br J Ophthalmol. 74 (5): 261-264. 1990.
23. Perkins, E. S.; David, W. H. y E. S. Sherrard E. S. Fundamentos científicos de la oftalmología. Córnea: estructura y transparencia. 1° Ed. Barcelona. Salvat Ed. S.A. 1981. 435 pp.
24. Piquot, X.; Delbosc, B.; Herve, P. y Royer J. Presevation of human corneas in organ culture; results of a feasibility clinical protocol. Bull Soc Ophthalmol Fr. 90: 429-432. 1990.
25. Samar, M. E. y Avila R. E. Técnicas histológicas. Aspectos teórico-prácticos. 1° Ed. Córdoba, Arg. Ediciones Atica. 1991. 182 pp.
26. Seedor, J. A.; Stulting, D. R. y Epstein R. J. Survival of corneal grafts from donors supported by mechanical ventilation. Ophthalmology. 94: 101-108. 1987.
27. Sokal y Rolph. Biometría. 1983. Chapman & Hall. 756pp.
28. Sulewski, M.; Orlin, S.; Rama, P.; Rama, G.; Tseng, S. H.; Lee, H.; Wang, C. C.; Hung, G. Y.; Chen, M. Y. y M. S. Huang. Clinical study on efficacy of NaHCO₃ free isotonic media (BFIM) for human cornea storage. Cornea. 16 (2): 255. 1997.
29. Torres de Cardena , A. M. y Col. Manual técnico y científico. Asociación Panamericana de Bancos de Ojos, (APABO). Extracto de Eye Bank Technical Manual. Eye Bank of America. 1988. 85 pp.
30. Waltman, S. R. y Kaufman H. E. In vivo studies of human corneal endothelial permeability. Am J Ophtalmol. 70: 45-47. 1970.