



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
U.M.A.E. HOSPITAL GENERAL CENTRO MÉDICO NACIONAL LA
RAZA
“DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA”**

**“ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA E HISTOQUIMICA EN TEJIDO
CORNEAL CON FINES DE TRASPLANTE CON SEROLOGIA POSITIVA A
TORCH. EXPERIENCIA EN CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA”**

**TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE MÉDICO ESPECIALISTA EN:
OFTALMOLOGÍA**

**PRESENTA:
DRA. ELVIRA GONZÁLEZ BOJÓRQUEZ**

ASESOR DE TESIS:

Directora de tesis: **Dra. Karla Verdiguél Sotelo**
Médico adscrito al servicio de oftalmología; Clínica de Córnea y Superficie Ocular
UMAE HG CMN La Raza
Matrícula: 99370777 Correo electrónico: dalinde_karlaverdiguél@hotmail.com
Calzada Vallejo S/N esquina con Jacarandas. Colonia: La Raza. Delegación:
Azcapotzalco, México, D.F.
Teléfono: 5724 59 00

Asesor metodológico: **Dr. Arturo Carrasco Quiroz**
Médico Adscrito al Servicio de Oftalmología; U.M.A.E. Hospital General “Dr. Gaudencio
González Garza”
Matrícula: 99374873
Correo electrónico: arturocarrascoquiroz@yahoo.com
Calzada Vallejo S/N esquina con Jacarandas. Col. La Raza, Delegación Azcapotzalco,
México DF
Tel: 5527155375

MÉXICO, D.F. AGOSTO DEL 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Unidad Médica de Alta Especialidad
HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA"
CENTRO MEDICO NACIONAL "LA RAZA"



**Proyecto de Investigación:
No. De Registro R-2015-3502-119**

**ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA E HISTOQUIMICA EN TEJIDO CORNEAL CON FINES
DE TRASPLANTE CON SEROLOGIA POSITIVA A TORCH. EXPERIENCIA EN CENTRO
MEDICO NACIONAL LA RAZA.**

AUTORES:

Alumna: Elvira González Bojórquez
Residente de tercer año Oftalmología UMAE HG CMNR.
Matrícula: 98366195 correo electrónico: elviragonzalezb@hotmail.com
Calzada Vallejo S/N esquina con Jacarandas. Col. La Raza, Delegación Azcapotzalco, México DF
Tel: 5724 5900

ASESORES DE TESIS:

Directora de tesis: Dra. Verdiguél Sotelo Karla
Médico Adscrito al Servicio de Oftalmología; Clínica de Córnea y superficie ocular UMAE HG
CMNR
Matrícula: 99373385 correo electrónico dalinde_karlaverdiguél@hotmail.com
Calzada Vallejo S/N esquina con Jacarandas. Col. La Raza, Delegación Azcapotzalco, México DF
Tel: 5724 5900

Asesor Metodológico: Arturo Carrasco Quiroz
Médico Adscrito al Servicio de Oftalmología; HECMN Siglo XXI
Matrícula: 99374973 Correo: arturocarrascoquiroz@yahoo.com
Av. Cuauhtémoc Col. Doctores# 330. Distrito Federal, D.F. 06720 México.
Teléfono: 5627-6900

**ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA E HISTOQUIMICA EN TEJIDO
CORNEAL CON FINES DE TRASPLANTE CON SEROLOGIA POSITIVA A
TORCH. EXPERIENCIA EN CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA**

**Proyecto de Investigación
No. De Registro R-2015-3502-119**

DRA. LUZ ARCELIA CAMPOS NAVARRO

DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

DRA. KARLA VERDIGUEL SOTELO

PROFESOR TITULAR Y MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE
CORNEA - OFTALMOLOGÍA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

DRA. KARLA VERDIGUEL SOTELO

ASESOR DE TESIS Y MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE
CORNEA - OFTALMOLOGÍA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA

DRA. ELVIRA GONZÁLEZ BOJÓRQUEZ

RESIDENTE DE LA ESPECIALIDAD DE OFTALMOLOGÍA
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL GENERAL "DR. GAUDENCIO GONZÁLEZ GARZA"
CENTRO MÉDICO NACIONAL LA RAZA



"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón".

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 3502
HOSPITAL GENERAL DR. GAUDENCIO GONZALEZ GARZA, CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA, D.F. NORTE

FECHA 28/07/2015

DRA. KARLA VERDIGUEL SOTELO

PRESENTE

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA E HISTOQUIMICA EN TEJIDO CORNEAL CON FINES DE TRASPLANTE CON SEROLOGIA POSITIVA A TORCH. EXPERIENCIA EN CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA.

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de Ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2015-3502-119

ATENTAMENTE


DR.(A). GUILLERMO CAREAGA REYNA

Presidente del Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud No. 3502

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

AGRADECIMIENTOS:

A mis padres, Agustín González Martínez y Nicol Bojórquez Castro, por estar siempre a mi lado, por ser mi ejemplo a seguir día a día, por nunca dudar de mis capacidades, por enseñarme a confiar en mi misma y por apoyarme en cada proyecto incondicionalmente, les estaré eternamente agradecida.

A mis maestros, amigos y grandes médicos, Dra. Karla Verdiguél Sotelo, Dra. Alejandra Barraza Montiel, Dra. María Teresa Ramos Cervantes, Dra. María de los Angeles Hernández Cueto, Dr. Elías Vargas Carrera:

Por su invaluable calidez humana, por la confianza, el apoyo constante, la paciencia, la motivación y la disposición de enseñar y compartir todos sus conocimientos para mi formación como médico oftalmólogo y como persona con principios y valores.

Agradeciendo especialmente a la Dra. Alejandra Barraza Montiel por sus enseñanzas inigualables tanto en el ámbito médico, las habilidades quirúrgicas y por mostrarme el verdadero significado de la amistad desinteresada, la calidez humana y la perseverancia. A la Dra. María de los Angeles Hernández Cueto, quien sin su arduo trabajo, apoyo constante, humildad y dedicación, no hubiera sido posible lograr la meta.

ÍNDICE

I. Hoja frontal e identificación de investigadores	1-2
II. Tabla de abreviaturas.....	7
III. Resumen estructurado	8-9
IV. Servicio	9
V. Marco Teórico	10-18
VI. Justificación.....	18
VII. Planteamiento del Problema.....	18-19
VIII. Pregunta de investigación.....	19
IX. Hipótesis	19
X. Objetivos	19-20
XI. Material, pacientes y métodos.....	20-21
XII. Variables del estudio.....	21-22
XIII. Descripción general del estudio	23-25
XIV. Análisis estadístico	26
XV. Consideraciones éticas.....	26-27
XVI. Recursos para el estudio	27
XVII. Cronograma de actividades.....	28
XVIII. Resultados.....	29-38
XIX. Discusión.....	39-40
XX. Conclusiones.....	41
XXI. Referencias y bibliografía.....	42-44
XXII. Anexos.....	45-47

II. ABREVIATURAS

CMNR: Centro Médico Nacional La Raza

UMAE: Unidad Médica de Alta Especialidad.

HECMN: Hospital de especialidades Centro Médico Nacional

EBAA: Asociación Americana de Banco de Ojos

CMV: Citomegalovirus

VHS-1: Virus Herpes Simple Tipo 1

VHS-2: Virus Herpes Simple Tipo 2

VZV: Virus de la Varicela Zoster

VHD: Virus de Hepatitis D

VHB: Virus de Hepatitis B

VHC: Virus de Hepatitis C

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 1

VIH-2: Virus de la Inmunodeficiencia Humana Tipo 2

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

EIA: Inmunoensayo Enzimático

RIBA-II: Ensayo de Segunda Generación de Radio-Inmunoblot

NAT: Pruebas de Ácido Nucleico

TG: Trigémino

IHC: Inmunohistoquímica

TC: Trasplante de Córnea

TORCH: Toxoplasma, Otros, Rubeola, Citomegalovirus, Herpes.

MAT: Construcción de microarreglo de tejidos

HE: Hematoxilina-eosina

PAS: Ácido peryodico de schiff

TM: Tricrómico de masson

III. RESUMEN

Verdiguél-Sotelo K¹, González-Bojórquez E², Carrasco-Quiroz A³.

Estudio de inmunohistoquímica e histoquímica en tejido corneal con fines de trasplante con serología positiva a TORCH. Experiencia en Centro Médico Nacional La Raza.

Antecedentes: La transmisión de enfermedades de los tejidos de los donantes a los beneficiarios, es uno de los peligros potenciales asociados con todos los tipos de trasplante de órganos y tejidos.

Requisitos médicos para la selección de los tejidos de la córnea de donantes han sido desarrollados por la Asociación Americana de Banco de Ojos (EBAA) y la FDA de Estados Unidos para asegurar que las córneas de donantes sean de la más alta calidad y que el donante esté libre de enfermedades transmisibles.

En México no existe un consenso nacional en materia de la evaluación del tejido corneal con fines de trasplante. Existen diversos hospitales que realizan procuraciones y sus evaluaciones difieren en diversos puntos y uno de ellos es el estudio serológico de los donantes. La literatura reporta daño endotelial por diferentes contagios de virus in vivo. Por otro lado se reportan fallas primarias de injerto en corneas con positividad a serología diversa aun otorgando al receptor tratamiento profiláctico específico. Por consenso del comité interno de trasplante de nuestro hospital se considera panel serológico completo al siguiente: VIH, VHC, VHB, CMV, sífilis, herpes, toxoplasma, y rubeola, descartando trasplantar cualquier tejido con serología positiva.

Es importante recalcar la importancia de éste estudio conociendo que la técnica de microarreglos de tejidos, hoy en día es una de las herramientas más modernas y más útiles existentes hoy en día en el estudio de tejidos; que permite disminuir la variabilidad interensayo y a variabilidad del observador u observadores. Su uso se confina prácticamente para investigación en la cual se pretende poner de manifiesto una molécula determinada. Mientras tanto la inmunohistoquímica es una tinción basada en una reacción antígeno-anticuerpo, en la que el anticuerpo específicamente se une a su antígeno, y dicho anticuerpo marcado con una sustancia cromógena es el que va a dar la reacción de tinción en nuestras muestras de córneas donadas, o ausencia de la misma.

Objetivo: Describir las características inmunológicas e histológicas con detección de anticuerpos específicos, mediante inmunohistoquímica e histoquímica de los tejidos corneales procurados con fines de trasplante y reporte serológico positivo a TORCH (siendo éste el más prevalente durante el tiempo de recolección de nuestras muestras), para comprobar o descartar la latencia de estos microorganismos en dichos tejidos.

Material y métodos: El presente es un estudio observacional, descriptivo, transversal, prospectivo.

Recursos e infraestructura: La investigación y estudio del tejido corneal donado con serologías positivas a TORCH, se realizara en el laboratorio Central de Epidemiología de CMN “La Raza”, donde se realizara inmunohistoquímica e histoquímica para el tejido mencionado con infraestructura y equipamientos propios de la sede.

Resultados: Expresión de citomegalovirus, virus herpes simple, rubeola y toxoplasma. En el análisis morfométrico de los cortes del MAT de córneas rechazadas para trasplante, se demuestra una expresión nula y definitiva tanto en córnea avascular, como en limbo esclero-corneal de ambos ojos en núcleo y citoplasma de epitelio, lámina de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio, cuando se compara con los tejidos de control positivo para citomegalovirus en pulmón, virus herpes simple en mucosa oral, rubeola y toxoplasma en ganglio.

Discusión: En este estudio se examina el patrón de expresión de citomegalovirus, virus herpes, rubeola y toxoplasma en tejidos de córneas rechazadas para trasplante, organizados en un microarreglo. El origen de éste trabajo se basa en la integridad clínica y física de las córneas que se rechazan para trasplante, por presentar serología positiva para estos microorganismos. Sin embargo el análisis morfométrico demuestra fehacientemente la expresión negativa (% cero) con anticuerpos específicos contra CMV, VHS, rubeola y toxoplasma, tanto en córnea avascular, como en el limbo esclero-corneal vascular, sobre todo cuando en el mismo análisis se encuentra tanto expresión nuclear positiva para CMV, VHS y rubeola, como expresión en citoplasma positiva para toxoplasma.

Conclusiones: La expresión nuclear negativa en estos tejidos para CMV, VHS y rubeola, indican que no hay replicación viral y de igual forma la expresión en citoplasma negativa para toxoplasma, indica que no hay infestación por el parásito. Por tanto los títulos identificados serológicamente deben ser cuidadosamente evaluados, sobre todo cuando clínicamente no hay datos que sustenten una afección de la córnea candidata a trasplante.

Palabras Clave: Inmunohistoquímica, histoquímica, microarreglo de tejidos, trasplante corneal, serología positiva, donador, receptor.

IV. SERVICIO

Él estudio se llevara a cabo en el departamento de banco de ojos del Hospital General Dr. Gaudencio González Garza CMN La Raza, así como en el laboratorio central de epidemiología CMN “La Raza”.

V. MARCO TEÓRICO

Desde tiempos inmemoriales, la ceguera ha sido una de las principales causas de incapacidad en la humanidad. Una de las principales causas de la misma ha sido la aparición de leucomas y opacidad total de la córnea. La ceguera secundaria a patología de origen corneal es la segunda causa más común de pérdida visual en la escala internacional y es la primera causa de ingreso a lista de espera nacional para la asignación de un tejido corneal. (1)

El trasplante de córnea o queratoplastia penetrante (QP) hace referencia a la sustitución quirúrgica de una porción de la córnea del huésped por la de un ojo donante. Si el donante es otra persona se le llama *aloinjerto*; el uso del tejido del mismo ojo o del otro se denomina *autoinjerto*; este procedimiento brinda esperanza para la rehabilitación visual en muchos casos. (2)

Su pronóstico es bueno, obteniéndose una visión con corrección de 20/40 en un 45% a 69% de los casos, con una supervivencia global de la queratoplastia penetrante de 73% a 5 años pudiendo llegar en las patologías de mejor pronóstico a un 92% a los 5 años de seguimiento y con un rechazo de 12 a 40%, variando según sea el tipo de patología, con alrededor de un 6% de falla consecuyente. Pueden requerir inmunosupresión sistémica casos muy específicos de alto riesgo de rechazo. (3)

Los trasplantes de córnea se realizan en casos de queratocono y otras ectasias corneales, queratopatía bullosa posquirúrgica, distrofia endotelial, traumatismos y quemaduras, queratitis herpética, entre otras entidades patológicas comunes. El término "keratoplastia" se acuñó en 1824 por Reisinger, para nombrar a la operación quirúrgica que reemplazará total o parcialmente a la córnea que hubiera perdido su transparencia, por una que fuera translúcida. El uso del primer trépano corneal se atribuye a Erasmo Darwin, en 1797. Con él, se inició en el siglo XIX, el tratamiento de las cicatrices corneales por medio del trasplante de córnea. (4)

En 1975 se crea el primer Banco de Ojos en la Ciudad de México, en el Hospital General de Xoco. Sólo en Estados Unidos el año pasado se realizaron 47,425 trasplantes de córnea. Desde 1960 a la fecha se han realizado 700,000 trasplantes de córnea, recuperando la visión más de 90% de los pacientes. El trasplante de córnea es el órgano con mejor pronóstico en el campo de los trasplantes. En México una de las instituciones representativas en cirugías de trasplantes de córnea es la "Asociación para Evitar la Ceguera en México", reportando un promedio de 1,000 procedimientos quirúrgicos anuales. En La Fundación "Hospital Nuestra Sra. de La Luz", en la jefatura del Departamento de Córnea, reporta 534 trasplantes de córnea de 1999 al 2005. En el Hospital General "Dr. Manuel Gea González" de la SSA, la dirección del Banco de Ojos informa se han realizado 407 procedimientos quirúrgicos de julio de 1999 al 2005. En el Hospital General de México de la SSA se reporta se han llevado a cabo 60 procedimientos quirúrgicos a partir de agosto del 2002 al 2005. (5)

En México en el año 2008 el IMSS redujo a un máximo de 3 meses el plazo en lista de espera para los candidatos a trasplante de córnea. Cada año se atiende a casi 1,600 derechohabientes que presentan diversos padecimientos oftalmológicos, y la demanda de consulta diaria promedio fluctuaba de 25 a 28 pacientes, de los cuales entre 8 y 10 necesitan dicha cirugía. El Hospital General de CMN La Raza, es una de las instituciones que más trasplantes de córnea realiza en la República Mexicana, por lo que el proceso de donación - procuración - trasplante, cuenta con protocolos de donante de tejido corneal establecidos por las normas nacionales e internacionales en las cuales el conteo endotelial así como la realización de controles por serologías en muestras de sangre de los donantes, son métodos de evaluación para el control de calidad de los tejidos obtenidos del donante cadavérico en la población mexicana. (6)

En México las dos patologías más frecuentes que ameritan trasplante de córnea son el Queratocono y la Queratopatía Bullosa, ambas generan una opacidad corneal central, la cual es el motivo que indica dicho procedimiento. (7)

Los autoinjertos constituyen el mejor material disponible para el éxito de una queratoplastia. Aunque el material para homoinjertos puede obtenerse de cadáveres de recién nacidos, niños, jóvenes, adultos o ancianos, no existe acuerdo sobre cuál es la edad óptima. Hay autores que no dan importancia alguna a la edad, raza, sexo, tipo de sangre y color de iris, en todo caso es preferible la córnea de un donante joven debido al conteo endotelial de la misma. La córnea reúne condiciones excepcionales para un homotrasplante, ya que es avascular y tiene escasas propiedades antigénicas. Las córneas donadas son examinadas para excluir aquellas que tienen enfermedades transmisibles. Es importante que a todos los donadores se les realicen exámenes de laboratorio para descartar que sean portadores del virus de VIH, hepatitis, herpes, entre otros. (8)

Tenemos que el trasplante de un órgano y/o tejido es: la sustitución de un órgano y/o tejido enfermo que ha perdido su funcionalidad, por un órgano sano procedente de un donador. Los tipos de trasplante según la nomenclatura internacional son los siguientes:

- Autogénicos (autotrasplante). Cuando procede del mismo individuo.
- Isogénicos (isotrasplante). Cuando el donante y el receptor son genéticamente idénticos, como en el caso de gemelos univitelinos (gemelos idénticos).
- Alogénicos (homotrasplante o alotrasplante). Cuando procede de un ser de la misma especie.
- Xenogénicos (heterotrasplante o xenotrasplante). Cuando procede de un ser de diferente especie. (9)

La queratoplastia puede ser de grosor parcial denominándose trasplante de córnea lamelar, o de espesor total, denominado queratoplastia parcial penetrante; en donde se retira la parte central de la córnea dañada y se reemplaza con una córnea transparente obtenida de un donante cadavérico. Las indicaciones para la realización de un trasplante de córnea son:

1. Óptico: el propósito es mejorar la visión. Las indicaciones más importantes son el queratocono, queratopatía bullosa, distrofias, degeneraciones y cicatrización corneal con leucoma residual.
2. Tectónico: Se lleva a cabo para la restauración o conservación de la integridad corneal y del globo ocular en aquellas patologías como la perforación corneal traumática, ectasias corneales complicadas con adelgazamiento del estroma y descematoceles entre otras.
3. Terapéutico: Su finalidad es eliminar el tejido corneal infectado en ojos que no responden al tratamiento antimicrobiano por ejemplo en queratitis infecciosas.
4. Cosmético: Puede realizarse en raras ocasiones para mejoría del aspecto del ojo. Se ha vuelto en un procedimiento cada vez menos realizado por la disponibilidad actual de lentes de contacto cosmético y prótesis oculares. (10)

El trasplante de córnea es el procedimiento quirúrgico en el que la córnea dañada de un paciente es remplazada por otra córnea de un cadáver humano. Es el tipo de trasplante de tejido que ha demostrado ser el más exitoso y el más común a nivel mundial. Desde que en 1905, *Edward Zirm* realizó con éxito el primer trasplante de córnea en un ser humano, hasta hoy día, se han conseguido importantes avances en esta técnica y se ha constituido en una cirugía que en general ofrece buenos resultados. (11)

En cuanto al riesgo existente sobre la transmisión de enfermedades infecto-contagiosas secundario al trasplante de córnea de donantes cadavéricos con serologías positivas o donantes de alto riesgo, se cuenta en la literatura con distintos estudios, tanto inmunológicos, como morfológicos o solamente serológicos, en distintos países, donde se estudia dicha incidencia y se analizan aspectos en cuanto a la transmisión de infecciones virales siendo estas las más comúnmente encontradas a nivel serológico.

Se han realizado algunos informes sobre la transmisión del VHS por trasplante de córnea. Se cree que estos casos que han surgido, ha sido resultado ya sea por un virus reactivado que viaja desde el ganglio del trigémino hasta la córnea, o del virus latente en la propia córnea del donante. Estudios de presencia viral a largo plazo en el tejido de la córnea han tratado de determinar si existe evidencia de latencia y como un riesgo potencial para los receptores de trasplante. El VHS se cree que es la causa principal de ceguera infecciosa en el mundo desarrollado, con 400,000 personas infectadas con enfermedad ocular en los EE.UU. Los dos serotipos de VHS, 1 y 2, tienen diferente tropismo. Ambos son capaces de causar enfermedad ocular, sin embargo, la gran mayoría se ha atribuido al VHS-1. La mayoría de los seres humanos, probablemente se infectaron con VHS-1 vía oral, con la propagación viral posterior a los ganglios del trigémino. La replicación viral puede producirse en los ganglios del trigémino, hasta que la actividad de las células T CD8 y una ineficiencia en el mecanismo de reparación del ADN conduzcan el virus a la latencia. Un estado latente se caracteriza por la expresión de genes de restricción. La reactivación puede ser desencadenada por varios factores, incluyendo el estrés, la radiación UV y la fiebre. La entrada del VHS en el tejido ocular puede ocurrir con la exposición exógena al virus o reactivación del virus que ha viajado al sitio de la infección. Aunque es raro, el virus también puede

ser transmitido por trasplante de córnea, donde se plantea la posibilidad de latencia corneal específica. (12)

La EBAA, ahora requiere que todos los bancos de ojos asociados evalúen las córneas mediante biomicroscopía y realizar pruebas serológicas para el VIH, VHS tipos 1 y 2, antígeno de superficie de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C y la sífilis entre otros como estudios básicos. De los donantes también se obtiene historia clínica y la causa de la muerte. El EBAA revisa todos los eventos adversos reportados asociados con el trasplante de córnea y evalúa regularmente la necesidad de cambios en las normas bancarias de los ojos. (13)

Los principales estudios epidemiológicos sugieren que una gran cantidad de adultos están infectados de forma latente en las neuronas sensoriales por el VHS-1, así como que el virus se elimina intermitentemente a través de las lágrimas entre los individuos asintomáticos, aumentando la posibilidad de que el mismo pueda residir en la córnea.

En diversos estudios, ciertas córneas que se sabían infectadas con el virus, se sometieron a condiciones de cultivo. La presencia del virus encontrado en los medios de cultivo, ha sugerido a éste como una posible causa de la falla endotelial. La presencia de ADN del VHS por PCR en córneas, se correlacionó con fracaso y falla endotelial a pesar de no haberse detectado la infección a nivel ocular. El fallo primario del injerto atribuido a VHS fue reportado por primera vez en 1994, en el que se detectó el virus en el injerto fracasado el cual había sufrido una pérdida endotelial significativa. Una serie publicada en 1997 informó que el VHS estaba presente en dos de cada tres casos de fracaso primario del injerto, se sugirió que el virus latente en la córnea donante pudo haberse reactivado. En otra serie se encontró que el VHS estaba presente en un tercio de los fallos primarios de injerto, de los cuales tres habían desarrollado la enfermedad herpética necrotizante. El VHS fue encontrado posteriormente en las córneas de donantes por inmunohistoquímica y PCR.

Como la mayoría de los seres humanos están infectados latentemente, es de gran interés si esto se aplica a la córnea, en particular. Esto es importante no sólo para la comprensión de la fisiopatología de VHS ocular, sino también debido a la posibilidad de transmisión del virus por trasplante de córnea. (14)

El tejido corneal no se toma generalmente de personas con síntomas o serología positiva para la hepatitis viral en el momento de la muerte. Es altamente infecciosa y la práctica se considera de alto riesgo para el receptor de la córnea. Los dos agentes de particular interés en el trasplante respecto a hepatitis son el VHB y VHC, debido a su capacidad de persistir en algunos individuos durante años después de la resolución de los síntomas. La sangre de la mayoría de los portadores del VHB tiene un título elevado de partículas infecciosas. Los estándares médicos publicados por la EBAA han sido el punto de referencia para las prácticas en demás bancos de ojos. Las contraindicaciones enumeradas para la donación de córneas incluyen pruebas para enfermedades infecciosas que se sabe que se pueden transmitir a los receptores de trasplante de córnea. El VHB es en la primera categoría y el VHC y VIH-1 se encuentran en la segunda. Las

sospechas sobre la posible transmisión del VHB mediante el trasplante de córnea se suscitaron a raíz de la detección de antígeno de superficie (HBsAg), un indicador de infección en el tejido corneal de portadores. En un informe, 3 pacientes recibieron córneas de donantes seropositivos a HBsAg, pero se mantuvieron libres de enfermedad. Sin embargo, fueron presentados dos casos de transmisión de hepatitis B secundario a trasplante de córnea en la Academia Americana de Oftalmología Reunión Anual en 1988 por Hoft. Esto llevó a la exigencia a la EBAA para agregar HBsAg en la serología a todos los donantes de córnea. (15)

Aunque 25% de los pacientes con hepatitis C aguda no tienen secuelas, el resto puede desarrollar una infección crónica con un aumento del riesgo de cirrosis hepática (20-50%). Por lo tanto, el potencial de transmisibilidad y las graves consecuencias clínicas de la infección por el VHC justifican un examen cuidadoso de los posibles donantes-seropositivos. Se han realizado estudios con el objetivo de investigar una correlación entre la seropositividad para VHC y la presencia de ARN por PCR del VHC en los tejidos de la córnea, y así, proporcionar una prueba más de la posible transmisibilidad del VHC a través del trasplante corneal. Se demostró una significativa correlación entre la seropositividad para VHC y la presencia de ARN del VHC en las córneas. Las pruebas serológicas de rutina para el VHC a todos los posibles donantes corneales y el rechazo de los tejidos corneales con seropositividad ciertamente se justificó. Se ha demostrado que sólo el 20-26 % de los donantes de córnea seropositivos, tenían ARN viral en su suero y, de éstos, ninguno tenía ARN viral en el tejido cornea. Se ha planteado la hipótesis de que aunque la sangre infectada puede ser transferida dentro del órgano o tejido sólido vascular, es poco probable que la córnea humana pueda llevar una carga viral sustancial, incluso si se obtiene de un donante virémico debido a la naturaleza avascular relativa de la córnea. La falta de documentación de transmisión de la enfermedad, junto con la falta de correlación entre la seropositividad a VHC y la presencia del mismo en la córnea, ha llevado a algunos autores a cuestionar el valor de las pruebas serológicas para el VHC y la justificación del rechazo de injertos sobre la base de donantes con seropositividad a la misma. (16)

La seguridad de tejidos es un tema frecuente de discusión. Se han examinado bancos de ojos (acreditados por la EBAA) para detectar la presencia o ausencia de serología reactiva en 3,592 donantes durante un período de 5 años, de 2005 a 2010. Se encontraron más de doscientos donantes con serologías reactivas, los cuales sirvieron para confirmar la importancia de las pruebas serológicas. Se apoya además la inclusión de técnicas distintas a la serología positiva para garantizar la seguridad de los tejidos y la selección de donantes idóneos entre la población. (17)

Se ha comprobado que la reactivación del VHS es la causa más común de fallo del injerto en los receptores de trasplante corneal ya que el ADN del VHS se ha encontrado en córneas con fracaso primario del injerto. Sólo los virus que se replican activamente pueden ser detectados por métodos de cultivo, mientras que

los ensayos de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica pueden detectar antígenos, incluso en ausencia de partículas infecciosas. El ADN ha sido encontrado por PCR y por hibridación in situ en el tejido de la córnea de los pacientes con antecedentes de queratitis herpética. La infección por el virus del herpes simple ocular puede inducir a queratitis tanto epitelial como estromal, así como también puede conducir a insuficiencia endotelial postoperatoria en queratoplastias. Se confirmó una alta posibilidad de infección por VHS con positividad en tejido corneal aparentemente sin relación con ninguna manifestación clínica, sin embargo, el VHS puede permanecer latente y puede por lo tanto inducir la infección de donantes y producir reactivación en los receptores de dichas córneas. Su presencia en las córneas de donantes puede ser crucial en el resultado del trasplante de córnea, ya que el VHS está potencialmente implicado en la necrosis endotelial postoperatoria. (18)

El VHS puede volverse latente en sitios neuronales, tales como el TG. Sin embargo, los sitios no neuronales de latencia, tales como la córnea, también han sido reportados. Aun así, el concepto de latencia del VHS-1 en la córnea no ha ganado aceptación universal debido a la dificultad de probar que la córnea es verdaderamente un depósito para el virus en lugar de un sitio transitorio para el mismo. (19)

Se han realizado estudios, como el estudio de Openshaw, el cual sugirió que la detección viral para VHS fue mayor en la periferia de la córnea que en la córnea central con 33 % y 8% respectivamente. Este hallazgo apoya la hipótesis de derrame ganglionar más que la latencia de la córnea debido a que las inervaciones de la córnea se producen desde la periferia a la córnea, por lo que es intuitivo que el derramamiento ganglionar se encuentra más a menudo en la periferia que en el centro de la misma. (20)

Una razón para sustentar la hipótesis de que el VHS - 1 es latente en córneas humanas, es que el virus infeccioso se recuperó en algunos estudios de cultivos de la córnea. Estudios biológicos moleculares de la córnea han demostrado la presencia de VHS- 1 y ADN del mismo. Se sugiere nuevamente que el virus es latente en córneas humanas. Es importante para estudiar la progresión de la enfermedad del VHS-1 y la posibilidad de la existencia real de la latencia en la córnea para mejorar la comprensión de estos procesos. (21)

Hoy en día se concluye que la presencia del VHS latente en la córnea del receptor es un factor de riesgo importante para el posterior rechazo del injerto. Por lo tanto, incluso sin antecedentes de queratitis por el mismo patógeno, el paciente receptor para la queratoplastia, está en riesgo de fracaso del injerto debido a la latencia del VHS en la córnea. (22)

Dos pacientes sin historia previa de infección ocular por VHS se sometieron a la queratoplastia penetrante (PK), uno secundario a queratocono y el otro para distrofia endotelial de Fuchs. Uno de los pacientes sufrió fallo primario del injerto, mientras que el otro desarrolló un defecto epitelial persistente, lo que se traduce

en el fracaso del injerto. Se llevó a cabo el cultivo viral de ambas córneas durante el período postoperatorio temprano. Las córneas de donantes fallidos se examinaron histopatológicamente por inmunohistoquímica y PCR. La histología de ambas córneas de donantes demostró un estroma corneal con necrosis generalizada de queratocitos y la pérdida de células endoteliales. Se mostró queratocitos positivos con anticuerpos contra el VHS- 1 a sus antígenos, así como partículas virales dentro de queratocitos en degeneración. El PCR era positivo para el ADN. Por lo tanto, el VHS en una córnea donante puede causar la destrucción endotelial así como falla primaria del injerto y queratitis ulcerativa posterior al trasplante. (23)

La queratitis estromal herpética tiene tendencia a la recidiva, por lo cual, un diagnóstico preciso disminuiría el número de fracasos del injerto debido a queratitis herpética recurrente. Se estudiaron varios botones corneales y muestras de humor acuoso de pacientes conocidos con queratitis herpéticas y de otros más. También se utilizaron córneas de bancos de ojos. Tanto el VHS-1 como el 2, se evaluaron mediante PCR y detección de anticuerpos. En las córneas del banco de ojos se detectó HSV-1 en 1/23 (4 %). El estudio y la investigación de los botones corneales, independientemente de contar con serologías positivas o no, pueden ser una herramienta de diagnóstico útil, además de ayudarnos a la detección de la producción intraocular de anticuerpos anti-VHS. (24)

Cabe mencionar que el VIH ha sido aislado en la lágrima, epitelio conjuntival, córnea y humor acuoso. En la córnea se halla presente en el 2 al 3% de las células epiteliales de los pacientes infectados (25), y perdura hasta cuatro días activo en el medio de conservación de McCarey-Kaufman (26). Su presencia en la córnea va más allá de la mera contaminación desde la lágrima: se ven formas virales inmaduras en el epitelio lo que habla a favor de replicación in situ (27). Por todo lo anterior, se considera al VIH como un virus de posible transmisión a través del injerto corneal, por lo que es requisito en el donante corneal realizar un estudio de VIH con ELISA y rechazar los casos positivos (28). Este método de detección cuenta con un defecto que ha hecho buscar otras alternativas: el período ventana en el desarrollo de anticuerpos antiVIH. Hasta en los 6 primeros meses tras ser infectado por el VIH las pruebas serológicas pueden ser falsamente negativas. Además, el test de ELISA no es absolutamente efectivo en el cadáver, disminuyendo su sensibilidad desde más del 99% hasta el 95% cuando la extracción del suero del donante se realiza postmórtem. Por todo ello el riesgo de trasplantar una córnea de un paciente infectado con ELISA falsamente negativo para VIH es del 0,01% al 0,03%, incrementándose este riesgo por diez si la donación procede de una población de alto riesgo. Por eso se recomienda rechazar las donaciones de pacientes de alto riesgo, aun siendo seronegativos para el VIH. Finalmente debemos saber que aunque su incidencia varía geográficamente, una media del 0,68% de los donantes registrados en un banco de órganos o tejidos son portadores del VIH y un 1,33% del virus de la hepatitis B, pudiendo llegar en el caso del virus del SIDA a estar presente hasta en un 10% de los donantes de edad comprendida entre los 30 y 40 años, donde el SIDA es ya la primera causa de mortalidad. Desde 1991 la EBAA recomienda realizar además

de la prueba ELISA para VIH, *screening* para detección de virus de la hepatitis B, C y sífilis (VDRL), este último en busca de falsos negativos para el VIH, en la suposición de que pudiera ser un marcador de presencia de enfermedades de transmisión sexual. En la práctica, parece tener una leve correlación con el SIDA, y no resulta práctico (29).

Se han realizado otros muchos intentos para localizar los falsos negativos. Se ha intentado determinar anticuerpos en humor acuoso de donantes, pero sólo se detectaban en el 26% de los seropositivos. Los últimos ensayos que se están realizando van enfocados a la detección directa del virus en los ojos del donante mediante las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa. Hasta ahora los resultados no han sido eficaces, seguramente por la distribución parcheada del VIH en la córnea, más que por deficiencias de la técnica. Es muy posible que la avascularidad corneal disminuya de forma determinante el tamaño del inoculo hasta hacerlo incapaz de infectar al receptor. En resumen, no existe evidencia de transmisión del VIH por queratoplastia. (30)

Resulta importante abordar también el tema de cómo realizar la construcción de microarreglos de tejidos. Para esto, se utilizan principalmente dos métodos para la construcción de dichos microarreglos. Los dos métodos consisten principalmente en el dar forma y construir una plantilla junto con un método de incrustación de la misma. El primer método utiliza un molde de goma que contiene 542 mm de profundidad, con clavijas de goma. Las clavijas están espaciadas con 1 mm de separación. El molde de goma se coloca en un molde de cera desechable y el casete de la incrustación se colocado en la parte superior. A continuación, el molde de cera se deja solidificar inicialmente en un bloque de hielo y luego en un congelador. El resultando es la construcción de una plantilla de cera con 54 espacios separados. En el segundo método, el molde de goma es tres veces más grande con clavijas más profundas de 10 mm. La cera de parafina se distribuye de igual forma con un casete de incrustación de tejidos en una base de molde de aluminio y el molde de goma se presiona firmemente en el de cera, colocándose en un plato frío dejándose solidificar. (31)

Para la tinción con inmunohistoquímica se realizan secciones del microarreglo. Se seca durante la noche a 60°C por lo general. Se realizan lavados de xileno por 3 minutos aproximadamente. Posteriormente se rehidrata por inmersión en alcohol al 100% durante 2 minutos, alcohol al 70% durante 1 min y luego en agua. Para la recuperación del antígeno se utilizan dos soluciones con diferentes valores de pH, específicas, dependiendo del anticuerpo. Posteriormente se procede a realizar la inmunotinción por un sistema automatizado. Por lo tanto todas las muestras se cubren entonces con el anticuerpo específico y finalmente se recubren con diaminobencidina, (que contiene 0,5 % de sulfato de cobre en solución salina con agente tensioactivo), se realiza contratinción con hematoxilina y se procede a deshidratar en concentraciones ascendentes de etanol. (32)

A pesar de que con dichas técnicas ha existido un importante progreso durante los años recientes en la identificación de eventos moleculares específicos, el

mecanismo exacto de dichos eventos sigue siendo a la fecha pobremente entendido. Al apoyarnos con dicha tecnología y avances nos ayudara a entender estos mecanismos teniendo un impacto importante en el mercado en desarrollo y puede servir para definir riesgos individualizados, ya sea tanto de actividad tumoral como de actividad infecciosa, latente, etcetera y personalizar apropiadamente la administración de estrategias para el mayor beneficio a los pacientes. (33)

VI. JUSTIFICACIÓN:

En el Centro Nacional de Trasplante, el Trasplante de Córnea, representa la primera necesidad de tejido en México.

La UMAE Dr. Gaudencio González Garza, CMN La Raza, es una de las instituciones que más trasplantes de córnea realiza en la república mexicana, por lo que el proceso de donación-procuración-trasplante, cuenta con protocolos de donante de tejido corneal establecidos por las normas nacionales e internacionales en las cuales la serología es un método de evaluación para el control de calidad de los tejidos obtenidos del donante cadavérico.

En el servicio de Oftalmología de éste hospital, todas las córneas procuradas que presentan serología positiva a algún patógeno, son desechadas, sin ninguna oportunidad a ser estudiadas como se realiza en otros países, por lo tanto necesitamos un sistema que demuestre la ausencia o presencia del virus en el tejido procurado, demostrando la latencia viral en la córnea, para realizar un control de calidad de los tejidos con fines de trasplante y así con ello dar mayor garantía de éxito en el trasplante y el descarte del uso definitivo de corneas con positividad. O por otro lado, descartar la positividad en cuanto a la latencia viral y de ésta forma poder tener un mayor aprovechamiento del mismo material donado, generando mayor oportunidad de tejido viable para trasplante de córnea, disminuyendo las listas del CENATRA, rehabilitando visualmente a mayor número de pacientes, así como también promover el desarrollo de la investigación en México.

VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El conocer la presencia o no de los virus en las córneas donadas de nuestra población mexicana, pese al resultado serológico que ya se realiza de manera rutinaria, permitirá mejorar los programas nacionales e institucionales de control de calidad de los tejidos donados permitiendo así mejores porcentajes de éxito en materia de trasplante corneal.

El potencial para la transmisión de enfermedades infectocontagiosas, se deriva de muchos informes de los receptores en órganos sólidos (corazón, hígado, riñón, hueso) de donantes seropositivos. Sin embargo, se carece de evidencia directa de la presencia del patógeno en las córneas. Éste estudio tiene la finalidad de

demostrar la presencia de patógenos infecto-contagiosos en la córnea del donante, pese al resultado serológico ya implementado de manera rutinaria y estricta, para sustentar y reafirmar el hecho de la negación a trasplantar dichas córneas pese a ser un tejido avascular, ya que como se ha mencionado en la literatura, su presencia puede adjudicar a la transmisión de enfermedades, así como ser la causa de los fallos primarios de injertos trasplantados. Es posible también que la presencia viral a largo plazo en la córnea, sea un signo de latencia no neuronal, y que existe el riesgo de que el virus pueda reactivarse después del trasplante. Con la inmunohistoquímica e histoquímica buscamos demostrar su presencia en la misma mediante detección de anticuerpos. La detección de virus puede potencialmente eliminar una gran proporción de tejido verdaderamente no apto para trasplante. Se buscará reforzar una correlación entre la seropositividad a infecciones y la presencia del patógeno en la córnea, demostrando que la inclusión de técnicas distintas a la serología positiva puede garantizar de manera potencial la seguridad de los tejidos.

VIII: PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es la latencia o frecuencia de microorganismos con serología positiva a TORCH, según la inmunohistoquímica e histoquímica con microarreglo de tejido, en las córneas de donantes cadavéricos?

IX: HIPÓTESIS:

Hasta la fecha no existen datos registrados en nuestro hospital, centro médico nacional la raza, que nos permitan investigar sobre la latencia de anticuerpos específicos contra los microorganismos que componen el síndrome de TORCH en córneas de donantes cadavéricos, aptas en lo que respecta a su biomicroscopía especular y al análisis histológico, o que dichos microorganismos estén ausentes a pesar de que las determinaciones en sangre periférica sean positivas para los mismos, tomando en consideración que es un tejido que conserva su estado avascular. Aunque la sangre infectada puede ser transferida dentro del órgano o tejido sólido vascular, es poco probable que la córnea humana pueda llevar una carga viral sustancial, incluso si se obtiene de un donante virémico debido a la naturaleza avascular de la córnea.

X: OBJETIVOS

- **General:**
Documentar la frecuencia o latencia de los microorganismos de TORCH en el tejido corneal procurado con fines de trasplante, con donante seropositivo.

- **Secundarios:**
 - Determinar el tejido corneal con ausencia de afección o latencia por TORCH, a pesar de contar con serologías positivas.
 - Determinar el tejido corneal que cuenta con serologías positivas y además latencia de TORCH en la córnea donada.
 - Describir las características morfológicas, inmunológicas e histológicas mediante inmunohistoquímica e histoquímica de los tejidos corneales procurados con fines de trasplante y reporte serológico positivo a TORCH.

XI. MATERIAL Y METODOS

Tipo de estudio:

Por la maniobra del investigador: observacional; por número de grupos: descriptivo; por número de mediciones: transversal; por forma de recolección de la información: prospectivo.

Lugar:

Hospital General la Raza servicio oftalmología departamento de banco de ojos. Laboratorio Central de Epidemiología DLVIE, CVE, CMN "La Raza",

Población de estudio:

Tejido corneal procurado que se recibe en banco de ojos con fines de trasplante con serologías positivas a TORCH en el Hospital General Dr. Gaudencio González Garza Centro Médico Nacional la Raza.

Periodo de Estudio:

Mayo del 2014 a Mayo del 2015.

Se tomarán las córneas desechadas en ese periodo de tiempo y prospectivamente se procederá a analizar las mismas.

Tamaño de la muestra: por conveniencia, del total de córneas procuradas con fines de trasplante y descartadas a trasplantarse por serología positiva a TORCH en el donador de mayo 2014 a mayo 2015.

Criterios de Selección:

-Criterios de inclusión

- Total de tejido corneal obtenido de mayo del 2014 a mayo del 2015, por procuración de donante cadavérico con fines de trasplante, con serologías positivas a TORCH, resguardadas para su análisis en el laboratorio central de epidemiología del hospital CMNR.
- Cualquier sexo.
- Cualquier edad.

-Criterios de exclusión

- Exclusiones médicas incluyendo patologías sistémicas del donante.
- Material insuficiente para su estudio.

XII. VARIABLES DEL ESTUDIO

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	UNIDADES DE MEDICIÓN
VHS-1	Virión de DNA bicatenario lineal, rodeado por una cápside icosaedrica 160 capsómeros y cubierto con una envoltura lipídica con glicoproteínas virales.	Enfermedad presente en serología del paciente o tejido procurado.	Independiente	Cualitativa nominal	Positivo o Negativo
VHS-2	Virión de DNA bicatenario lineal, rodeado por una cápside icosaedrica 160 capsómeros y cubierto con una envoltura lipídica con glicoproteínas virales.	Enfermedad presente en serología del paciente o tejido procurado.	Independiente	Cualitativa nominal	Positivo o Negativo
CMV	Forma de herpes virus, en humanos como número 5. Perteneciente a la familia Herpesviridae.	Enfermedad presente en serología del paciente o tejido procurado.	Independiente	Cualitativa nominal	Positivo o Negativo
TOXOPLASMA GONDII	Protozoo parásito, intracelular obligado, del phylum apicomplexa. Causante de la toxoplasmosis.	Enfermedad presente en serología del paciente o tejido procurado.	Independiente	Cualitativa nominal	Positivo o Negativo
RUBEOLA	Enfermedad infecciosa causada por el virus de la rubeola. Virus de ARN perteneciente al genero Rubivirus de la familia Togaviridae.	Enfermedad presente en serología del paciente o tejido procurado.	Independiente	Cualitativa nominal	Positivo o Negativo
INMUNOHIS-TOQUÍMICA	Procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de	Información sobre el anticuerpo primario que se	Independiente	Cualitativa Nominal	Positivo o Negativo

	anticuerpos que se unen específicamente a una sustancia que se quiere identificar (anticuerpo primario).	une específicamente al sustrato y se visualiza la unión en el tejido orgánico procurado.			
HISTOQUÍMICA	Estudio químico de los tejidos independientemente del método de análisis empleado, junto con el auxilio de los microscopios ópticos y electrónicos.	Identificación y localización de compuestos o radicales químicos en las células y tejidos corneales.	Independiente	Cualitativa Nominal	Positivo o Negativo
RESULTADOS DE SEROLOGÍA POSITIVA	Pruebas diagnósticas en sangre del donador para detección de infecciones activas o latentes cuyo resultado positivo es razón suficiente para excluir las corneas donadas para fines de trasplante.	Pruebas diagnósticas en sangre para detección de toxoplasma, herpes y rubeola y citomegalovirus tanto para IgG como IgM.	Independiente	Cualitativa	Positivo o Negativo

XIII. DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO

Previa aceptación del protocolo por el comité local de investigación, se realizó el estudio de investigación de la siguiente manera:

-Construcción del microarreglo de los tejidos.

Para la construcción del microarreglo de tejidos (MAT) de córneas rechazadas para trasplante, se seleccionaron casos producto de donación de córneas que se encontraban bajo el resguardo del laboratorio central de epidemiología CMN "La Raza", por consenso del subcomité de trasplante de córnea y las cuales tuvieran positiva la serología para cualquiera de los microorganismos del síndrome de TORCH. Las córneas se fijaron en formol al 4% en una proporción de formol:tejido 10:1 por 24 horas. Ya fijadas se procedió a su deshidratación total con alcohol a diferentes concentraciones de menos a más, xilol y acetona. Los tejidos deshidratados se impregnaron en parafina, se realizaron bloques y se efectuaron cortes a 4 micras de espesor, las cuales fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE), ácido peryódico de Schiff (PAS) y tricrómico de Masson (TM). Las laminillas teñidas con HE se revisaron por un oftalmo-patólogo calificado para la selección de las zonas de interés tanto de córnea central como de limbo esclero-corneal.

Las zonas de interés y de control se señalaron con punteo para cada caso, de la siguiente manera: tres zonas representativas de la córnea central y una zona de tejido de control proveniente del limbo esclero-corneal. La laminilla teñida con HE ya punteada, se colocó en el microarreglador Tissue microarray semiautomatic machine (ATA-100/ Chemicon), para hacer coincidir con el bloque original (bloque donador), con la aguja colectora se tomó un cilindro del tejido de interés punteado para implantarlo en un bloque de parafina en blanco (bloque receptor) previamente mapeado.

El bloque final se denominó microarreglo de tejido (MAT) y de éste se efectuaron cortes de 2 a 4 micras de espesor para realización de tinciones de inmunohistoquímica.

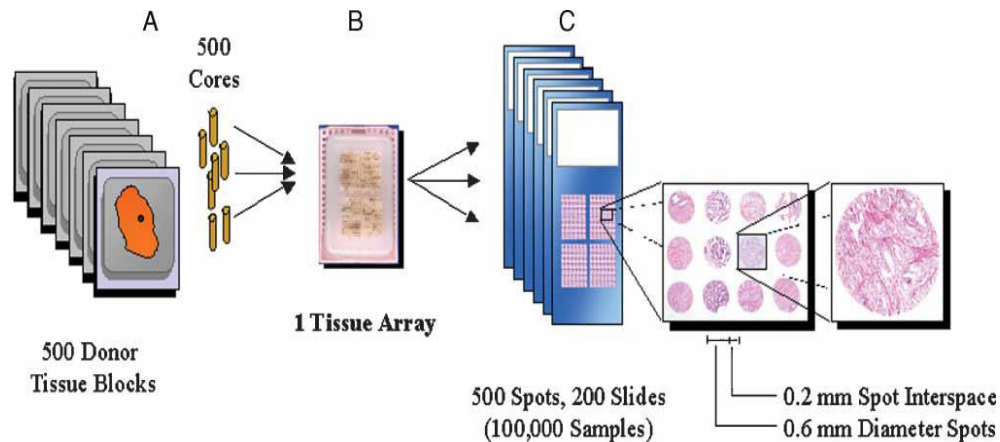
Con la finalidad de disminuir las variaciones inter-ensayo, la tinción para todos y cada uno de los anticuerpos se realizó en un solo tiempo. Los cortes se mantuvieron en una estufa bacteriológica a 62°C por toda la noche, después se inició la desparafinación en un primer baño de xilol durante toda la noche, se continuó con la desparafinación con el siguiente procedimiento: 2 baños en xileno, 2 baños en etanol al 100%, un baño en etanol al 90%, un baño en etanol al 70% y un baño en agua destilada, cada uno de ellos con duración de 8 minutos.

Ya con el tejido hidratado se procedió a la recuperación del antígeno sumergiendo en citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) y calentándose a ebullición en baño maría por 20 minutos. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 45 minutos. Se bloqueó la unión no inmunológica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en una mezcla de bloqueador universal y suero normal de cerdo al 2%.

Posteriormente, las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos anti-DR5 y anti-YY1. Después de lavar las secciones de tejido se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina y posteriormente con streptavidina conjugada a peroxidasa de rabano (HPR), por último el color se

generó mediante la adición del substrato, diamino benzidina (DAB) durante 1 a 2 minutos; se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiño con hematoxilina.

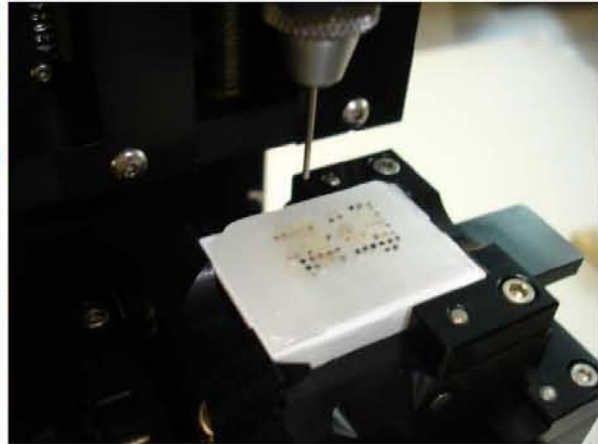
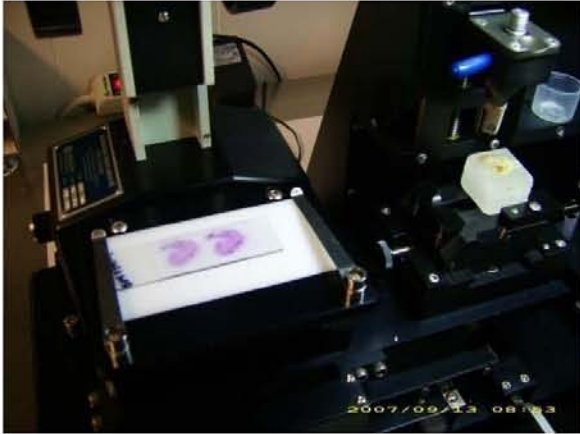
Finalmente el tejido se deshidrató bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno, con baños de 5 minutos cada uno. Las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.



-Análisis densitométrico y morfométrico:

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40). Los anticuerpos específicos a utilizar fueron: Toxoplasma gondii antibody 500 ul (Catalogo: GTX15170), Cytomegalovirus antibody [A cocktail of DDG9] 1 ml (Catalogo: GTX73690), Herpes Virus Type 1-2 (HHV-1-2) gp60/110 antibody 100 ug (Catalogo: GTX41665), Rubeola antibody 600 ul (Catalogo: GTX41660).

Las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes con el programa Imagen-Pro® Plus de Media cybernetics®, Silver Spring, MD. USA. Con el análisis densitométrico se estableció la expresión en color café total leve, moderada, intensa y total de cada anticuerpo específico para herpesvirus, citomegalovirus, rubeola y toxoplasma. Con el análisis morfométrico se estableció el porcentaje de núcleos y citoplasmas con expresión leve, moderada e intensa de cada anticuerpo específico y dependiendo de la expresión del microorganismo particular en el compartimento celular correspondiente.



XIV. ANALISIS ESTADISTICO

DESCRIPTIVO

Para las variables cualitativas se utilizaron porcentaje y frecuencias simples.

XV. APARTADO DE ASPECTOS ETICOS

RIESGO DE LA INVESTIGACION: este estudio de acuerdo a la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud es un estudio sin riesgo por lo que no requiere hoja de consentimiento informado. Por otra parte cumple con los principios éticos de investigación de justicia, beneficencia y autonomía.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO PARA LOS PARTICIPANTES Y LA SOCIEDAD:

Se trabajó con córneas que por autorización del subcomité de trasplante son derivadas a investigación, las cuales se han mantenido en resguardo desde mayo del 2014 a mayo del 2015.

El beneficio de la investigación tanto para los participantes como para la sociedad es el demostrar que en las córneas procuradas con serologías positivas a TORCH, puede demostrarse la ausencia de anticuerpos específicos contra dichos microorganismos a pesar de que las determinaciones en sangre periférica o serologías, sea positiva para los mismos, recordando que muchas de estas córneas desechadas se encuentran en condiciones anatómicas e histológicas adecuadas para un trasplante ya sea con fines ópticos o tectónicos, reforzando el conocimiento de que las mismas, conservan su nicho de privilegio inmunológico, y no por contar con serología positiva y pese a que dichos anticuerpos específicos positivos a TORCH circulan en el torrente sanguíneo, estarán presentes en el tejido corneal, reforzando que esto sucederá sólo en los casos en que haya existido una infección primaria, recordando también que la córnea es un tejido avascular, pudiéndose plantear la posibilidad de producir un mayor aprovechamiento del tejido procurado con fines de trasplante y replantearse los criterios y normativas nacionales de donación en un futuro.

En caso contrario, de que los resultados demuestren latencia de algún patógeno de índole infecciosa perteneciente al mismo síndrome, reforzar los criterios de exclusión y de selección de los tejidos donantes y así beneficiar directamente a los pacientes que se encuentran en lista de espera para un trasplante de córnea. Existe una gran mayoría de los seres humanos están infectados de manera latentemente, y la detección del patógeno en específico puede potencialmente eliminar una gran proporción de tejido verdaderamente no apto para trasplante.

RIESGOS DEL ESTUDIO PARA LOS PARTICIPANTES:

En este estudio vamos a trabajar con las córneas procuradas de los donadores cadavéricos con serologías positivas. La valoración del tejido corneal no compromete al personal que realiza su estudio debido a que se llevan a cabo las

medidas de seguridad establecidas por la institución para cualquier evaluación de cualquier tejido orgánico.

CONFIDENCIALIDAD:

La confidencialidad de la información de los participantes se garantizará mediante el resguardo de la información de donadores de córnea la cual será solamente del conocimiento del tutor de la maestría.

XVI. RECURSOS PARA EL ESTUDIO

Recursos humanos:

Residente de Oftalmología

Tutores

Procuradores corneales

Asesor metodológico

Laboratoristas

Oftalmo-patólogo especialista

Recursos materiales:

Hojas blancas, lápices, computadora, impresora, equipos y software.

Microscopio Óptico y Anticuerpos Específicos (Infraestructura y equipamientos propios de la sede).

Tejido corneal donado con serologías positivas a TORCH.

XVII. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Enero 2015	Febrero 2015	Marzo 2015	Abril 2015	Mayo 2015	Junio-Julio 2015	Ago-Septiembre 2015	Octubre 2015	Noviembre 2015
Revisión de literatura	X								
Elaboración del Marco Teórico	X								
Elaboración de protocolo	X	X							
Revisión y autorización del protocolo		X	X	X	X	X			
Registro, aprobación en CIRELSIS						X			
Realización de captura de datos de corneas donadas con serología positiva estudiadas con inmunohistoquímica e histoquímica							X		
Análisis de Datos							X		
Informe final							X	X	
Presentación de tesis									X

XVIII. RESULTADOS

Expresión de citomegalovirus, virus herpes simple, rubeola y toxoplasma. En el análisis morfométrico de los cortes del MAT de córneas rechazadas para trasplante, se demuestra una expresión nula y definitiva tanto en córnea avascular, como en limbo esclero-corneal de ambos ojos en núcleo y citoplasma de epitelio, lámina de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio, cuando se compara con los tejidos de control positivo para citomegalovirus en pulmón, virus herpes simple en mucosa oral, rubeola y toxoplasma en ganglio linfático.

Se presenta a continuación los siguientes resultados:

“Hoja de control para microarreglos de tejidos”	
Microarreglo: Córneas rechazadas para trasplante.	
Número de microarreglo: 1.	
Responsables del proyecto: Dra. Elvira González Bojórquez/ Dra. Karla Verdiguél Sotelo Oftalmología/CMN La Raza.	
Muestras: córneas con rodete esclero-corneal.	
Construido por: Dra. María de los Angeles Hernández Cueto.	

Identificación de muestras.-

CMN LA RAZA

SPOTS

1	CÓRNEA 1 OD	6
2	CÓRNEA 2 OD	6
3	CÓRNEA 3 OD	6
4	CÓRNEA 4 OD	6
5	CÓRNEA 5 OD	6

SPOTS

6	CÓRNEA 1 OI	6
7	CÓRNEA 2 OI	6
8	CÓRNEA 3 OI	6
9	CÓRNEA 4 OI	6
10	CÓRNEA 5 OI	6

OD: Ojo derecho

OI: Ojo izquierdo

HISTOQUÍMICA DE CORTES DE CÓRNEAS RECHAZADAS PARA TRANSPLANTE

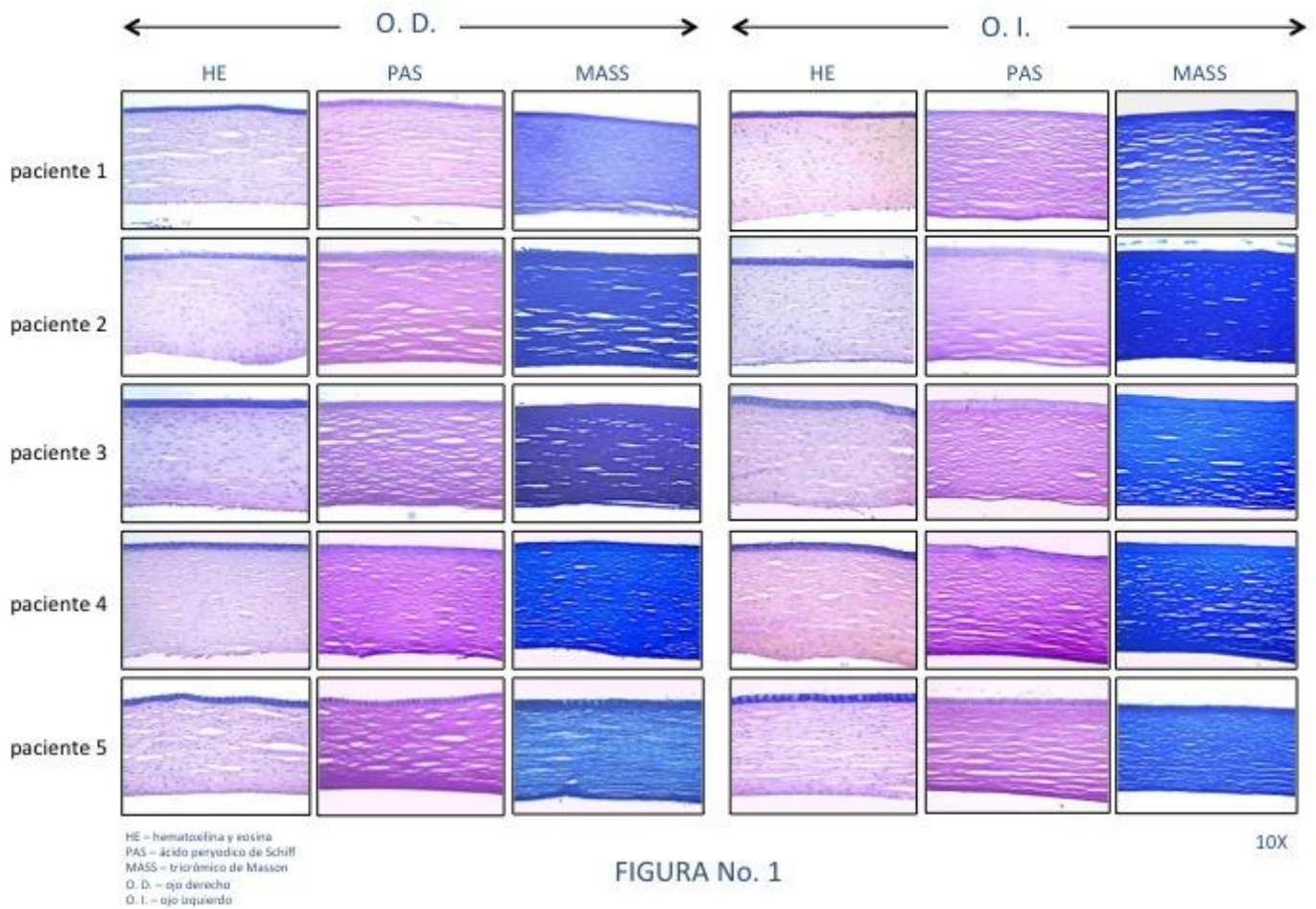


Figura No. 1

Tinciones de histoquímica en córneas rechazadas para trasplante, positivas a TORCH, teñidas con hematoxilina-eosina (HE), ácido peryodico de Schiff (PAS) y tricrómico de Masson (MASS), clasificados por paciente y ojo derecho (O. D.) – ojo izquierdo (O. I.). Las características histológicas muestran que todas las córneas se encuentran íntegras en su epitelio, lámina de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (10X).

Cabe resaltar la importancia de corroborar que dicha microanatomía de corneas rechazadas para trasplante corneal debido a serología positiva a TORCH, se encuentra completamente conservada.

MAPA ORGANIZACIONAL DE MAT DE CÓRNEAS RECHAZADAS PARA TRANSPLANTE

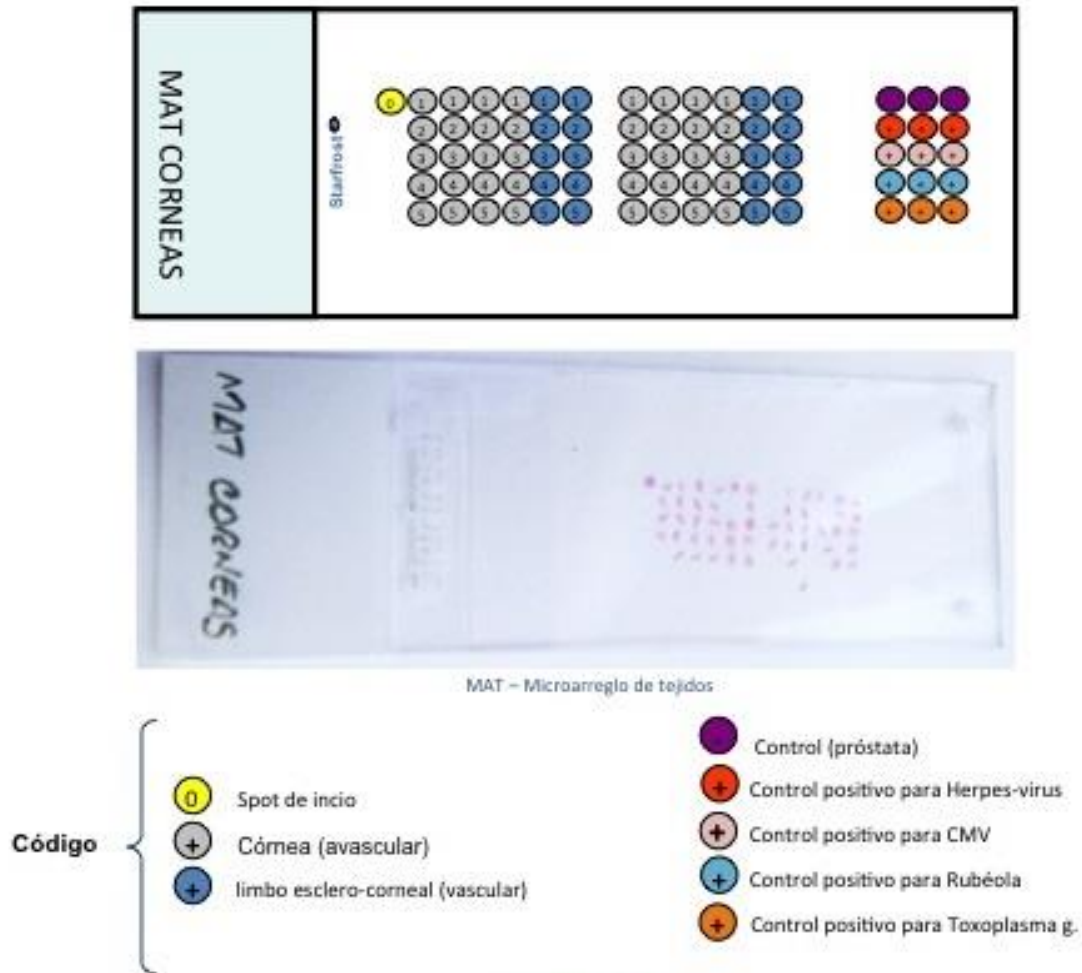


FIGURA No. 2

Figura No. 2
 Mapa organizacional y corte final del microarreglo de tejidos (MAT) de córneas rechazadas para transplante. Organización y clasificación de los sitios de interés o córnea avascular, de los controles internos o limbo esclero-corneal vascular y de los controles positivos para *Citomegalovirus* (CMV), *Herpes-virus* (VH), *Rubeola* y *Toxoplasma G.*

MAT DE CORTES DE CÓRNEAS RECHAZADAS PARA TRANSPLANTE INTEGRIDAD HISTOLÓGICA

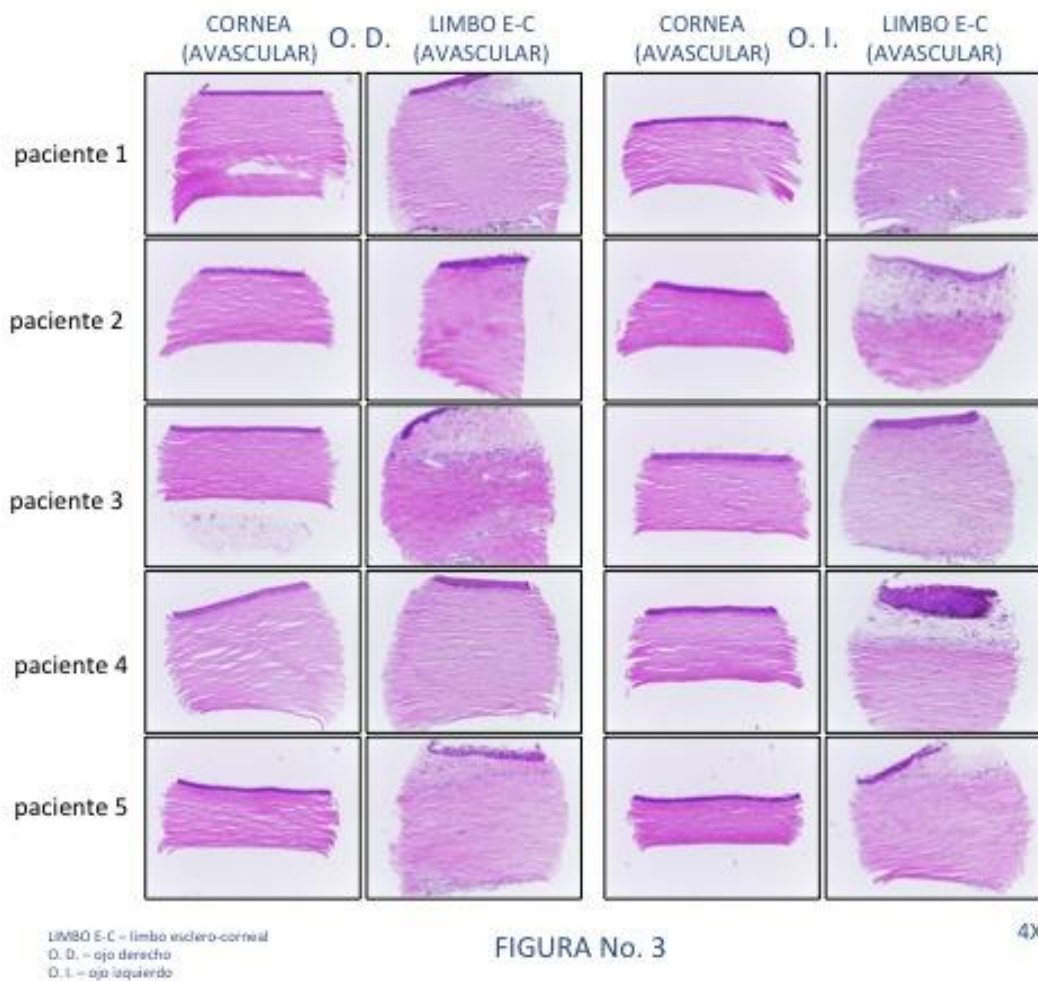


FIGURA No. 3

4X

Figura No. 3

Integridad histológica inequívoca de los tejidos incluidos en el MAT de córneas rechazadas para transplante clasificadas por paciente y por O. D. – O. I., tanto de la córnea avascular, como del limbo esclero-corneal vascular (4X).

EXPRESIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN MAT DE CORTES DE CÓRNEAS RECHAZADAS PARA TRANSPLANTE

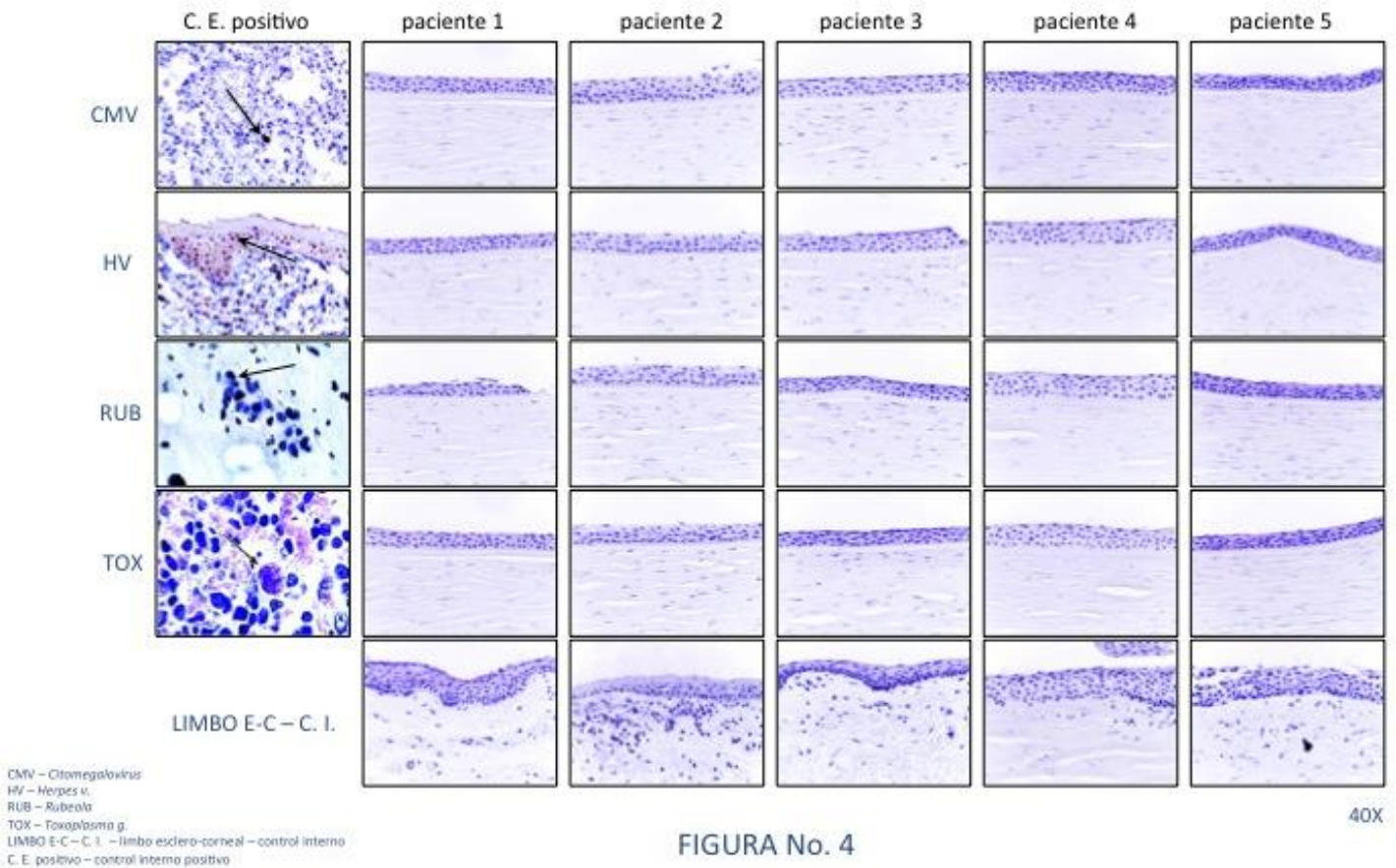


FIGURA No. 4

Figura No. 4

Expresión de las tinciones de inmunohistoquímica en MAT de córneas rechazadas para transplante clasificadas por paciente y la cual es nula para córnea avascular y nula para limbo esclero-corneal vascular cuando se compara con el control externo positivo para Citomegalovirus, Virus Herpes, Rubeola y Toxoplasma (40X).

A continuación se muestra en tablas representativas el porcentaje de expresión de Citomegalovirus, Herpes-Virus, Rubeola y Toxoplasma en MAT de cortes de córneas rechazadas para trasplante y de su tejido escleral vascular.

Paciente no.	% CMV núcleo intensidad 3	% CMV núcleo intensidad 2	% CMV núcleo intensidad 1	% CMV núcleo intensidad total	% CMV núcleo intensidad 0	suma	% CMV nuclear control positivo
P1 OD	0	0	0	0	0	100	100
P1 OI	0	0	0	0	0	100	100
P2 OD	0	0	0	0	0	100	100
P2 OI	0	0	0	0	0	100	100
P3 OD	0	0	0	0	0	100	100
P3 OI	0	0	0	0	0	100	100
P4 OD	0	0	0	0	0	100	100
P4 OI	0	0	0	0	0	100	100
P5 OD	0	0	0	0	0	100	100
P5 OI	0	0	0	0	0	100	100

Paciente no.	% CMV citoplasma intensidad 3	% CMV citoplasma intensidad 2	% CMV citoplasma intensidad 1	% CMV citoplasma intensidad total	% CMV citoplasma intensidad 0	suma	% CMV citoplasma control positivo
P1 OD	0	0	0	0	0	100	0
P1 OI	0	0	0	0	0	100	0
P2 OD	0	0	0	0	0	100	0
P2 OI	0	0	0	0	0	100	0
P3 OD	0	0	0	0	0	100	0
P3 OI	0	0	0	0	0	100	0
P4 OD	0	0	0	0	0	100	0
P4 OI	0	0	0	0	0	100	0
P5 OD	0	0	0	0	0	100	0
P5 OI	0	0	0	0	0	100	0

Paciente no.	% VH núcleo intensidad 3	% VH núcleo intensidad 2	% VH núcleo intensidad 1	% VH núcleo intensidad total	% VH núcleo intensidad 0	suma
P1 OD	0	0	0	0	100	100
P1 OI	0	0	0	0	100	100
P2 OD	0	0	0	0	100	100
P2 OI	0	0	0	0	100	100
P3 OD	0	0	0	0	100	100
P3 OI	0	0	0	0	100	100
P4 OD	0	0	0	0	100	100
P4 OI	0	0	0	0	100	100
P5 OD	0	0	0	0	100	100
P5 OI	0	0	0	0	100	100

Paciente no.	% VH citoplasma intensidad 3	% VH nuclear control positivo	% VH citoplasma intensidad	% VH citoplasma intensidad 1	% VH citoplasma intensidad total	% VH citoplasma intensidad 0	suma	% VH citoplasma control positivo
P1 OD	0	100	0	0	0	100	100	0
P1 OI	0	100	0	0	0	100	100	0
P2 OD	0	100	0	0	0	100	100	0
P2 OI	0	100	0	0	0	100	100	0
P3 OD	0	100	0	0	0	100	100	0
P3 OI	0	100	0	0	0	100	100	0
P4 OD	0	100	0	0	0	100	100	0
P4 OI	0	100	0	0	0	100	100	0
P5 OD	0	100	0	0	0	100	100	0
P5 OI	0	100	0	0	0	100	100	0

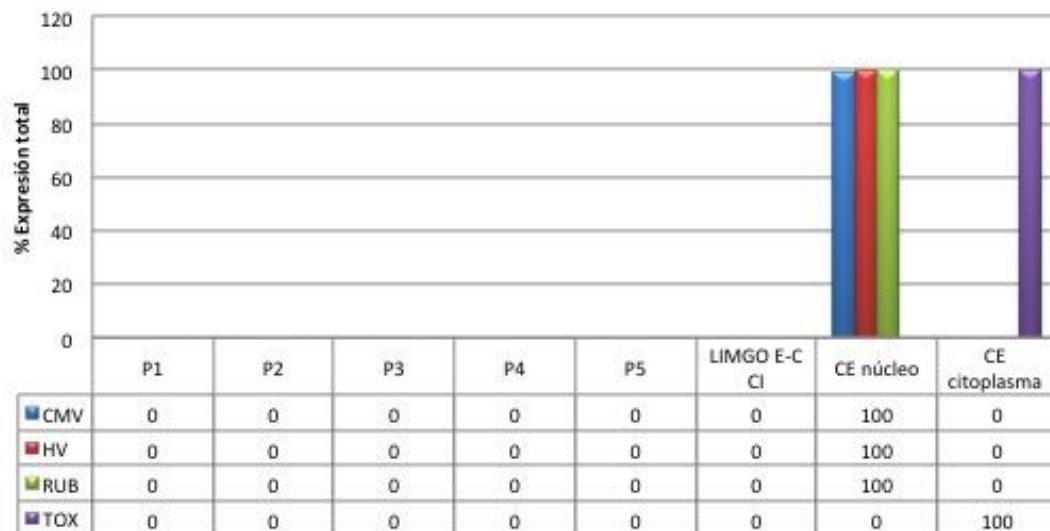
Paciente no.	% RUB núcleo intensidad 3	% RUB núcleo intensidad 2	% RUB núcleo intensidad 1	% RUB núcleo intensidad total	% RUB núcleo intensidad 0	suma
P1 OD	0	0	0	0	100	100
P1 OI	0	0	0	0	100	100
P2 OD	0	0	0	0	100	100
P2 OI	0	0	0	0	100	100
P3 OD	0	0	0	0	100	100
P3 OI	0	0	0	0	100	100
P4 OD	0	0	0	0	100	100
P4 OI	0	0	0	0	100	100
P5 OD	0	0	0	0	100	100
P5 OI	0	0	0	0	100	100

Paciente no.	% RUB nuclear control positivo	% RUB citoplasma intensidad 3	% RUB citoplasma intensidad 2	% RUB citoplasma intensidad 1	% RUB citoplasma intensidad total	% RUB citoplasma intensidad 0	suma	% RUB citoplasma control positivo
P1 OD	100	0	0	0	0	100	100	0
P1 OI	100	0	0	0	0	100	100	0
P2 OD	100	0	0	0	0	100	100	0
P2 OI	100	0	0	0	0	100	100	0
P3 OD	100	0	0	0	0	100	100	0
P3 OI	100	0	0	0	0	100	100	0
P4 OD	100	0	0	0	0	100	100	0
P4 OI	100	0	0	0	0	100	100	0
P5 OD	100	0	0	0	0	100	100	0
P5 OI	100	0	0	0	0	100	100	0

Paciente no.	% TOX núcleo intensidad 3	% TOX núcleo intensidad 2	% TOX núcleo intensidad 1	% TOX núcleo intensidad total	% TOX núcleo intensidad 0	suma
P1 OD	0	0	0	0	100	100
P1 OI	0	0	0	0	100	100
P2 OD	0	0	0	0	100	100
P2 OI	0	0	0	0	100	100
P3 OD	0	0	0	0	100	100
P3 OI	0	0	0	0	100	100
P4 OD	0	0	0	0	100	100
P4 OI	0	0	0	0	100	100
P5 OD	0	0	0	0	100	100
P5 OI	0	0	0	0	100	100

Paciente no.	% TOX nuclear control positivo	% TOX citoplasma intensidad 3	% TOX citoplasma intensidad 2	% TOX citoplasma intensidad 1	% TOX citoplasma intensidad total	% TOX citoplasma intensidad 0	suma	% TOX citoplasma control positivo
P1 OD	0	0	0	0	0	100	100	100
P1 OI	0	0	0	0	0	100	100	100
P2 OD	0	0	0	0	0	100	100	100
P2 OI	0	0	0	0	0	100	100	100
P3 OD	0	0	0	0	0	100	100	100
P3 OI	0	0	0	0	0	100	100	100
P4 OD	0	0	0	0	0	100	100	100
P4 OI	0	0	0	0	0	100	100	100
P5 OD	0	0	0	0	0	100	100	100
P5 OI	0	0	0	0	0	100	100	100

PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE CITOMEGALOVIRUS, HERPES-VIRUS, RUBEOLA Y TOXOPLASMA EN MAT DE CORTES DE CÓRNEAS RECHAZADAS PARA TRANSPLANTE



CMV – Citomegalovirus
 HV – Herpes v.
 RUB – Rubeola
 TOX – Toxoplasma g.
 C. I. – control interno
 C. E. – control externo

FIGURA No. 5

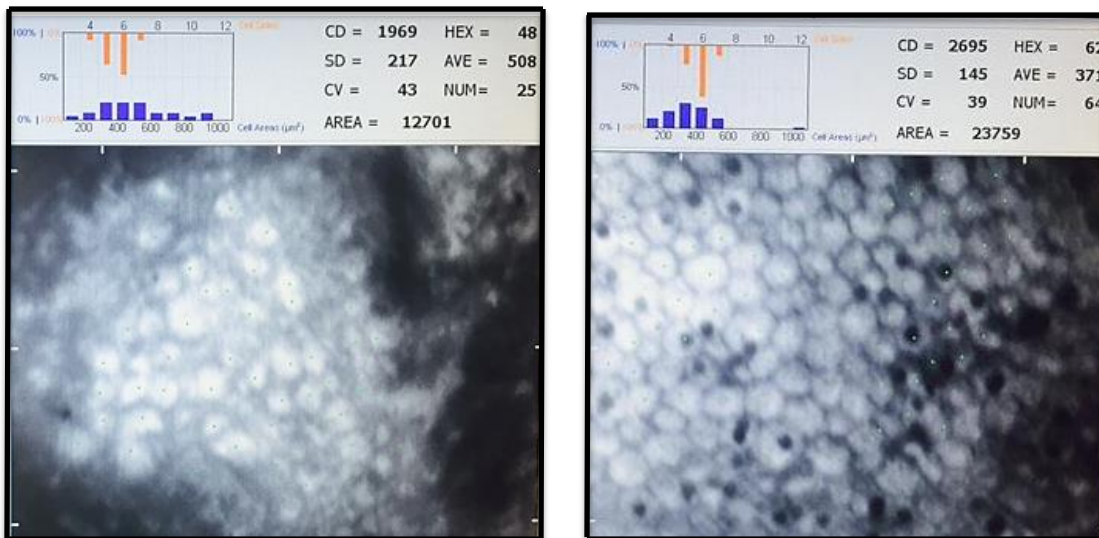
Figura No. 5

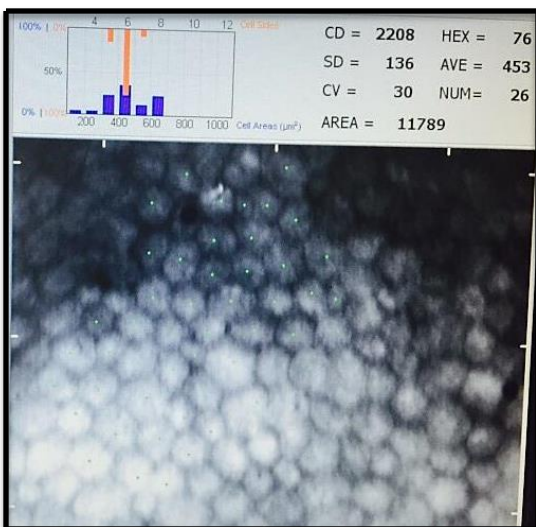
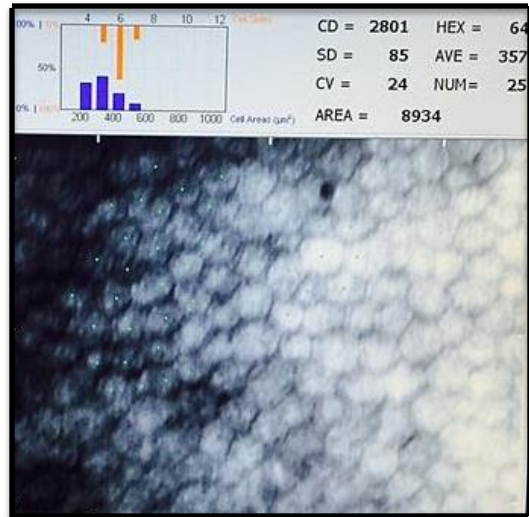
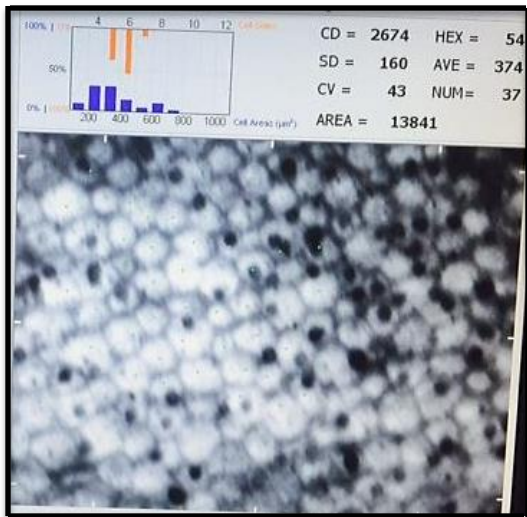
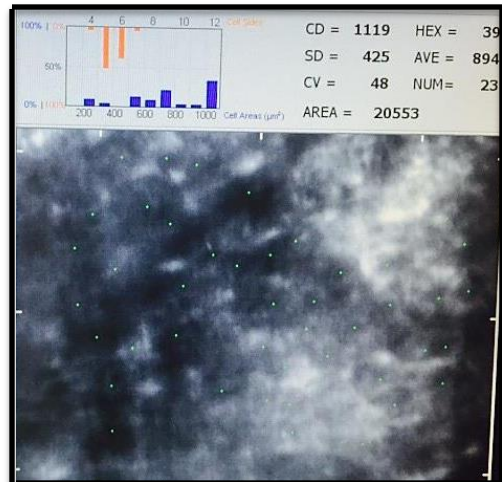
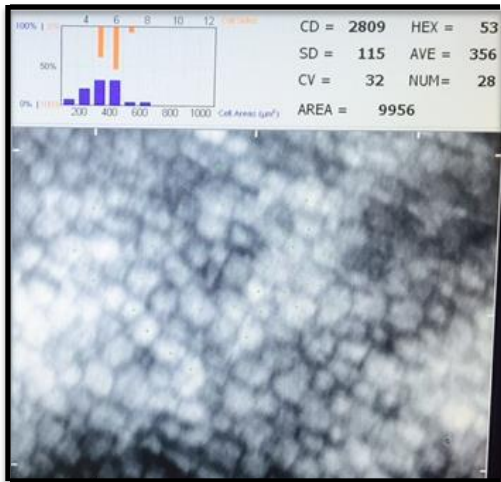
Gráfica del análisis morfométrico de la expresión en MAT de córneas rechazadas para transplante por paciente, control interno (C. I.) y control externo (C. E.) en núcleo y citoplasma. La expresión en córnea avascular y limbo esclero-corneal vascular es nula al compararse con la expresión nuclear positiva para CMV, VH y Rubeola, así como con la expresión en citoplasma positiva para Toxoplasma.

XIX. DISCUSION

En este estudio se observó que al examinarse el patrón de expresión de citomegalovirus, Herpes-Virus, Rubeola y Toxoplasma en tejidos de córneas rechazadas para trasplante, debido a su serología positiva a TORCH, organizados en un microarreglo (MAT), los resultados fueron negativos para su expresión en anticuerpos, así como haber encontrado integridad anatómica e histológica inequívoca de los mismos tejidos, replanteandonos así de ésta manera la imposición de desechar dichos tejidos. El origen de éste trabajo se basa en la integridad clínica y física de las córneas que se rechazan para trasplante, por presentar serología positiva para estos microorganismos. Sin embargo el análisis morfométrico demuestra fehacientemente la expresión negativa (% cero) con anticuerpos específicos contra CMV, HV, Rubeola y Toxoplasma tanto en córnea avascular, como en el limbo esclero-corneal vascular, sobre todo cuando en el mismo análisis se encuentra tanto expresión nuclear positiva para CMV, HV y Rubeola, como expresión en citoplasma positiva para Toxoplasma. Más aún, la permanencia de la córnea avascular, limita aún más la posibilidad de una diseminación por vía hematógica y destacando la perfecta conservación anatómica de las mismas.

Se comprobó a su vez con ayuda de la microscopia especular que la mayoría de las córneas son de adecuada calidad para ser trasplantadas, tanto por su conteo endotelial, como por su hexagonalidad y coeficiente de variación.





Microscopía specular de córneas donantes con serología positiva a TORCH.-
 CD: Densidad celular
 SD: Desviación estándar
 CV: Coeficiente de variación

XX. CONCLUSIONES

La expresión nuclear negativa en estos tejidos para CMV, VHS y rubeola, indican que no hay replicación viral y de igual forma la expresión en citoplasma negativa para toxoplasma, indica que no hay infestación por el parásito. Por tanto los títulos identificados serológicamente deben ser cuidadosamente evaluados, sobre todo cuando clínicamente no hay datos que sustenten una afección de la córnea candidata a trasplante.

Actualmente esta institución y particularmente el Servicio de Oftalmología del Centro Médico Nacional La Raza se encuentra entre las unidades con mayor número de trasplantes corneales en nuestro país, de ahí la importancia de la realización de este estudio, que nos permitió investigar sobre la latencia de anticuerpos específicos contra los microorganismos que componen el síndrome de TORCH, siendo éste el más frecuentemente encontrado en la gama de laboratoriales solicitados ya de manera protocolizada de serología de donantes cadavéricos, aptas en lo que respecta a su biomicroscopía especular y a su análisis histológico, demostrándose de ésta manera que dichos microorganismos se encuentran ausentes a pesar de que las determinaciones en sangre periférica sean positivas para los mismos.

El conocer la ausencia de dichos microorganismos infecciosos en las córneas donadas y rechazadas para trasplante, de nuestra población, pese al resultado serológico que ya se realiza de manera rutinaria, permitirá mejorar los programas nacionales e institucionales de control de calidad de los tejidos donados permitiendo así mejores porcentajes de éxito en materia de trasplante corneal.

En este estudio se demuestra que las corneas que fueron desechadas podrían ser perfectamente aptas para trasplante ya que cumplen criterios de calidad y se demuestra que no tienen riesgo de infección.

XXI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adriano Fasolo, Anna Chiara Frigo, Elisabetta Bohm, Claudio Genisi, Paolo Rama, Leopoldo Spadea, Barbara Mastropirro, Michela Fornea, Diego Ponzin, Francesco Grigoletto on behalf of the CORTES Study Group. The CORTES Study: Corneal Transplant Indications and Graft Survival in an Italian Cohort of Patients. *Cornea* 2006;25:507–515.
2. American Academy of Ophthalmology; Curso de Ciencias Básicas y Clínicas; Enfermedades externas y Córnea, sección 8. AAO Estados Unidos de Norteamérica. 2007-2008; 453-475
3. Trasplante de córnea, Rodrigo donoso r., kant vargas t., felipe vega g., Guías Clínicas, Sociedad Chilena de Trasplante
4. Miryam Karina González-Pérez,¹ Rolando Neri-Vela,² Roberto Quintero-Castañón. El trasplante de córnea en México. Antecedentes históricos. *Revista Mexicana de Oftalmología* 2012;86(4):187-190.
5. Hurí Hawa-Montiel/ Trasplante de córnea. Criterio clínico quirúrgico. *Revista de investigación clínica/ Vol. 57, Num. 2/ Marzo-Abril 2005/ pp 358- 367.*
6. Gutiérrez Salinas José, Historia del trasplante de córneas y los medios para su preservación. *Med Int Mex.* 2005; 21: 380-385.
7. Dueñas Soto Claudia, La cultura de donación de órganos y tejidos en el hospital general de Pachuca hidalgo, instituto de ciencias humanas y sociales. 2005. 160 páginas.
8. Hurí Hawa-Montiel/ Trasplante de córnea. Criterio clínico quirúrgico. *Revista de investigación clínica/ Vol. 57, Num. 2/ Marzo-Abril 2005/ pp 358- 367.*
9. Walter Adolfo Querevalú-Murillo, Procuracion de córneas por donación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48(3): 233-236.
10. Guía de Practica Clínica. Queratoplastia Penetrante. Evidencias y Recomendaciones. IMSS-541-11. Secretaria de Salud 2011.
11. González-Pérez Miryam Karina,¹ Rolando Neri-Vela,² Roberto Quintero-Castañón. El trasplante de córnea en México. Antecedentes, Históricos *Revista Mexicana de Oftalmología* 2012;86(4):187-190
12. Walter Adolfo Querevalú-Murillo, Procuracion de córneas por donación. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2010; 48(3): 233-236.
13. Elizabeth Escalona Leyval; Madelyn Jareño Ochoall; Silvia López, HernándezIII; Alexeide de la C. Castillo PérezIV; Zaadia Pérez ParraV; Urbano Rodríguez de PazVI. Comportamiento de los trasplantes de córnea en el Instituto Cubano de Oftalmología "Ramón Pando Ferrer" (enero-noviembre de 2006) *Revista Cubana de Oftalmología* 2009,22(Sup) 247-57.
14. Asim V Farooq and Deepak Shukla,^{1,2} ¹Department of Ophthalmology & Visual Sciences, College of Medicine, University of Illinois at Chicago, Chicago, IL 60612, USA. Corneal latency and transmission of herpes simplex virus-1, *Future Virol* 2011 January; 6(1): 101–108. doi:10.2217/fvl.10.74.

15. Bedford Park, South Australia 5042. Corneal transplantation and infectious hepatitis. *British Journal of Ophthalmology* 1995; 79: 2. Department of Ophthalmology, Flinders Medical Centre.
16. Hung Ming Lee, M.B., B.S., M.Med.(Ophth.), F.R.C.S.(Ed.), F.A.M.S.(Ophth.), Detection of Hepatitis C Virus in the Corneas of Seropositive Donors. 2001 Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia.
17. Ellen Heck, MT, ASCP, MA, CEBT,* Allen Brown, BS, CTBS,* and H. Dwight Cavanagh, MD, PhD, FACS. Nucleic Acid Testing and Tissue Safety: An Eye Bank's Five-Year Review of HIV and Hepatitis Testing for Donor Corneas. *Cornea*, Volume 32, Number 4, April 2013.
18. Pierre-Yves Robert,^{1,2} Jean-Paul Adenis,¹ Francois Denis,² Sophie Alain,² and Sylvie Ranger-Rogez². Herpes Simplex Virus DNA in Corneal Transplants: Prospective Study of 38 Recipients. *Journal of Medical Virology* 71:69–74 (2003).
19. David P. Kennedy, MD¹, Christian Clement, PhD¹, Richard L. Arceneaux, MD¹, Partha S. Bhattacharjee, DVM, PhD^{1,2}, Tashfin S. Huq, BS². Ocular HSV-1: Is the Cornea a Reservoir for Viral Latency or a Fast Pit Stop? *Cornea*. 2011 March ; 30(3): 251–259.
20. Min Xu*, Andrew J. Lepisto*, and Robert L. Hendricks². CD154 Signaling Regulates the Th1 Response to Herpes Simplex Virus-1 and Inflammation in Infected Corneas. *J Immunol*. 2004 July 15; 173(2): 1232–1239.
21. A. Pruss¹, G. Caspari², D.H. Kru"ger³, J. Blu"mel⁴, C.M. Nu"bling⁴, L. Gu"rtler⁵, W.H. Gerlich. Tissue donation and virus safety: more nucleic acid amplification testing is needed. *Transpl Infect Dis* 2010; 12: 375–386.
22. Orhan Aydemir¹ Peykan Tu"rkcu"og lu ¹ Yasemin Bulut² Ahmet Kalkan³. The relationship of graft survival and herpes simplex virus latency in recipient corneal buttons. *Clinical Ophthalmology* 2007;1(2) 127–131.
23. S Biswas, P Suresh, R E Bonshek, G Corbitt, A B Tullo, A E A Ridgway. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol* 2000;84:701–705.
24. B Elske van Gelderen, Allegonda Van der Lelij, W Frits TreVers, Ruth van der Gaag. Detection of herpes simplex virus type 1, 2 and varicella zoster virus DNA in recipient corneal buttons. *Br J Ophthalmol* 2000;84:1238–1243.
25. Salahuddin SZ, Palestine AG, Heck E, et al. Isolation of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type III from the cornea. *Am J Ophthalmol* 1986;101:149-152
26. Johnson BL, Holzman AE. Ultrastructure of human immunodeficiency virus in corneal epithelial scraping. *Am J Ophthalmol* 1992;104:633-634
27. Conway MD, Insler MS. The identification and incidence of human immunodeficiency virus antibodies and hepatitis B virus antigens in corneal donors. *Ophthalmology* 1988;95:1463-1467
28. O`Day DM. Diseases potentially transmitted through corneal transplantation. *Ophthalmology* 1989;96:1133-1138

29. Goldberg MA, Laycock KA, Kinard S, et al. Poor correlation between reactive syphilis serology and human immunodeficiency virus testing among potential cornea donors. *Am J Ophthalmol* 1995;119:1-6
30. Garcia-Ferrer FJ, Laycock KA, Buerger DG, et al. Screening corneas for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA by polymerase chain reaction. *Am J Ophthalmol* 1995;119:7-13
31. F McCarthy,¹ A Fletcher,¹ N Dennis,¹ C Cummings,¹ H O'Donnell,² J Clark,¹ P Flohr,¹ R Vergis,² S Jhavar,² C Parker,² C S Cooper¹. An improved method for constructing tissue microarrays from prostate needle biopsy specimens. *J Clin Pathol* 2009;62:694–698. doi:10.1136/jcp.2009.065201.
32. Joseph Nariculam¹ , Alex Freeman² , Simon Bott¹ , Phillipa Munson³ , Noriko Cable⁴ , Nicola Brookman-Amis¹ , Magali Williamson¹ , Roger S. Kirby⁵ , John Masters¹ , Mark Feneley¹. Utility of tissue microarrays for profiling prognostic biomarkers in clinically localized prostate cancer: the expression of BCL-2, E-cadherin, Ki-67 and p53 as predictors of biochemical failure after radical prostatectomy with nested control for clinical and pathological risk factors. *Asian Journal of Andrology* (2009) 11: 109–118/ 2009 AJA, SIMM & SJTU.
33. JianYu Rao, M.D.¹, David Seligson, Harri Visapaa. Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-Cadherin in urothelial carcinoma. Department of pathology and laboratory medicine, university of california at los angeles california, cáncer, september 15, 2002/ volumen 95/ number 6.

XXII. ANEXOS

-INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN

FOLIO TEJIDO	FECHA PROCURACION	PROCEDENCIA	NOMBRE DONANTE Y NSS	EDAD DONANTE	CONTEO ENDOTELIAL	SEROLOGIA

-CONSENTIMIENTO INFORMADO



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN
Y POLITICAS DE SALUD
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO
(ADULTOS)**

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN

Nombre del estudio:	ESTUDIO DE INMUNOHISTOQUIMICA E HISTOQUIMICA EN TEJIDO CORNEAL CON FINES DE TRASPLANTE CON SEROLOGIA POSITIVA A TORCH. EXPERIENCIA EN CENTRO MEDICO NACIONAL LA RAZA.
Patrocinador externo (si aplica):	
Lugar y fecha:	México Distrito Federal , a _____ del mes de _____ del 2015
Número de registro:	
Justificación y objetivo del estudio:	Sr. _____ por medio de la presente le solicitamos su autorización para que al tejido de donación de su familiar, se le pueda realizar un estudio que se llama Inmunohistoquímica e Histoquímica que consiste en hacer tinciones y anticuerpos que busquen la presencia de microorganismos infecciosos en el tejido donado. Esto es importante, ya que con ello lograremos un control de calidad y de los tejidos con fines de trasplante y así con ello dar mayor garantía de éxito en el trasplante.
Procedimientos:	El estudio consiste en tomar una pequeña porción del tejido corneal y se contendrá en parafina y posteriormente se le realizarán tinciones especiales la cuales se analizarán por un medico patólogo oftalmólogo y se le agregarán sustancias (anticuerpos) que demostrarán la presencia o ausencia de microorganismos
Posibles riesgos y molestias:	Ninguna, ya que el estudio se realizará con remanentes del tejido donado.
Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:	Ninguno , ya que el seguimiento será al tejido y no directamente a su familiar
Información sobre resultados y alternativas de tratamiento:	Si usted así lo desea, informaremos si existe o no la presencia de microorganismos en el tejido donado.
Participación o retiro:	Usted puede negarse a en cualquier parte del estudio a que se le hagan las pruebas inmunohistoquímica e histoquímica y de cualquier forma seguirá con el proceso de donación al que usted aceptó.
Privacidad y confidencialidad:	Se le garantiza que no se identificará a su familiar en ningún caso por nombre o número de seguridad social y sus resultados solo los podrá conocer el grupo de investigadores.
En caso de colección de material biológico (si aplica):	
<input type="checkbox"/>	No autoriza que se tome la muestra.
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra solo para este estudio.
<input type="checkbox"/>	Si autorizo que se tome la muestra para este estudio y estudios futuros.
Disponibilidad de tratamiento médico en derechohabientes (si aplica):	No aplica
Beneficios al término del estudio:	Se podrá saber la presencia o no de microorganismos en el tejido de donación.
En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse a:	
Investigador Responsable:	<u>Dra. Karla Verdiguél Sotelo</u>
Colaboradores:	<u>Dra. Elvira González Bojórquez</u>

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del sujeto

Testigo 1

Nombre, dirección, relación y firma

Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 2

Nombre, dirección, relación y firma

Clave: 2810-009-013

CONSENTIMIENTO INFORMADO