



**Universidad de Valladolid**



**MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VISIÓN**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER:**

**Detección y prevalencia de córneas donantes  
positivas para ADN de herpesviridae en  
queratoplastias realizadas en el Hospital Clínico  
Universitario de Valladolid de octubre de 2019 a  
marzo de 2022**

Presentada por Sebastián Alfonso Martínez Tapia

Dirigida por:

José María Herreras Cantalapiedra

Fecha:

Julio de 2022

## Índice

1. Listado de abreviaturas	3
2. Curriculum vitae	4
3. Resumen	7
4. Abstract	7
5. Introducción	
5.1. Estructura y función de la córnea	8
5.2. Privilegios inmunológicos de la córnea para el trasplante	9
5.3. Trasplante de córnea. Evolución y clasificación	10
5.4. Fracaso del injerto corneal	11
5.5. Familia herpesviridae y patología ocular	12
5.6. Latencia corneal del virus herpes simple	13
5.7. Transmisión de virus herpes de donante a receptor	14
5.8. Justificación	15
6. Hipótesis	16
7. Objetivos	
7.1. Objetivo general	16
7.2. Objetivo específico	16
8. Materiales y métodos	17
9. Resultados	18
10. Discusión	19
11. Conclusiones	22
12. Bibliografía	22

## 1. Listado de abreviaturas

QPP: queratoplastia penetrante.

DALK: queratoplastia lamelar anterior profunda.

SALK: queratoplastia lamelar anterior superficial.

QE: queratoplastia endotelial.

DSAEK: queratoplastia endotelial automatizada con disección de la membrana de Descemet.

DMEK: queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet.

FPI: fracaso primario del injerto.

VHS-1: virus herpes simple tipo 1

VHS-2: virus herpes simple tipo 2

VVZ: virus varicela zoster

VEB: virus Epstein Barr.

CMV: Citomegalovirus.

HVH-6: virus herpes humano tipo 6

HVH-7: virus herpes humano tipo 7

HVH-8: virus herpes humano tipo 8

HVEM: mediadores de entrada de herpesvirus.

PILR $\alpha$ : receptor emparejado tipo inmunoglobulina  $\alpha$ .

LATs: transcriptasas asociadas a latencia.

PCR: reacción en cadena de polimerasa.

ISH: hibridación in situ.

PCR-RT: reacción en cadena de polimerasa en tiempo real.

IOBA: Instituto universitario de oftalmobiología aplicada.

PBS: tampón fosfato salino.

VIH: virus de inmunodeficiencia humana.

VHB: virus hepatitis B.

### 3. Resumen

**Introducción.** Determinamos la prevalencia de virus herpes simple tipo 1 (VHS-1), virus herpes simple tipo 2 (VHS-2), virus varicela zoster (VVZ), Virus Epstein Barr (VEB) y citomegalovirus (CMV) en tejido de corneas donantes utilizadas en procedimientos de queratoplastia en el Hospital clínico universitario de Valladolid de octubre de 2019 a marzo de 2022.

**Métodos.** Se obtuvo las muestras de tejido corneal donante del banco de tejidos de Castilla y León, utilizadas en los procedimientos de queratoplastia de 49 pacientes (49 muestras de espesor corneal total y 49 muestras de endotelio). Se analizó la presencia de ADN viral a través de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR-RT) para VHS-1, VHS-2, VVZ, VEB y CMV.

**Resultados.** La prevalencia global de muestras positivas fue de 2.05% (2 de 98 muestras), 1 de espesor corneal total (1,025%) y 1 de endotelio donante (1,025%). VHS-2 fue el único virus que resultó positivo en las muestras analizadas. El resto de los análisis de PCR realizados para los otros herpesvirus resultó negativo en todas las muestras.

**Conclusiones.** Los datos presentados en este estudio corresponden a la primera determinación de casos positivos en una muestra de población española y determinan una baja prevalencia de ADN de herpesvirus en tejido corneal donante. La utilidad del cribado para herpesvirus en muestras de tejido corneal donante sería limitada, dada su baja prevalencia, no obstante, se requieren más estudios para dilucidar su real utilidad en este contexto.

**Palabras claves:** prevalencia, queratoplastia, reacción en cadena de polimerasa, cribado.

### 4. Abstract

**Introduction.** We determined the prevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2), varicella zoster virus (VZV), Epstein Barr virus (EBV) and cytomegalovirus (CMV) in tissue of donor corneas used in keratoplasty procedures at the University Clinical Hospital of Valladolid from October 2019 to March 2022.

**Methods.** Donor corneal tissue samples were obtained from the tissue bank of Castilla y León, used in the keratoplasty procedures of 49 patients (49 samples of total corneal thickness and 49 samples of endothelium). The presence of viral DNA was analyzed through real-time polymerase reaction (PCR-RT) for HSV-1, HSV-2, VZV, EBV and CMV.

**Results.** The global prevalence of positive samples was 2.05% (2 of 98 samples), 1 of total corneal thickness (1,025%) and 1 of donor endothelium (1,025%). HSV-2 was the only virus that was positive in the samples analyzed. The rest of the PCR analyzes performed for the other herpesviruses were negative in all samples.

**Conclusions.** The data presented in this study correspond to the first determination of positive cases in a sample of the Spanish population and determine a low prevalence of herpesvirus DNA in donor corneal tissue. The usefulness of herpesvirus screening in donor corneal tissue samples would be limited, given its low prevalence, however, more studies are required to elucidate its real usefulness in this context.

**Keywords:** prevalence, keratoplasty, polymerase chain reaction, screening.

## 5. Introducción

La córnea es un tejido altamente diferenciado, transparente y avascular, corresponde al sexto anterior de la capa fibrosa más superficial del globo ocular con función de protección y refractiva que contribuyen a la función visual<sup>1</sup>. Numerosas condiciones tales como patologías degenerativas, distróficas, infecciosas o traumáticas pueden comprometer la transparencia de este tejido. Las enfermedades corneales corresponden a la tercera causa de ceguera a nivel mundial luego de las cataratas y el glaucoma<sup>2</sup>. Una vez que se pierde la transparencia de la córnea el trasplante es la intervención terapéutica actual de elección con el objetivo de restablecer la agudeza visual.

### 5.1. Estructura y función de la córnea

La córnea humana histológicamente consta de 6 capas. El epitelio superficial se compone de tejido epitelial formado por diversas capas celulares de epitelio escamoso estratificado no queratinizado (5 a 7 capas de células en la zona central que aumenta a 7 a 10 en la periferia) tiene un grosor aproximado de 50 micras y encontramos tres tipos celulares: células superficiales, células aladas y células basales. La segunda capa corresponde a la membrana de Bowman, corresponde a una capa de tejido transparente acelular, formada por fibras de colágeno I y V y proteoglicanos, mide aproximadamente 12 micras y no tiene capacidad de regeneración. El estroma constituye la capa de mayor grosor, corresponde

aproximadamente al 80-85% del espesor corneal, mide alrededor de 500 micras y está compuesto por queratocitos, glucosaminoglicanos y lamelas de colágeno que están en mayor proporción en el estroma anterior que en el posterior. La capa de Dua tiene un grosor de 10-15  $\mu\text{m}$  y se mantiene muy adherida a las fibras del estroma, no hay queratocitos en esta capa y es impermeable al aire. La membrana de Descemet es una capa elástica de tejido membranoso de aproximadamente 7 micras que se engrosa con la edad pudiendo llegar a las 10 micras en la adultez, tiene la capacidad de regenerarse y provee una base para las células endoteliales, que corresponde a una monocapa de células hexagonales dispuestas en forma de panal de abeja, con un grosor aproximado de 10 micras y está en contacto directo con el humor acuoso. Cumple un rol clave en mantener la transparencia corneal y en la nutrición e intercambio de desechos del tejido corneal. El endotelio no es capaz de regenerarse por lo que la densidad de células disminuye a través del tiempo<sup>3</sup>.

Las principales funciones de la córnea son la creación de una barrera protectora frente a antígenos y la convergencia refractiva de los rayos incidentes contribuyendo al sistema óptico ocular, siendo el medio de mayor potencia dióptrica de éste (aporta entre 40-44 dioptrías, lo que corresponde aproximadamente al 70%)<sup>3</sup>.

## **5.2. Privilegios inmunológicos de la córnea para el trasplante**

La córnea es un tejido privilegiado desde el punto de vista inmunológico, lo que da como resultado una respuesta inflamatoria reducida luego del trasplante, debido a la ausencia de vasos sanguíneos eferentes y linfáticos aferentes de la córnea receptora, la ausencia de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y a la desviación inmune asociada a la cámara anterior<sup>4</sup>.

Las propiedades anatómicas de la córnea la transforman en un tejido con gran capacidad de adaptación en relación a las distintas técnicas de trasplante. La mayoría de los homoinjertos corneales sobreviven a pesar del grado de histocompatibilidad antigénica. Los antígenos se vuelven menos vulnerables al cabo de unos pocos meses debido a: modificaciones del receptor, la creación de un bloqueo de anticuerpos, la barrera de cicatrización que se produce entre el donante y el receptor que dificulta el contacto de los antígenos de uno con los linfocitos del otro. A pesar de esto, la reacción inmunológica se produce con cierta frecuencia y corresponde a la primera causa de rechazo en estos trasplantes<sup>4</sup>.

### 5.3. Trasplante de córnea. Evolución y clasificación.

Himly fue el primero en mencionar el concepto del trasplante corneal en 1813, sin embargo, no fue hasta 1886 hasta que se realizó el primer trasplante por Von Hippel, donde se reemplazó tejido corneal humano enfermo por cornea de conejo. Fuchs fue el primero en realizar una queratoplastia lamelar con pobres resultados. En 1905 Zirm realizó la primera queratoplastia exitosa<sup>1</sup>.

La queratoplastia se puede realizar buscando diferentes objetivos y en base a eso se puede clasificar en 3 tipos: terapéutica, tectónica y óptica. La queratoplastia terapéutica es realizada para eliminar una porción de córnea infectada principalmente en casos de queratitis infecciosas perforadas o resistentes a tratamiento. La queratoplastia tectónica provee soporte y mantiene la integridad del globo ocular. La queratoplastia óptica tiene como objetivo recuperar la visión, es en este campo donde se han realizado la mayor cantidad de avances que han permitido que la agudeza visual posoperatoria sea cada vez mejor<sup>1</sup>.

Existen varios tipos de trasplante de córnea según su extensión: queratoplastia penetrante (QPP): Es la forma de trasplante de córnea tradicional, en la cual se sustituye la totalidad del espesor de la córnea a través del injerto de un botón corneal. Queratoplastia lamelar, donde encontramos dos tipos de técnicas: Queratoplastia lamelar anterior profunda (DALK) y queratoplastia lamelar anterior superficial (SALK): solo se sustituyen las capas más externas de la córnea: una porción del estroma, membrana de Bowman y epitelio. Su ventaja es la disminución del índice de rechazo, ya que no existe la posibilidad de rechazo endotelial que es el problema más común de rechazo en la queratoplastia penetrante. Queratoplastia endotelial (QE): Esta forma de trasplante consiste en la sustitución del endotelio dañado por endotelio sano del donante. Encontramos 2 tipos de técnicas: la queratoplastia endotelial automatizada con disección de la membrana de Descemet (DSAEK): se reemplaza sólo la capa posterior de la córnea (membrana de Descemet y endotelio). En esta técnica, se obtiene el tejido donante a través de una queratotomía realizada con un microqueratomo. Con esta técnica se permite obtener resultados refractivos mucho más controlados, disminuyendo el astigmatismo y consiguiendo así mismo una reducción del tiempo de recuperación postoperatorio. Queratoplastia endotelial de la membrana de Descemet (DMEK): Es un procedimiento de trasplante parcial donde se elimina de manera selectiva la capa endotelial celular enferma y se sustituye por una sana extraída del donante. Permite trasplantar únicamente las capas más internas de la córnea (endotelio), sin afectar a las capas medias. Esta técnica proporciona al paciente una excelente restauración anatómica y alto grado de

rehabilitación visual. El mayor inconveniente que se puede presentar corresponde al riesgo de desprendimiento del injerto en el postoperatorio inmediato<sup>1</sup>.

#### **5.4. Fracaso del injerto corneal**

Se define fracaso de injerto corneal como toda causa de opacificación del tejido trasplantado, este puede ser primario (FPI) que corresponde a la presencia de edema difuso del trasplante corneal durante posoperatorio inmediato (14 días) y que persiste a pesar de tratamiento médico máximo, o secundario que es aquel que ocurre posterior a este tiempo<sup>5</sup>. No hay factores de riesgo definidos para esta condición en la mayoría de los casos, pero se han postulado ciertas etiologías relacionadas con el donante, como por ejemplo, tejido donante dañado (daño endotelial durante la extracción del tejido donante o durante su almacenamiento, tiempo prolongado desde la muerte a la extracción del tejido o tiempo de almacenamiento prolongado) y también condiciones relacionadas al receptor como por ejemplo (patologías hematológicas, presencia de cuerpos extraños en cirugía lamelar). La pericia del cirujano también podría influir en la aparición de esta complicación. El FPI se presenta con más frecuencia en procedimientos realizados por cirujanos que hayan realizado menos de 15 intervenciones<sup>6</sup>. Un estudio de cohortes demostró que la incidencia de FPI post QPP fluctúa entre 0 y 12% y entre 0 y 29% en caso de QE<sup>7</sup>.

Un estudio reciente de la “Eye Bank Association of America” que incluyó 354.930 trasplantes realizados en los EE.UU. informó una incidencia de FPI en 9 de cada 10000 casos: 56% en caso de QE, 42% en caso de QPP y 1% en caso de DALK<sup>8</sup>.

Esta mayor prevalencia de FPI en QE podría ser explicada por la dificultad en el manejo de los tejidos en esta técnica y en una curva de aprendizaje más alta que en la QPP. Deng et. al. reportó una tasa promedio de FPI en DMEK de 1.9% (0% a 12.5%) en comparación, con DSAEK que osciló entre 0% y 29%, con un promedio de 5%<sup>7</sup>.

La incidencia de fracaso del injerto corneal varía respecto a la indicación primaria para el trasplante, siendo las de peor desempeño las queratoplastias indicadas posterior a un traumatismo y a las indicadas en el tratamiento de queratitis herpéticas severas y/o recidivantes<sup>9</sup>.

Una vez que se hace un diagnóstico de fracaso del injerto, el único tratamiento posible es el retrasplante. Los casos de sospecha de FPI deben observarse durante al menos 3 a 4 semanas para detectar signos de mejoría antes de plantearse la posibilidad de un nuevo procedimiento.

## 5.5. Familia herpesviridae y patología ocular

Los virus de la familia herpesviridae, conocidos como herpesvirus, son una familia de virus con material genético de tipo ácido dextrirribonucleico (ADN) responsables de múltiple patología infecciosa en el ser humano. Su principal particularidad es la capacidad de permanecer en estado de latencia tras la primoinfección y generar episodios de recurrencias posteriores.

Se han identificado 8 virus de esta familia: Virus Herpes simplex 1 (VHS-1), Virus Herpes simplex 2 (VHS-2), Virus Varicela zoster (VVZ), Virus Epstein Barr (VEB), Citomegalovirus (CMV), Herpes virus humano 6 (HVH-6), Herpes virus humano 7 (HVH-7) y Herpes virus humano 8 (HVH-8).

A su vez la familia herpesviridae incluye a tres subfamilias: Alfa-herpesviridae donde se incluyen los VHS-1, VHS-2 y VVZ los cuales poseen un ciclo replicativo corto, crecen rápido en cultivo viral y permanecen latentes en las neuronas de los ganglios sensoriales. Los Beta-herpesviridae tienen un ciclo replicativo largo, pertenecen a esta subfamilia el CMV, HVH-6 y HVH-7, poseen un crecimiento lento en cultivo y generan aumento del tamaño celular al infectar. Son capaces de generar latencia en monocitos en el caso del CMV, linfocitos T en el caso de HVH-7 y en ambos tipos celulares en el caso de HVH-6. La subfamilia Gamma-herpesviridae incluye al VEB y al HVH-8 y se caracterizan porque tanto su infección como estado de latencia ocurren en los linfocitos B.

Los herpesvirus tienen un tamaño entre 150-200 nm, más de 30 proteínas estructurales, una nucleocápside icosaédrica de 100 nm. de diámetro con 162 capsómeros y múltiples proyecciones en su cubierta. El material genético corresponde a una doble cadena de ADN de 120 a 230 kb. La parte más compleja de su ciclo replicativo acontece en el núcleo de la célula y la destrucción de la célula infectada se acompaña de la liberación de múltiples viriones infectivos<sup>10</sup>.

Se postula que el virus herpes simple (VHS) es una causa importante de ceguera infecciosa en el mundo desarrollado<sup>11</sup>. El ser humano corresponde a su único reservorio y está ampliamente distribuido en la población mundial. Un alto porcentaje de los casos de morbilidad ocular asociada a los herpesvirus se relacionan con las recurrencias de la infección. La primoinfección en general suele ser asintomática. Las recurrencias también representan la mayoría de las tasas de incidencia anual de los principales estudios epidemiológicos publicados. La reactivación se puede desencadenar por múltiples factores, como por ejemplo el estrés, la radiación ultravioleta y la fiebre. La mayoría de los adultos tienen seropositividad para VHS-1 y los estudios realizados con PCR sugieren que casi toda la población tiene una

infección latente en las neuronas sensoriales. Curiosamente el virus es capaz de transmitirse a través de lágrimas de individuos asintomáticos, aumentando la posibilidad que este pueda residir en la córnea en un estado de baja infectividad<sup>12</sup>. La mayoría de los tratamientos antivirales tienen como mecanismo de acción fundamental inhibir la replicación viral, por tanto, su utilización reduce en muy bajo porcentaje la aparición de recurrencias.

La entrada del VHS al tejido ocular puede ocurrir por exposición exógena o por reactivación viral donde el virus viaja desde el tejido neural hacia el sitio de infección. La primoinfección suele afectar a la conjuntiva. El mecanismo de entrada a las células del tejido ocular está mediado por receptores glucoproteicos de superficie incluyendo: nectin 1, los mediadores de entrada de herpesvirus (HVEM), heparán sulfato 3-O sulfatado y el receptor emparejado tipo inmunoglobulina  $\alpha$  (PILR $\alpha$ )<sup>13</sup>.

El proceso de latencia viral ocurre principalmente por deficiencias en los mecanismos de replicación viral. Algunos estudios sugieren que los linfocitos T CD8+ estarían involucrados en la inducción de latencia a través de la granzima B y la degradación de ICP4, una proteína necesaria para la replicación del virus. Cierta evidencia también sugiere que los linfocitos T CD8+, que se infiltran en el tejido neural del ganglio trigémino infectado por VHS, son capaces de generar interacciones específicas con ciertas proteínas virales, lo cual explicaría en parte la presencia de virus en las neuronas adyacentes al ganglio trigeminal<sup>11</sup>.

El genoma viral circular asociado al estado de latencia del VHS sintetiza transcriptasas asociadas a latencia (LATs por su sigla en inglés) que corresponde a la única porción del genoma que se transcribe durante el periodo de quiescencia neural. Las LATs se potencian a través del factor promotor de unión y la inhibición de su actividad antiapoptótica le confiere protección frente a la acción citolítica de los linfocitos T CD8+. Las LATs también están implicadas en la regulación de otros genes como ICP0 que regula ICP4 y CD83, y tendrían un rol importante en la reactivación del virus. La expresión de diferentes proteínas virales como VP16 también jugaría un rol clave en el paso de latencia a replicación. La reactivación a nivel neural depende de proteínas virales como US9, gE y gI que permiten el transporte anterógrado de los viriones lo que permite que estos puedan afectar diversas estructuras anatómicas del ojo<sup>11</sup>.

## **5.6. Latencia corneal del virus herpes simple**

En los últimos años ha habido un interés creciente en conocer si los herpesvirus (principalmente VHS-1) son capaces de establecer latencia a nivel de la córnea. Ciertos estudios describen la presencia viral a largo plazo en este tejido y por tanto la posibilidad de

transmisión de donante a receptor a través de un trasplante en modelos experimentales. Mucho se ha avanzado respecto a los mecanismos que permiten explicar cómo se produce latencia viral a nivel neural, pero quedan aún muchas dudas respecto al mecanismo que permitiría reproducir este comportamiento en otros tejidos como la córnea.

Los investigadores han analizado el papel potencial de las LATs para facilitar la latencia en cornea. Un estudio encontró que la regulación del promotor LAT era similar en las células neuronales y en los queratocitos del estroma corneal, específicamente ciertas regiones similares aumentaron la actividad del promotor LAT en células neuronales y en queratocitos estromales<sup>14</sup>. Esto es consistente con que es más frecuente recuperar antígenos de VHS-1 del estroma que de otras capas de la córnea. Un estudio de córneas extirpadas de pacientes con queratitis estromal recurrente, pero sin enfermedad activa encontró que, si bien la mayoría eran positivas para ADN de VHS mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las LATs no se detectaron mediante hibridación in situ (ISH), que tiene una sensibilidad sustancialmente menor. Por el contrario, se han encontrado altos niveles de expresión de LATs mediante ISH en neuronas con infección latente<sup>15</sup>. En otro estudio se detectaron LATs en la mayoría de las muestras de córnea mediante PCR, pero no mediante ISH lo que también puede deberse a diferencias en la sensibilidad de la prueba<sup>16</sup>.

### **5.7. Transmisión de virus herpes de donante a receptor.**

Los pacientes con antecedentes de enfermedad ocular por VHS son considerados de alto riesgo de fracaso del injerto debido a que la aparición de un episodio de recurrencia que podría conducir a complicaciones postoperatorias como queratopatía neurotrófica, enfermedad epitelial recurrente, queratitis estromal o endotelitis y a un mayor riesgo de desarrollar rechazo inmunológico<sup>17</sup>. Se ha postulado que la presencia de herpesvirus en córneas donantes puede predisponer a fracaso del injerto debido a la transmisión de donante a receptor. Este probable mecanismo se informó por primera vez de un caso en 1994 en que el virus se detectó tanto en el injerto fallido como en la córnea donante, ésta última había sufrido una pérdida de células endoteliales significativa en el cultivo de órganos<sup>18</sup>. En 1997 se publicó una serie de casos donde se informó que el VHS estaba presente en dos de cada tres casos de fracaso del injerto y se sugirió como posible causa la presencia de virus latente en córnea<sup>19</sup>. Otra serie reportó que se detectó VHS en un tercio de los fracasos primarios del injerto de los cuales tres habían desarrollado enfermedad herpética necrotizante. Biswas et. al. informó el caso de dos pacientes sin antecedentes de infección por VHS que experimentaron fracaso del injerto posterior al trasplante, se estudiaron las córneas donantes

con cultivo viral, inmunohistoquímica, microscopia electrónica y PCR donde se encontró presencia de VHS<sup>20</sup>. En 2001 se publicó un caso en "The Lancet" donde se realizó un mapeo genético de ADN basado en PCR y se demostró que la huella genética del VHS encontrado en el receptor era idéntica a la identificada en el tejido donante<sup>21</sup>. Este paciente posteriormente desarrollo una ceguera secundaria a queratitis estromal. A pesar de estos reportes, la casuística es escasa y los mecanismos que explicarían la latencia corneal y la reactivación con paso de donante a receptor es aún desconocida.

## 5.8. Justificación

El trasplante de córnea corresponde al procedimiento de trasplante alogénico de tejido humano más exitoso y ampliamente extendido del mundo<sup>1</sup>. En las últimas décadas, la incidencia de fracaso del injerto se ha reducido notablemente. Esta reducción se puede atribuir principalmente a características intrínsecas del tejido (su naturaleza avascular y a su privilegio inmunológico) como además al avance técnico que han tenido los bancos de tejido en cuanto a bioseguridad y manipulación de muestras biológicas, la aparición de nuevas técnicas quirúrgicas y el desarrollo de drogas inmunosupresoras y antivirales más efectivas. Actualmente los niveles de éxito se encuentran en torno al 90% en el primer año y al 70% a los 5 años de seguimiento<sup>22</sup>.

Los virus de la familia herpesviridae, sobre todo el virus herpes simple (VHS), son una causa importante de morbilidad y se cree que son la principal causa de ceguera de causa infecciosa en los países desarrollados. Los más prevalentes, VHS-1 y VHS-2 son capaces de causar patología ocular debido a su capacidad de diseminarse tanto en los tejidos como a nivel neural. La mayoría de la patología ocular se ha atribuido a VHS-1. La diseminación del VHS es amplia en la población general, transmitiéndose por vía oral y posteriormente quedando latente principalmente en el ganglio trigeminal. La replicación viral ocurre a este nivel hasta que los linfocitos T CD8+ aparecen y se superan los mecanismos de reparación del ADN viral quedando estos en estado latente. Durante el periodo de latencia, el virus permanece en los tejidos con una actividad de expresión génica limitada con excepción de la síntesis de LATs<sup>23</sup>.

La infección por virus herpes se ha propuesto como una de las causas que pueden explicar la aparición edema corneal posquirúrgico y algunos casos de fracaso del trasplante. Considerando que la mayoría de los receptores no tienen historia previa de infección viral, y que habitualmente no se realiza cribado de virus herpes en las córneas donantes, no es del todo claro si el virus ya estaba presente en los receptores de forma quiescente en tejido neural

o si se produce una transmisión a partir del tejido donante al receptor. Se han reportado en la literatura unos pocos casos de transmisión donante receptor de VHS-1 (el más ampliamente estudiado), sin embargo, la presencia de formas latentes a nivel corneal de herpesvirus no ha sido estudiada en profundidad.

La PCR es una herramienta efectiva para la detección de ADN viral, las técnicas actuales permiten detectar dicho material genético incluso en muestras muy pequeñas de manera sencilla, rápida y con niveles de sensibilidad y especificidad elevados.

El objetivo principal de este trabajo corresponde a estudiar la prevalencia de diferentes herpesvirus en tejido donante para trasplante de córnea (espesor corneal total de botón escleral y endotelio), considerando que es un tema de interés en cuanto al papel que pudiese tener en relación a la aparición de fracaso del injerto y por otro lado no hay a la fecha estudios publicados en la literatura en población española.

## **6. Hipótesis**

La prevalencia de virus de la familia herpesviridae en tejido corneal donante (botón escleral y endotelio) utilizado en queratoplastias en el hospital universitario de Valladolid es similar a la publicada en la literatura.

## **7. Objetivos**

### **7.1. Objetivo General**

Determinar la prevalencia de herpesvirus en muestras de córneas donantes (espesor corneal total y endotelio) de pacientes sometidos a queratoplastia en el hospital clínico universitario de Valladolid entre octubre de 2019 a marzo 2022.

### **7.2. Objetivo específico**

Analizar los resultados de prevalencia de herpesvirus publicados en otras series respecto a una muestra obtenida en población española.

## 8. Materiales y métodos

El diseño utilizado corresponde a un estudio de corte transversal (prevalencia). Se estudiaron muestras de espesor corneal total de botón escleral y endotelio donante del banco de tejidos de trasplantes realizados desde octubre de 2019 a marzo de 2022 en el hospital Clínico Universitario de Valladolid. Todos los procedimientos fueron realizados por un cirujano experto en queratoplastia, las muestras se obtuvieron siguiendo todas las precauciones de asepsia y antisepsia, estas se conservaron a temperaturas de -20°C en envases esterilizados hasta que se realizó la extracción de ADN.

El procesamiento y análisis de las muestras se realizó en las dependencias del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) en Valladolid. La financiación para la realización del estudio se consiguió a través de los fondos para la investigación de la consejería de sanidad de Castilla y León, España.

El kit utilizado para la extracción de ADN fue Patho Gene-spin™ de la empresa iNtRON Biotechnology, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se descongelaron las muestras y se congelaron en nitrógeno líquido a una temperatura entre -70° C y -110° C para facilitar la manipulación de éstas. Para obtener una muestra de espesor corneal total del botón escleral se utilizó un punzón de biopsia punch dermatológico estéril por cada una de las muestras procesadas. El endotelio se analizó tal cual como se conservó desde la extracción por el cirujano. Luego se trituraron en un tubo de ensayo con mortero y se depositaron en tubos de microcentrifugación de 1,5 ml, el extracto fue diluido en tampón fosfato salino (PBS). Un total de 50 µl de muestra se utilizó para realizar la técnica de extracción de ADN.

Para realizar la detección de ADN viral de VHS 1, VHS 2, VVZ, EBV y CMV se utilizó PCR a tiempo real (PCR-RT). Los ensayos de PCR se realizaron utilizando el modelo 7500 de PE Biosystems (PE Applied Biosystems, Ciudad de Foster, CA). Se utilizaron promotores virales para la identificación de VHS I, VHS II, VVZ y CMV de la empresa Sigma Aldrich™. Para EBV se utilizaron promotores de la empresa Biosearch Technologies™. El límite de detección para el ADN de herpesviridae fue de 10 copias/µg. cada muestra se procesó con la adición de un control interno para evaluar la eficacia de la extracción del ADN.

Se tabularon los datos obtenidos utilizando el software Microsoft Excel 2019. Para el análisis de resultados se utilizó el software estadístico SPSS 26 (SPSS Inc., Chicago, USA). Se realizó análisis descriptivo de las variables cualitativas consideradas de interés para el estudio (tipo de tejido donante, tipo de queratoplastia realizada y resultado de la prueba de PCR).

## 9. Resultados

Se estudiaron un total de 98 muestras de tejido corneal donante, de las cuales 49 (50%) correspondieron a espesor corneal total (obtenido de botones esclerales) y 49 (50%) correspondieron a endotelio corneal. Del total de queratoplastias realizadas 46 (93,87%) correspondieron a DMEK, 2 (4,08%) a DALK y 1 (2,04%) a DSAEK.

Del total de muestras analizadas 2 (2,05%) resultaron positivas para VHS 2, de las cuales 1 (1,025%) correspondió a espesor corneal total donante y 1 (1,025%) a endotelio corneal donante. Las 96 (97,95%) muestras restantes resultaron negativas en el análisis de PCR para VHS II. El análisis de PCR para el resto de los virus (VHS I, VVZ, EBV y CMV) resultó negativo en las 98 muestras analizadas (100%).

En relación a la positividad en relación al tipo de queratoplastia las 2 muestras positivas se presentaron en procedimientos de DMEK.

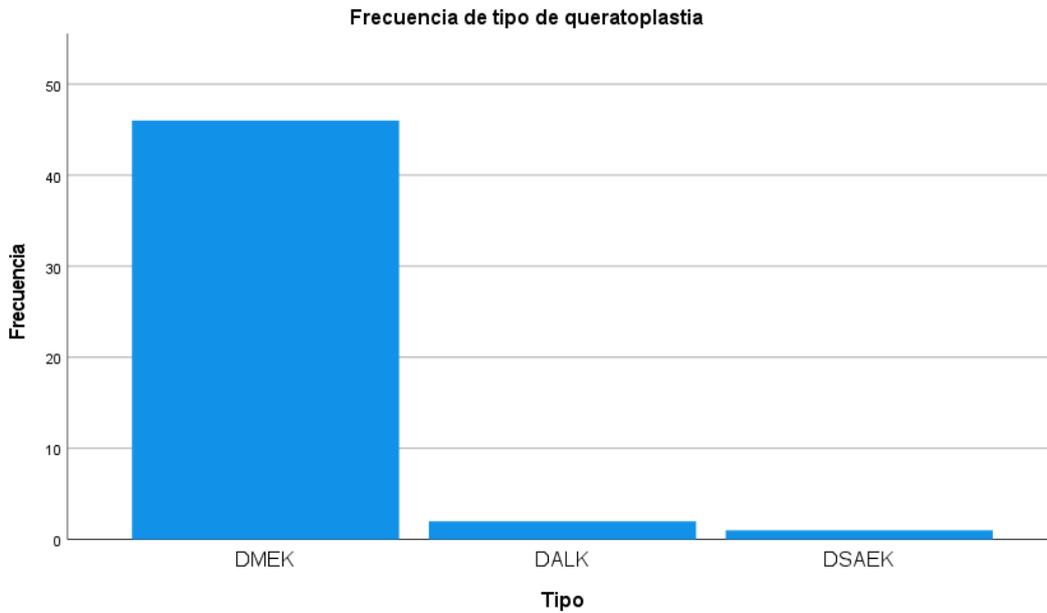
**Tabla I. Positividad PCR-RT ADN Viral VHS II**

	PCR Viral (-)	PCR Viral (+)	Total
<b>Espesor corneal total donante</b>	48(48,975%)	1(1,025%)	49(50%)
<b>Endotelio corneal donante</b>	48(48,975%)	1(1,025%)	49(50%)
	96(97,95%)	2(2,05%)	98(100%)

**Tabla II. Positividad PCR-RT ADN Viral VHS II según tipo de queratoplastia.**

		PCR Viral (-)	PCR Viral (+)	Total
<b>Espesor Corneal total donante</b>	DMEK	45(45,92%)	1(1,025%)	46(46,945%)
	DALK	2(2,035%)	0	2(2,035%)
	DSAEK	1(1,02%)	0	1(1,02%)
<b>Endotelio corneal donante</b>	DMEK	45(45,92%)	1(1,025%)	46(46,945)
	DALK	2(2,035%)	0	2(2,035%)
	DSAEK	1(1,02%)	0	1(1,02%)
		96(97,95%)	2(2,05%)	98(100%)

### Gráfico I. Frecuencia de tipo de Queratoplastia



### 10. Discusión

En el presente estudio determinamos la prevalencia de herpesvirus en una muestra de tejido donante para trasplante corneal a través de la técnica de PCR-RT. Corresponde al primer estudio de prevalencia realizado en población española. Lo primero que destacamos es la baja prevalencia de ADN de herpesvirus en los tejidos analizados, ya que solo se encontró positividad en 2 muestras de las 98 analizadas, específicamente para VHS-2. El resto de los análisis de PCR para el resto de los virus estudiados resultó completamente negativo. Al comparar estos hallazgos con series publicadas en otras poblaciones, es interesante señalar que la positividad de VHS-2 en general es baja o nula. Remeijer et al. publicó un estudio de prevalencia realizado en el año 2004 con una muestra de 273 botones esclerales estudiados con PCR-RT en población proveniente de países bajos, sus hallazgos fueron que la positividad de VHS-2 y VVZ fue 0% y que 2 muestras (0.73%) de la 273 estudiadas fueron positivas para VHS-1<sup>24</sup>. Otro estudio publicado en 2020 por Jing-Hao Qu et. al. en población china detectó también baja positividad en los estudios de PCR-RT para herpesvirus, la incidencia reportada fue de 0.74% para VHS-1, 0.85% para CMV, 0.64% para VVZ, y 0.21% para VEB en una muestra de 942 botones esclerales, no se reportaron casos positivos para VHS-2<sup>25</sup>.

Es interesante señalar que, a diferencia de estos reportes, el VHS-2 fue el único virus detectado en las muestras estudiadas en nuestro estudio. Si bien el tamaño muestral es menor, lo cual es una limitación, esto podría ser un indicio de que en nuestro medio a diferencia de

otros la positividad para la subfamilia de Alfa-herpesviridae en tejido donante tiene diferencias y el VHS-1 no sería el más frecuente.

Respecto al resto de los virus estudiados es importante recalcar que, a pesar de ser limitados, se ha encontrado diferencias en la prevalencia de ciertos virus. Es interesante la situación respecto a VVZ y CMV. En el estudio de Remeijer et. al el VVZ y CMV no fue detectado lo cual concuerda con nuestra muestra. En cambio, en el estudio Jing-Hao Qu et. al. se detectaron casos de VVZ y CMV. Esto se podría explicar a partir de las diferencias que se pudiesen encontrar entre poblaciones occidentales y orientales, en relación a la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas y en las condiciones sociosanitarias que pudiesen impactar en la prevalencia de estas enfermedades (por ejemplo, el acceso y expansión de las vacunas disponibles para VVZ). Sin embargo, las limitaciones de los estudios primarios y de nuestra muestra en particular no permiten concluirlo con seguridad y el modelo del estudio propuesto no tiene como objetivo esta comparación.

Otro elemento a considerar es que, a diferencia de los estudios ya publicados, el análisis de tejido en nuestro caso se realizó no sólo de espesor corneal total obtenido de botones esclerales, sino también de endotelio donante. Esto es importante de cara al cambio que ha significado la masificación de las técnicas lamelares de trasplante corneal. En nuestro centro la mayoría de los trasplantes realizados correspondieron a DMEK (93,87%). El resto de técnicas tienen una frecuencia muchísimo menor y la queratoplastia penetrante está cada vez más en desuso. Al comparar otras series, sobre todo aquellas publicadas antes del 2015 como la de Remeijer et al., el cambio de paradigma en cuanto a las técnicas quirúrgicas utilizadas en queratoplastia es patente. Es importante recalcar que una de las muestras que resultó positiva para VHS-2 corresponde a endotelio donante, por consiguiente existiría la posibilidad de que los mecanismos de latencia permitieran al virus herpes establecer latencia en las capas más profundas de la córnea y este ser un mecanismo de transmisión de estos agentes patógenos de donante a receptor, el hecho de que las técnicas lamelares estén en boga y su aplicación hoy en día se hallan extendido de manera tal que en muchos centros se han transformado en las técnicas de elección y las más frecuentemente utilizadas abre un flanco de investigación importante en el sentido de poder determinar cómo esto podría tener influencia en los resultados posquirúrgicos y en la aparición de fracaso del injerto.

La transmisión de agentes infecciosos potencialmente patógenos desde tejido donante hacia el receptor ha sido un problema crucial en el ámbito del trasplante de órganos y tejidos, particularmente relevante en el tejido corneal debido a la expansión de oportunidad y accesibilidad que ha experimentado este procedimiento en gran parte del orbe. Los protocolos existentes para el cribado de ciertos virus como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B (VHB) son ya rutinarios en los distintos bancos de tejido<sup>25</sup>. Sin

embargo, el caso de los virus pertenecientes a la familia de los herpesvirus aún no se ha sistematizado, puesto que no existe evidencia sólida que permita determinar la real utilidad de realizar este cribado en tejido corneal donante de forma rutinaria. Esto debido a que en estudios publicados como el de Shimomura et. al. donde se realizó análisis de PCR de muestras de tejido corneal obtenido de pacientes con historia de queratitis herpética, en pacientes con PCR positiva para herpesvirus, pero baja carga viral no significó la aparición de complicaciones infecciosas<sup>26</sup>. Otro punto conflictivo respecto a los estudios publicados es que la PCR no permite determinar si la complicación apareció por el mismo virus detectado en las muestras o es por la reactivación del virus en estado latente en otros órganos y/o tejidos.

La aparición de nuevas técnicas diagnósticas como la PCR-RT, nos permite una aproximación fidedigna para determinar la prevalencia de estos virus en córneas donantes, sin embargo, no es del todo claro si la presencia de genoma viral en tejido corneal es clínicamente relevante, puesto que la mayoría de la población ha estado expuesta a estos virus y la capacidad de generar latencia en el receptor nos hace preguntarnos si efectivamente la presencia de herpesvirus corneal es un factor preponderante de la aparición de complicaciones postoperatorias y fracaso o en su defecto otros factores del huésped que influyan en la reactivación de herpesvirus del propio receptor tienen un rol gravitante en éstas, por tanto queda en entredicho al utilidad de realizar cribado de herpesvirus en corneas donantes para disminuir la prevalencia de complicaciones en los trasplantes corneales y es necesario la realización de otros estudios que permitan dilucidar estas interrogantes.

Por otro lado, aún no se conocen del todo bien los mecanismos que permiten a los herpesvirus establecer latencia en tejido corneal, la evidencia publicada es escasa, los casos reportados son pocos y los mecanismos celulares y moleculares relacionados a este proceso no son del todo conocidos. Esto es una limitación fundamental al momento de poder determinar si la positividad de PCR para ADN viral en tejido corneal es importante de cara a disminuir las complicaciones infecciosas y los fracasos del injerto.

Finalmente es importante destacar que no existen datos previos publicados respecto a la prevalencia de ADN viral en corneas donantes en población española y este estudio es pionero en analizar este indicador, que es de vital importancia para plantear hipótesis de trabajo para nuevas investigaciones y para determinar qué impacto tendrían el empleo de estrategias que se pudiesen realizar en el ámbito de la prevención de fracaso del injerto, en relación a la infección por herpesvirus.

## 11. Conclusiones

En conclusión, la positividad de PCR-RT global de nuestra muestra fue de un 2.05% (2/98), de todos los herpesvirus estudiados el único presente en las muestras analizadas correspondió al VHS-2. El estudio a través de PCR-RT permite establecer de manera adecuada la presencia de genoma viral en las muestras de tejido corneal, utilizando las técnicas de extracción de ADN estándar. Dada las limitaciones de la muestra y del estudio no es posible realizar análisis inferencial, sin embargo, estos datos permitirán ampliar las investigaciones respecto a este tema en un futuro, ya que no existen reportes previos de la positividad total estimada en tejido corneal donante para herpesvirus en nuestro medio.

A la luz de los resultados obtenidos, la utilidad del cribado para herpesvirus en muestras de tejido corneal donante sería limitada, dada su baja prevalencia, no obstante, se requieren más estudios para dilucidar el mecanismo a través del cual los herpesvirus son capaces de generar latencia en cornea y transferirse de donante a receptor, entendiendo esto será posible plantear cual es la prueba diagnóstica más útil y de mejor reproducibilidad para plantearla como posible protocolo de cribado.

## 12. Bibliografía

1. Singh R, Gupta N, Vanathi M, Tandon R. Corneal transplantation in the modern era. *Indian J Med Res.* 2019;150(1):7–22. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31571625/>
2. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: a global perspective. *Bull World Health Organ.* 2001;79(3):214–21. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11285665/>
3. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol.* 2018; 66(2):190–4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29380756/>
4. Niederkorn JY, Larkin DFP. Immune privilege of corneal allografts. *Ocul Immunol Inflamm.* 2010; 18(3):162–71. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20482389/>

5. Alio JL, Montesel A, El Sayyad F, Barraquer RI, Arnalich-Montiel F, Alio Del Barrio JL. Corneal graft failure: an update. *Br J Ophthalmol*. 2021; 105(8):1049–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1136/bjophthalmol-2020-316705>
  
6. Greenrod EB, Jones MNA, Kaye S, Larkin DFP, National Health Service Blood and Transplant Ocular Tissue Advisory Group and Contributing Ophthalmologists (Ocular Tissue Advisory Group Audit Study 16). Center and surgeon effect on outcomes of endothelial keratoplasty versus penetrating keratoplasty in the United Kingdom. *Am J Ophthalmol*. 2014; 158(5):957–66. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25089353/>
  
7. Deng SX, Lee WB, Hammersmith KM, Kuo AN, Li JY, Shen JF, et al. Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty: Safety and Outcomes. *Ophthalmology*. 2018; 125(2):295–310. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28923499/>
  
8. Edelstein SL, DeMatteo J, Stoeger CG, Macsai MS, Wang C-H. Report of the Eye Bank Association of America medical review subcommittee on adverse reactions reported from 2007 to 2014. *Cornea*. 2016; 35(7):917–26. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27158807/>
  
9. Sterk CC, Jager MJ, Swart-vd Berg M. Recurrent herpetic keratitis in penetrating keratoplasty. *Doc Ophthalmol*. 1995; 90(1):29–33. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8549240/>
  
10. Sociedad Catalana de Pediatria S, Guasch CF. Curs Intensiu d'Actualització en Pediatria -CIAP2012. *Scpediatria.cat*. Disponible en: [http://scpediatria.cat/docs/ciap/2012/pdf/CFortuny\\_CIAP2012.pdf](http://scpediatria.cat/docs/ciap/2012/pdf/CFortuny_CIAP2012.pdf)
  
11. Farooq AV, Shukla D. Corneal latency and transmission of herpes simplex virus-1. *Future Virol*. 2011;6(1):101–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2217/fvl.10.74>

12. Kaufman HE, Azcuy AM, Varnell ED, Sloop GD, Thompson HW, Hill JM. HSV-1 DNA in tears and saliva of normal adults. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(1):241–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.04-0614>

13. Akhtar J, Tiwari V, Oh M-J, Kovacs M, Jani A, Kovacs SK, et al. HVEM and nectin-1 are the major mediators of herpes simplex virus 1 (HSV-1) entry into human conjunctival epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49(9):4026–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.08-1807>

14. Perng GC, Zwaagstra JC, Ghiasi H, Kaiwar R, Brown DJ, Nesburn AB, et al. Similarities in regulation of the HSV-1 LAT promoter in corneal and neuronal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994; 35(7):2981–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8206716/>

15. Laycock KA, Lee SF, Stulting RD, Croen KD, Ostrove JM, Straus SE, et al. Herpes simplex virus type 1 transcription is not detectable in quiescent human stromal keratitis by in situ hybridization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993; 34(2):285–92. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8382667/>

16. Rong BL, Pavan-Langston D, Weng QP, Martinez R, Cherry JM, Dunkel EC. Detection of herpes simplex virus thymidine kinase and latency-associated transcript gene sequences in human herpetic corneas by polymerase chain reaction amplification. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991; 32(6):1808–15. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1851732/>

17. Koay PYP, Lee WH, Figueiredo FC. Opinions on risk factors and management of corneal graft rejection in the United kingdom. *Cornea.* 2005; 24(3):292–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15778601/>

18. Cleator GM, Klapper PE, Dennett C, Sullivan AL, Bonshek RE, Marcyniuk B, et al. Corneal donor infection by herpes simplex virus: herpes simplex virus DNA in donor corneas. *Cornea.* 1994; 13(4):294–304. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7924328/>

19. Cockerham GC, Krafft AE, McLean IW. Herpes simplex virus in primary graft failure. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115(5):586–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9152124/>
20. Biswas S, Suresh P, Bonshek RE, Corbitt G, Tullo AB, Ridgway AE. Graft failure in human donor corneas due to transmission of herpes simplex virus. *Br J Ophthalmol.* 2000; 84(7):701–5. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10873977/>
21. Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GM, Osterhaus AD. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. *Lancet.* 2001; 357(9254):442. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/30144e46e45fe31630ef0b8087733b2c69e6ab21>
22. George AJT, Larkin DFP. Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant.* 2004; 4(5):678–85. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15084160/>
23. Knickelbein JE, Khanna KM, Yee MB, Baty CJ, Kinchington PR, Hendricks RL. Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency. *Science.* 2008; 322(5899):268–71. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18845757/>
24. Remeijer L, Duan R, van Dun JM, Wefers Bettink MA, Osterhaus ADME, Verjans GMGM. Prevalence and clinical consequences of herpes simplex virus type 1 DNA in human cornea tissues. *J Infect Dis.* 2009; 200(1):11–9. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19476433/>
25. Qu J-H, Peng R-M, Xiao G-G, Qu H-Q, Yu T, Zhang S, et al. The incidence and influence of the donor corneas positive for herpesviridae DNA in keratoplasty. *Arbeitsphysiologie.* 2020;258(12):2767–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00417-020-04984-2>
26. Shimomura Y, Deai T, Fukuda M, Higaki S, Hooper LC, Hayashi K. Corneal buttons obtained from patients with HSK harbor high copy numbers of the HSV genome. *Cornea.* 2007; 26(2):190–3. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251811/>