



Facultad **de**
Medicina
Escuela de Medicina

“Caracterización de sustitutos corneales generados a partir de hidrogeles multilaminares”

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

Autor: TM. Fallon García González

Director de Tesis: Dr. Sebastián San Martín Henríquez

Codirector de Tesis: Dr. Manuel Ahumada Escandón

Julio 2023



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“Caracterización de sustitutos corneales generados a partir de hidrogeles multilaminares”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Autor: TM. Fallon García González

Director de Tesis: Dr. Sebastián San Martín Henríquez

Codirector de Tesis: Dr. Manuel Ahumada Escandón

Julio 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“Caracterización de sustitutos corneales generados a partir de hidrogeles multilaminares”

Alumno: T.M. Fallon García González

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Dr. Sebastián San Martín Henríquez en el laboratorio de Morfología en Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dra. Paula Santana
Presidente Comisión

Mg. Pamela Vásquez
Profesor Informante

Dra. Rina Ortiz
Profesor Informante

Dr. Sebastián San Martín Henríquez
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
Julio 2023**

DEDICATORIA

A mis padres por el esfuerzo y ejemplo diario que me han entregado, por incentivar mi crecimiento profesional y por sobre todo orientarme a ser una mejor persona.

A mis tres hermanos quiero decir que con actitud positiva y disciplina todo se puede lograr en la vida.

A Alejandro has sido un apoyo fundamental en este proceso, gracias por acompañarme y cuidarme en los momentos difíciles.

A mi abueli Sonia, Tata Rubén y tío Alfonso que no están físicamente, pero sé que están presentes siempre y que están orgullosos de lo que he logrado.

Con amor dedico este trabajo a todos ustedes.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi tutor de tesis Dr. Sebastián San Martín por permitir el desarrollo de mi tesis en el área oftalmológica, por haber confiado en mí y su contribución a mi crecimiento personal y profesional.

A mi co-tutor de tesis Dr. Manuel Ahumada agradezco su buena disposición para resolver mis dudas, entregar su apoyo y ser partícipe de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Ciencias Morfológicas a cargo de T.M. Juan Varas por su gestión, disposición, ayuda en el procesamiento de muestras. También a Karina y Sebastián quienes compartieron sus conocimientos, conversaciones y risas durante mi paso por el laboratorio.

A T.M. Juan Hernández colaborador del Centro de Nanotecnología, gracias por tu ayuda para explicarme todos los procesos de creación de matrices, responder a todas mis preguntas y ser un apoyo en el desarrollo de esta tesis, el máximo éxito en la finalización de tu doctorado.

A mis compañeros (as) tecnólogos Médicos incluyendo también a Kathy y Margarita, ustedes han sido un gran apoyo en todo momento, me escucharon en los momentos de máxima euforia cuando lograba algo nuevo en este proceso, y también me acompañaron cuando estaba en procesos de estrés, un abrazo grande a cada uno de ustedes.

A mis amigos de años, gracias por entregarme su apoyo y aliento, por ser mi medio de escape en los momentos difíciles tanto en este proceso de investigación como en la vida misma, los quiero mucho.

Agradezco a cada una de las personas que formaron parte de mi tesis, a mis familiares que partieron durante el proceso y me ayudaron a comprender que la vida hay que disfrutarla todos los días haciendo lo que a uno le gusta y siempre ver el lado positivo de las cosas.

ABREVIATURAS

APCM	Matriz de córneas porcinas acelulares
DCEF	Distrofia endotelial de Fuchs
DR	Desprendimiento de retina
DAPI	Marcador fluorescente 4' 6-diamidino-2-fenilindol
DMI	Microscopio Invertido
(EDC/NHS)	Carbodiimida N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
G	Gelatina
GA	Glutaraldehído
GFP	Proteína verde fluorescente
HE	Tinción Hematoxilina Eosina
MEC	Matriz extracelular
OCT	Tomografía de coherencia óptica
P	Poli-L-lisina
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PGA	Ácido poliglicólico
Q	Quitosano
QB	Queratopatía bullosa
QP	Queratoplastia
SEM	Microscopía electrónica de barrido
RGB	Rojo- Verde- Azul
ROI	Región de interés
UV	Ultravioleta
VG	Tinción Van Gieson

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	12
2	MARCO TEÓRICO.....	12
2.1	Histología corneal	13
2.2	Patologías asociadas a la córnea	20
2.3	Patología	20
2.4	Descripción.....	20
2.5	Tratamientos	21
2.6	Biomaterial	23
2.7	Descripción.....	23
3	Definición del problema	26
4	HIPÓTESIS	28
5	OBJETIVOS	29
5.1	Objetivo general.....	29
5.1.1	Objetivos específicos.....	29
6	MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1	Metodología General.	30
6.1.1	Diseño de investigación: Estudio tipo experimental.....	30
7	RESULTADOS	43
7.1	Objetivo específico N°1: Procesamiento de las matrices candidatas a sustitutos corneales. Aplicación de protocolo de inclusión. 43	
7.1.1	Resultado objetivo específico 1	44
7.2	Resultado objetivo específico N°2: Caracterizar la estructura morfológica de matrices mediante técnicas histológicas de rutina. ...	45
7.2.1	Tinción Hematoxilina- Eosina.....	45
7.2.2	Tinción Van Gieson	49
7.2.3	Grosor Medio post tinciones histológicas	53
7.2.4	Cantidad de capas	55

7.3	Resultado objetivo específico N°3: Evaluación ultraestructural de matrices mediante microscopio electrónico de barrido.	56
7.3.1	Grosor Medio	58
7.3.2	Resultados de Porosidad	60
7.4	Resultado objetivo específico N°4: Evaluación ultraestructural de matrices mediante Tomografía de coherencia óptica.....	62
7.5	Resultado objetivo específico N°5: Evaluar el sustituto corneal sintético <i>in vitro</i>	66
8	DISCUSIÓN.	70
9	CONCLUSIONES	76
10	BIBLIOGRAFÍA	77
11	ANEXOS	86
11.1	Anexo 1. Consentimiento Informado Donante Córnea Humana.	86
11.2	Anexo 2. Protocolo de inclusión hidrogeles multilaminares	87
11.3	Anexo 3. Protocolo de Tinción H&E para hidrogeles sintéticos ..	88
11.4	Anexo 3. Protocolo de tinción VG para hidrogeles sintéticos ..	89
11.5	Anexo 4. Estandarización adquisición de imágenes microscopio óptico (Olympus).....	90
11.6	Anexo 5. Macros para ImageJ tinción HE.....	92
11.6.1	Macros para ImageJ tinción HE	92
11.6.2	Macros para ImageJ tinción VG.....	92
11.7	Anexo 6. Tabla resumen de datos para cada objetivo específico	93
11.7.1	Intensidad de Tinción HE (IHE)	93
11.7.2	Intensidad de Tinción VG (IVG)	94
11.7.3	Grosor post tinción	95
11.7.4	Grosor por capa matrices iniciales.....	96
11.7.5	Grosor total matrices iniciales.....	96
11.7.6	Cantidad de capas matrices HE y VG	97
11.7.7	Porosidad	98

11.8	Anexo 7. Evaluación de distribución de datos.....	99
11.8.1	Intensidad HE	99
11.8.2	Test Kruskal Wallis HE.....	100
11.8.3	Distribución de datos Intensidad VG	101
11.8.4	Test Kruskal Wallis VG.....	102
11.9	Anexo 8. Resultado evaluación hinchamiento matrices concentración 0,10%.103	

RESUMEN

Introducción: La córnea es un tejido avascular transparente capaz de refractar la luz, cuando este tejido pierde su función, se realiza una queratoplastia, procedimiento que requiere un donador de córnea humano. Hoy en día existe escasez de tejidos a nivel mundial, debido a esto se están evaluando nuevas alternativas de tratamiento como los implantes corneales basados en hidrogeles multilaminares.

Objetivo: Obtener un protocolo para fabricar y validar hidrogeles multilaminares sintéticos a través del análisis histológico e imagenológico de su estructura para ser utilizado como posible sustituto corneal biomimético.

Metodología: Se evaluaron hidrogeles multilaminares basados en gelatina con concentraciones de glutaraldehído [0,05% y 0,10%], mediante técnicas histológicas hematoxilina eosina (HE) y van Gieson (VG). Se evaluó la ultraestructura de hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido y tomografía de coherencia óptica (OCT) siendo comparadas con un control de córnea nativa, además se realizó ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Resultados: La intensidad de tinción con VG fueron mayores en las matrices con 0,10% glutaraldehído (GA) respecto al control, pese a observar una menor intensidad con tinción HE, no se encontraron diferencias significativas. La ultraestructura de hidrogeles mostró una porosidad similar al control de 17 μm , mientras que con OCT se obtuvo un grosor medio correspondiente a 423 μm similar al grupo control de 424 μm . En el ensayo *in vitro* se evidenció proliferación y migración celular.

Conclusión: Se logró crear un hidrogel multilaminar junto a un protocolo de inclusión y procesamiento histológico para hidrogeles sintéticos, en donde se evidenció que los grosores, número de capas, estructura son similares a una córnea nativa, además de favorecer el crecimiento y estimulación celular.

Palabras Clave: Córnea, hidrogel, trasplante corneal, biomimético, morfología.

1 INTRODUCCIÓN

La visión es uno de nuestros principales sentidos, esencial para cada momento de nuestra vida, nos permite reconocer y vincularnos con el mundo que nos rodea. Las afectaciones oculares afectan aproximadamente a 2.200 millones de personas en el mundo y de ellas 43 millones de personas son ciegas. ⁽¹⁾

Existen diversas causas que pueden ocasionar la pérdida de visión, entre ellas, hay afectaciones que alteran la estructura corneal, produciendo la pérdida de transparencia en el tejido de manera irreversible. Para estos casos el tratamiento principal es la queratoplastia, o trasplante de córnea, donde hoy en día no existe la cantidad de donadores necesarios para la demanda a nivel mundial, por lo tanto, se requiere de un tratamiento alternativo que cumpla con las propiedades biomiméticas de una córnea nativa. En el camino para lograr un trasplante artificial se considera a la ingeniería de tejidos y biomateriales un nicho para encontrar una nueva terapia alternativa.

2 MARCO TEÓRICO

El globo ocular es una estructura semiesférica, situada en el centro de la parte anterior de la órbita. Tiene un volumen de 6 mL y un largo axial de 24 mm promedio en un adulto sin vicio de refracción. ⁽²⁾ Está constituido por tres cubiertas: esclero-corneal (membrana fibrosa), coroides (membrana vascular), retina (membrana nerviosa) y un contenido que otorga la forma al globo ocular (humor acuoso, cristalino y humor vítreo). La córnea, junto con el humor acuoso, el cristalino y el humor vítreo, son estructuras que contribuyen a la transparencia, constituyen el "sistema óptico del ojo", alcanzando un poder refractivo correspondiente a 40 dioptrías. (Ver figura 1).

La córnea es un tejido transparente, avascular de forma ovalada horizontalmente, con un diámetro entre los 11 a 12 mm (blanco a blanco) y entre 9 a 11 mm en el eje vertical, con un diámetro horizontal promedio de $11,71 \text{ mm} \pm 0,42\text{mm}$. ⁽²⁾

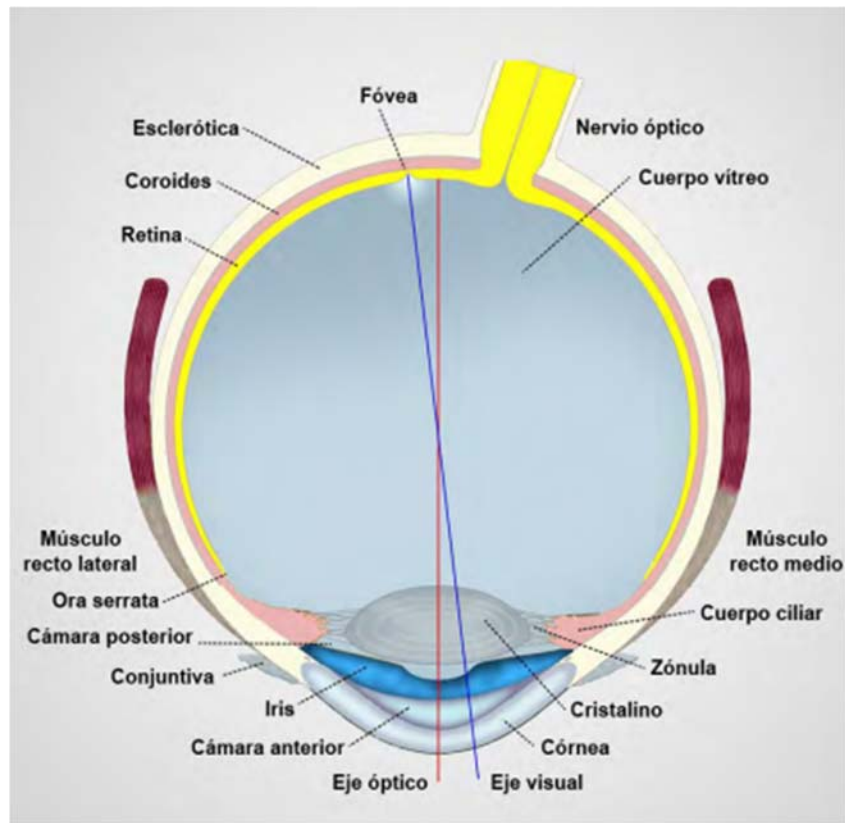


Figura4 1. Esquema del globo ocular con sus componentes. ⁽³⁾

2.1 Histología corneal

El tejido corneal está altamente diferenciado para permitir la refracción y transmisión de la luz, se compone de 5 capas (Ver Figura 3), desde la más externa a la más interna se encuentran: Epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio.

1. El epitelio corneal está conformado por 5 a 7 capas de células (las células superficiales, alares y basales), que forman un epitelio escamoso estratificado no queratinizado con un grosor total de 50 μm y en donde, el recambio celular de esta capa es de 7 días. ⁽⁴⁾ (Ver Figura 2).

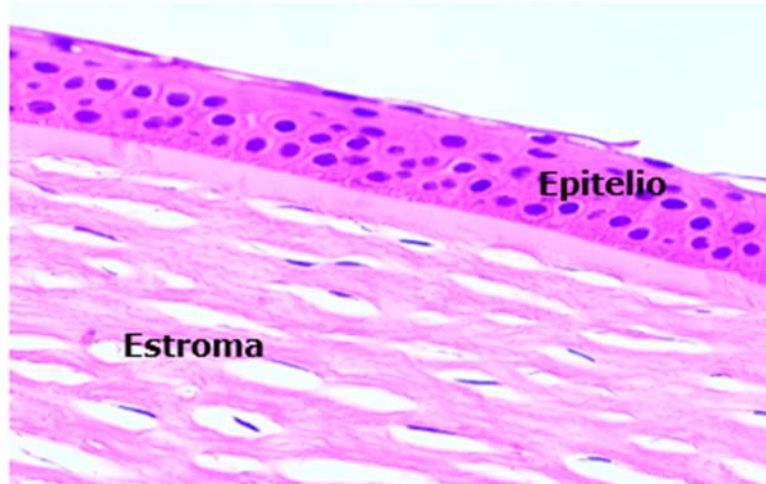


Figura 2. Corte histológico de córnea humana se puede observar multicapas de epitelio y parte del estroma corneal, imagen 40X. (Imagen propia, F. García 2022, Laboratorio de Ciencias Morfológicas, Universidad Valparaíso)

2. La membrana de Bowman es un condensado acelular compuesta por colágeno tipo I y colágeno V.
3. La capa estromal es una estructura de 12 μm , que consiste en una matriz extracelular rica en colágeno tipo I (MEC), colágeno tipo III y V, adicionalmente posee proteoglicanos intercalados con queratocitos y una capa de células endoteliales propia. ⁽⁵⁾ Además, la matriz extracelular estromal posee otros componentes como glicosaminoglicanos, queratán sulfato, condroitín sulfato y dermatán sulfato, moléculas que, junto al colágeno son sintetizadas y mantenidas por los queratocitos mediante una síntesis constante, estos corresponden entre un 3 a 5 % del volumen estromal. ⁽²⁾
4. La membrana de Descemet no posee componente celular y está conformada por una ultraestructura amorfa, posee un grosor de 7 μm y se compone de colágeno tipo IV. ⁽²⁾.

5. El endotelio es una monocapa de células hexagonales que posee un grosor de 5 μm , la densidad celular de esta capa cambia con el tiempo descendiendo de 4000 células/ mm^2 a 2600 células/ mm^2 en edad adulta, ya que estas células no se regeneran. Se requiere de 700 células/ mm^2 para conservar la transparencia del tejido corneal. ⁽²⁾

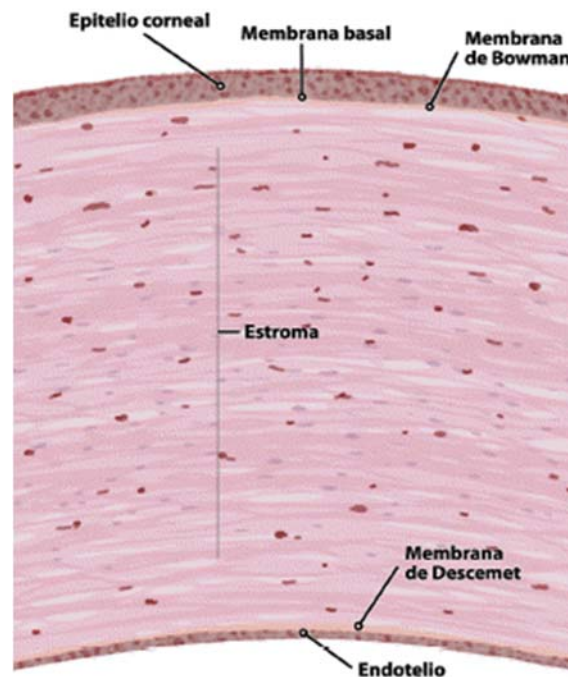


Figura 3. Imagen histológica de córnea con sus distintas capas: Epitelio (capa más externa) en contacto con película lagrimal, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (capa más interna) en contacto con humor acuoso.⁽⁶⁾

El grosor de la córnea se da principalmente por el estroma, conformando el 90% del total, en el centro el grosor es menor y aumenta hacia la periferia dada la disposición de sus capas. A nivel macroscópico el grosor corneal se puede evaluar mediante tomografía de coherencia óptica (OCT), observándose que el valor corneal central promedio varía de 520 a 565 micras y el grosor periférico está entre las 610 a 640 micras. Este grosor disminuye con la edad debido a la pérdida de células endoteliales.⁽²⁾

En algunos casos patológicos la córnea sufre un adelgazamiento y debilitamiento progresivo en la capa estromal por la alteración del colágeno y pérdida de queratocitos, relacionado al aumento de expresión de lisozimas y aumento de proteasas que se liberan hacia la película lagrimal. ^{(7), (8)}

A nivel microscópico el estroma está compuesto de fibrillas de colágeno tipo I de 25 a 30 nm de grosor, estando éstas empaquetadas y distribuidas en capas de manera ortogonal o en laminillas en los dos tercios posteriores, donde se ordenan en unas 200 a 250 láminas paralelas a la superficie, y siendo esta disposición la que minimiza la dispersión de la luz y permite la transparencia del tejido. La orientación entre cada laminilla es oblicua en el tercio anterior, para poder compensar las deformaciones causadas por la musculatura extrínseca. (Ver Figura 4) La superficie de las fibrillas de colágeno en la córnea ha sido observada mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), observándose que en su disposición existen espacios o surcos superficiales en las zonas de separación respecto a las zonas de superposición de las fibras. En córneas humanas la profundidad de los surcos de fibrillas corresponde a 0,23 nm. ⁽⁵⁾

Esta disposición espacial de las fibras de colágeno, la densidad y entrecruzamiento son las que permiten mantener las propiedades mecánicas como curvatura, elasticidad y cualidades ópticas como la transmitancia, ya que el epitelio corneal está sujeto a una variedad de fuerzas extrínsecas e intrínsecas dado por distintos estímulos mecánicos sobre el tejido, como la presión de los párpados, el frotamiento de los ojos, el uso de lentes de contacto, la presión atmosférica y la presión intraocular. ⁽⁷⁾

Los principales colágenos que forman fibrillas en la matriz extracelular del estroma corneal son los tipos I y V. El colágeno, es una proteína trimérica, existen 28 tipos de colágenos distintos, estos en conjunto con oligosacáridos constituyen diversas glicoproteínas. Las fibrillas de colágeno estromal están ensambladas por colágeno tipo V, junto a lumicano y decorina, proteoglicanos que participan en la estabilización y regulación del diámetro de las fibrillas. Con respecto al tamaño de los proteoglicanos presentes entre las fibrillas de colágeno se encuentran entre los 35 kD a 40 kD, y tienen

entre sus funciones la de regular el espacio interfibrilar.⁽⁵⁾

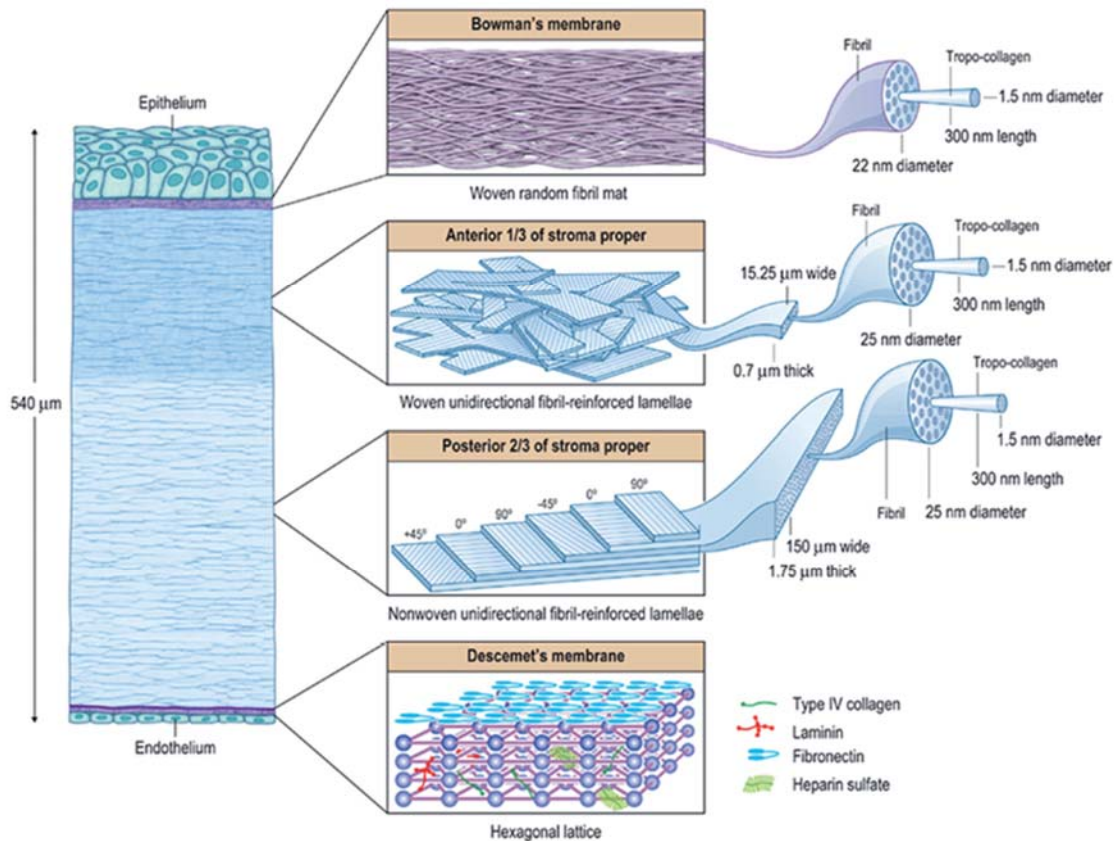


Figura 4. Esquema muestra la disposición de fibras de colágeno en cada una de las capas corneales.⁽⁹⁾

La medición de la transparencia corneal, se puede evaluar cuantitativamente mediante espectrometría, uno de los primeros intentos realizados en córneas humanas aisladas fue el de Boettner y Wolter, ellos evaluaron la transmisión de 220 nm (ultravioleta) hasta los 2800 nm (infrarrojo), sus resultados demostraron poca transmisión de luz debido a que parte de la radiación fue absorbida por la córnea, gracias a la composición de proteínas y vitaminas especializadas, por lo tanto, se comprobó que la córnea cumple con una función protectora hacia el contenido interior del globo ocular, esta absorción (ver figura 5) está dada por las capas anteriores del ojo (córnea y cristalino). Ellos

encontraron que la transmitancia corneal aumentaba desde los 300 nm alcanzando un 80% a 380 nm y luego aumentaba a más del 90% de transmitancia pasado ese rango, al llegar a los 1430 nm y 1950 nm donde se presentaba una transmitancia ocasionada por la absorción de agua del tejido. ⁽⁴⁾

Luego Douth et al, realizaron cálculos teóricos para la transmisión de la luz asociado al eje pupilar y el tamaño del radio fibrilar de la córnea, realizando una comparación de mediciones entre una córnea animal y humana, identificaron que la transmitancia disminuye fuera de la córnea prepupilar considerada a los 4 mm. También descubrieron que la transmisión de luz a través de la córnea disminuye desde el centro a la periferia lo que se asoció a un efecto de dispersión y absorción de la luz en el tejido.

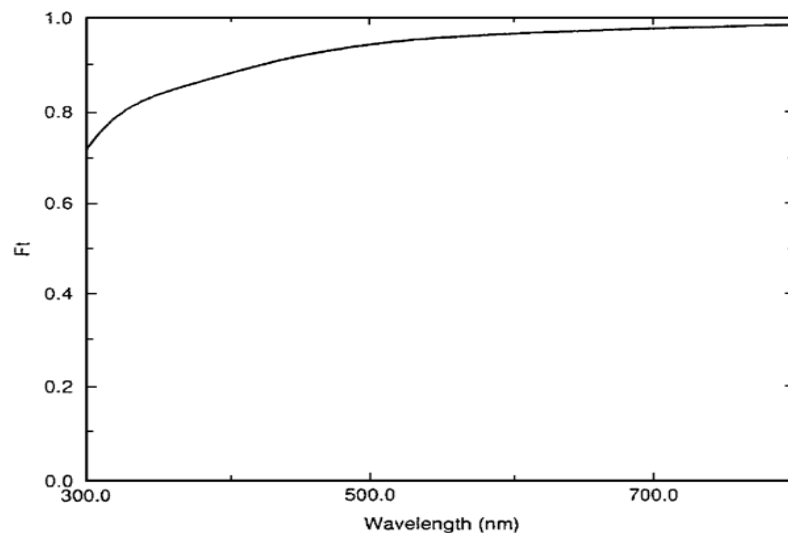


Figura 5. Gráfica de luz incidente transmitida por córnea. ⁽¹¹⁾

Luego Joyce y colaboradores relacionaron estos resultados con los efectos del daño oxidativo en las células endoteliales, concluyeron que las células del centro corneal dentro de los 3 mm sufren mayor daño oxidativo por los rayos UV, permitiendo una mayor transmitancia a comparación de las células endoteliales que se encuentran alojadas en la periferia corneal. ⁽⁴⁾ En la córnea es mayor al 90% del espectro visible

entre los 400 nm y 700 nm correspondientes a longitudes de onda de color azul y rojo respectivamente (ver Figura 6) y su índice de refracción corresponde a 1,376 nm. ⁽¹¹⁾

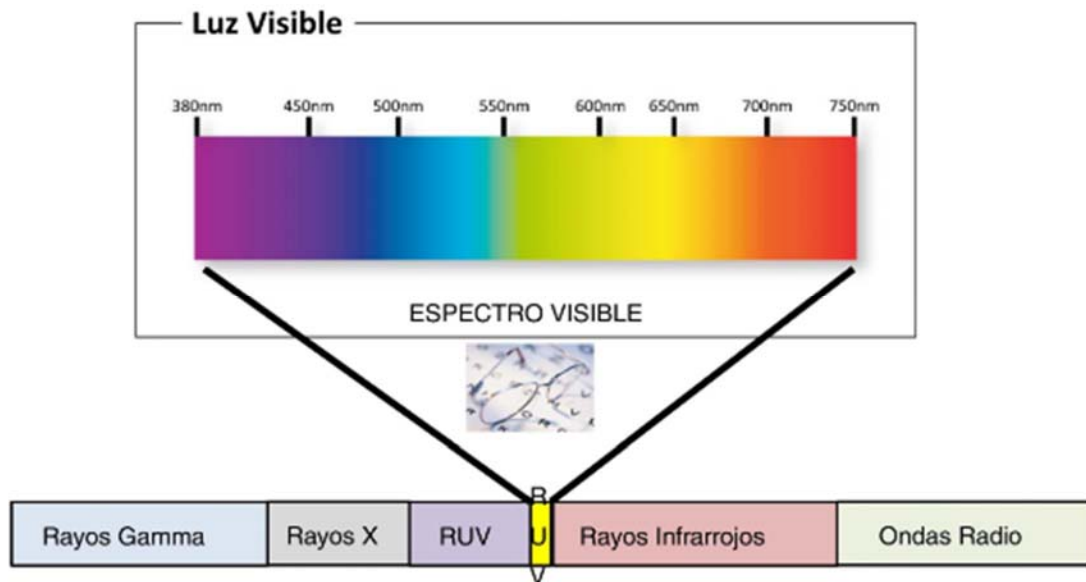


Figura 6. Espectro de radiaciones electromagnéticas en donde se encuentra el espectro de luz visible entre los 380 nm y 750 nm. ⁽¹²⁾

La transparencia corneal es una característica primordial para cumplir con la función principal de este tejido. Cuando se produce una lesión por incisión a través del epitelio hasta la capa estromal, los queratocitos dañados sufren apoptosis. Las células epiteliales rompen sus hemidesmosomas que mantienen la unión a la membrana basal del epitelio y migran al sitio de la herida junto a queratocitos inactivos viables que se activan para proliferar, generando regiones hipercelulares entre el neoepitelio y el estroma. Existen dos opciones en el proceso de cicatrización, la primera es que los miofibroblastos hipercelularizados se conviertan en miofibroblastos como tal o en fibroblastos. En el caso de los miofibroblastos, producen colágeno para regenerar las fibrillas, pero con una matriz extracelular desorganizada y en el caso de los fibroblastos, producen colágeno al igual que los queratocitos y una matriz extracelular organizada la cual posee la capacidad de restaurar la transparencia corneal. ⁽⁵⁾

2.2 Patologías asociadas a la córnea

Existen varias patologías oftalmológicas que pueden afectar la córnea generando una disminución en la transparencia, baja visión o ceguera, algunos ejemplos son presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. Definición de patologías que afectan el tejido corneal.

2.3 Patología	2.4 Descripción
Ectasia corneal	Adelgazamiento progresivo de la córnea, relacionada con la función de las proteinasas del estroma dando como resultado una menor estabilidad biomecánica de la córnea. Por ej.: queratocono, degeneración marginal pelúcida. ⁽¹³⁾
Distrofia endotelial de Fuchs (DCEF)	Trastorno degenerativo del endotelio corneal donde se afecta la membrana de Descemet, se caracteriza por engrosamiento debido a una falla en la actividad de la bomba iónica limitando la reabsorción de fluidos y causando acumulación de agua llamada guttas. ⁽¹⁴⁾
Queratopatía bullosa (QB)	Alteración corneal producida por la pérdida de células endoteliales debido a una falla de la bomba Na^+/K^+ ATPasa que se encuentra en la capa endotelial generando un edema corneal irreversible. ^{(15) (16)}
Queratitis	Inflamación de la córnea, puede ser causada por proliferación de microorganismos en el tejido, bacterias, virus y hongos. Es la principal causa de ceguera monocular. ⁽¹⁷⁾
Leucoma	Opacidad corneal que afecta la estructura y función corneal, genera tejido fibrótico de mayor densidad en una o más capas corneales causas frecuentes son heridas cicatrizadas, úlceras, quemaduras o infecciones corneales. ⁽¹⁸⁾
Trauma Ocular	Lesión originada por mecanismos contusos o penetrantes sobre el globo ocular. Los traumatismos oculares son responsables de 19 millones de casos de ceguera según la Organización Mundial de la Salud. ⁽¹⁹⁾

2.5 Tratamientos

Los tratamientos para las patologías que afectan a la córnea se pueden dividir en no quirúrgicos (lentes ópticos o de contacto) y quirúrgicos.

Existe un tratamiento quirúrgico Gold standard en afecciones corneales asociadas a defectos en la transparencia del tejido. La queratoplastia (QP) es una técnica quirúrgica que consiste en sustituir la córnea dañada por otra sana en donde se requiere de un tejido corneal humano donado. Las patologías en las cuales se indica este procedimiento son: Queratocono, queratopatía bullosa postquirúrgica, distrofias endoteliales, traumatismos corneales, queratitis herpéticas, ulcerativas, virales entre otras. Sin embargo, tiene algunas desventajas asociadas como: el acceso a estos tratamientos en el mundo es limitado por escasez de donantes, el costo económico para acceder a ellos es elevado y el riesgo que existe sobre las tasas de rechazo inmunológico descritas alcanza un 20 a 30 % de los trasplantes realizados. ⁽²³⁾ Relacionadas al procedimiento son, el rechazo del tejido, complicaciones con las suturas, riesgo de neovascularización y/o infección corneal, no obstante, existen otras opciones de implantes artificiales como las queratoprótesis Boston tipo I ⁽²⁰⁾ que simula una córnea nativa (Ver Figura 7). Estas prótesis se utilizan para recuperar la visión en un ojo ciego cuando los trasplantes de córnea no son posibles, en quienes se prevé que puede fallar o por rechazo del injerto corneal. Algunas desventajas para las prótesis artificiales es el desarrollo de otras afecciones oftalmológicas como la alteración de la presión intraocular (glaucoma), condición que se ha reportado en un 35% de los pacientes operados y los desprendimientos de retina (DR) en un 20% de los casos estudiados. ^{(21), (22)}

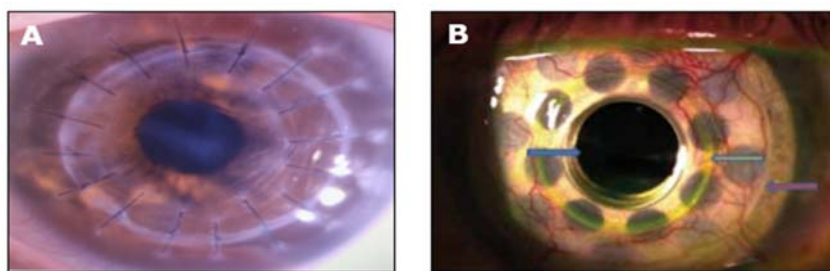


Figura 7. Fotografías de pacientes trasplantados. **A)** Queratoplastia (QP) (F. García 2022 Clínica ISV), **B)** Queratoprótesis Boston tipo I. ⁽²¹⁾

Los injertos de córnea siguen siendo el *Gold Standard* a nivel mundial, sin embargo y considerando la escasa donación de tejido corneal, haciendo crecer la necesidad de implantes corneales alternativos. En este aspecto, la Ingeniería de tejidos es una alternativa que ha intentado dar respuesta a la ausencia de una terapia eficaz, mediante la creación de tejidos artificiales que sean capaces de reemplazar el tejido corneal dañado⁽²⁴⁾, cumpliendo con características biomiméticas de una córnea nativa. Esta área ha progresado exponencialmente mostrando ventajas respecto al costo, almacenamiento y transporte de implantes corneales sintéticos.⁽²⁵⁾

El tejido corneal, elaborado mediante bioingeniería, ha adquirido una amplia atención para ser utilizado como un nuevo tratamiento oftalmológico. La mayor parte de los materiales biomiméticos propuestos a la fecha están basados en colágeno, no obstante, los biomateriales de andamiaje también consideran distintas materias primas entre ellas el quitosano, alginato, celulosa, agarosa, gelatina, polilisina y el uso de reticuladores como el glutaraldehído (ver tabla 2). Estos compuestos al interactuar con sistemas biológicos deben poseer propiedades como la biocompatibilidad, biodegradables, no tóxicos, mantener propiedades mecánicas, ópticas, alta resistencia química, térmica, morfología y un diseño que imite al tejido a reemplazar, siendo fundamental para permitir el desarrollo del microambiente celular.^{(26), (27), (28)}

Entre los tipos de materiales a destacar en tratamientos para córnea, los hidrogeles han dado paso a nuevas fronteras en la regeneración corneal. Los hidrogeles son una red tridimensional compuesta por polímeros hidrofílicos (naturales o sintéticos), biomoléculas (por ej. proteínas y péptidos), y /o aditivos. Esta red tiene la capacidad de absorber una gran cantidad de agua, hinchándose y aumentando considerablemente su volumen sin perder su forma, siendo esta una de sus propiedades más importantes.⁽²⁹⁾

Los hidrogeles basados en colágeno tipo I y III muestran una mayor resistencia mecánica, estabilidad, propiedades ópticas (dispersión, transmisión de la luz) semejantes a las de la córnea humana, permitiendo la regeneración de células corneales en modelos animales.⁽³⁰⁾ Adicionalmente, para una adecuada infiltración celular es necesario contar con alta porosidad. Se sabe que el tamaño de un poro óptimo debe permitir la penetración de células del huésped y, debe estar entre los 0,8 a 8 micras.⁽³¹⁾

(32)

Tabla 2. Biomateriales utilizados en ingeniería de tejidos corneales.

2.6 Biomaterial	2.7 Descripción
Quitosano	Es un polímero natural derivado de caparazones de crustáceos, exoesqueletos de insectos, hongos y plantas. Algunas de sus propiedades biológicas son mucoadhesión, bactericida, capacidad cicatricial, baja solubilidad en agua y no es tóxico. ⁽³³⁾
Alginato	Es un biopolímero obtenido de algas pardas, posee propiedades de aglutinamiento, gelificación, espesamiento y maleabilidad. Es utilizado en diversas áreas acuicultura, odontología y oftalmología (creación de lentes de contacto). Los geles de alginato se utilizan como vehículos de suministros celulares, permitiendo la localización de células trasplantadas y controlar así su destino. ⁽³⁴⁾
Gelatina	Es un polímero natural económico derivado de la desnaturalización por hidrólisis del colágeno. ⁽³⁵⁾ Este biomaterial es una sustancia incolora o ligeramente amarilla, tiene una alta capacidad de hinchamiento y logra absorber de 5 a 10 veces su peso en agua para formar un gel. ⁽³⁶⁾ Es uno de los biomateriales más utilizados en el entrecruzamiento de hidrogeles por sus propiedades de solubilidad y antigenicidad, estimula la unión y crecimiento celular, puede regular la degradación de metaloproteinasas en la matriz. ⁽³⁷⁾
Polilisina	Es una solución utilizada para recubrir artículos de plástico y vidrio, estimula la adhesión de las células, se utiliza para realizar entrecruzamiento de partículas o la entrega de material genético, es soluble en agua y etanol. ⁽³⁸⁾
Glutaraldehído (GA)	Agente de reticulación para materiales biomédicos mejora las propiedades de tracción de las redes de hidrogeles, es soluble, tóxico, pero al entrar en contacto con agua se polimeriza inactivando su toxicidad. ⁽³⁹⁾

Las córneas artificiales creadas mediante bioingeniería tienen ventajas significativas por sobre las córneas donadas:

- 1) Evitar el rechazo inmunológico inducido por células alogénicas, enfermedades por infección ocular o disfunción del tejido donado.
- 2) La córnea artificial se puede modificar junto a los avances en biomateriales, creación de nuevos biomateriales, técnicas de revestimiento y utilización de nanopartículas.
- 3) Al utilizar compuestos específicos se puede controlar la capacidad de hinchamiento y homogeneidad del tejido evitando así patologías en las que hay desequilibrio de osmolaridad.
- 4) Gracias a las técnicas de ingeniería se puede controlar las propiedades ópticas, biomecánicas del tejido obteniendo una córnea totalmente funcional y transparente.
- 5) Un sistema de fabricación mecanizado garantiza el control de enfermedades al utilizar biomateriales que no generen toxicidad y sean estériles.
- 6) La obtención de córneas sintéticas que favorecen el crecimiento celular ofrece una posible solución ante la escasez de córneas donantes humanas. ⁽⁴⁰⁾

Uno de los trabajos más citados en la creación de andamios de colágeno fue el realizado por Griffith y cols. En el año 1999 quienes crearon una matriz corneal multicapa de hidrogel adicionado con células epiteliales y células endoteliales en la parte superior e inferior, demostrando que su construcción era semejante en morfología y transparencia a una córnea nativa. ⁽⁴¹⁾

Algunos investigadores han intentado replicar con mayor precisión el estroma corneal, uno de ellos es el grupo de Chen y cols. En el año 2005, establecieron una formulación que incluía colágeno, quitosano y hialuronato de sodio para generar una matriz, en ella se evaluó el crecimiento de células epiteliales corneales, endoteliales y queratocitos. El andamio idóneo para la sobrevivencia celular estuvo compuesto por 20% de colágeno, 10% de quitosano y un 5% de hialuronato de sodio, el cual se implantó *in vivo* en conejos

y se degradó a los 5 meses. Se encontró que el constructo tenía una transparencia que otorgaba un 95% de transmisión de luz, además logró el crecimiento de los 3 tipos celulares estudiados. ⁽⁴¹⁾

En el mismo año otra investigación del grupo de Hu y col. (2005) implantaron una matriz biomimética *in vivo* en conejos para evaluar la posible reducción de la transparencia del andamio sintético construido en base a ácido poliglicólico (PGA) sembrado con células estromales corneales. Se observó que el andamio implantado era transparente y evaluaron mediante la expresión de GFP, el origen celular en el estroma construido. Luego de 8 semanas, mediante evaluación histológica observaron que las células estromales marcadas provenían de los andamios insertados, lo que sugiere que derivaron de los implantes, y no de células estromales corneales propias del modelo animal. ⁽⁴¹⁾

En el año 2008, Griffith *et al.* demostraron la transparencia óptica de hidrogeles en base a colágeno con carbodiimida (EDC/NHS). En evaluaciones *in vitro*, no se observó citotoxicidad y las tasas de crecimiento epitelial tampoco se vieron afectadas. En el caso de modelo *in vivo* de conejo, al implantar este sustituto corneal, la reepitelización del tejido ocurrió en una semana, se probaron 24 trasplantes y sólo uno de ellos mostró una ligera zona edematosa a los 6 meses de realizada la cirugía. ⁽²⁸⁾

En el año 2010 Fagerholm y colaboradores realizaron un estudio clínico de seguimiento de 2 años a 10 pacientes a quienes se les incorporó una córnea artificial basadas en colágeno humano recombinante sintetizado en levadura y modificado genéticamente, para reemplazar córneas afectadas por queratocono e infección corneal. Se observó que la capa epitelial recubrió el implante, los nervios corneales cortados volvieron a crecer y fueron sensibles a estimulación mecánica, la dificultad en este estudio fue el resultado de la visión, ya que no lograban una buena agudeza visual como los pacientes que reciben córneas donadas humanas. ⁽⁴²⁾

En el año 2013, Stulting y colaboradores realizaron un estudio de donantes de córneas, evaluando la relación entre los factores del donante y el rechazo del aloinjerto en ojos sometidos a queratoplastia. Se demostró que la tasa de rechazo del injerto es mayor en ojos edematizados, las mujeres tenían una probabilidad más alta de rechazo que los hombres, no se encontró relación con la variable edad del donante y un 23% de los pacientes sometidos al procedimiento experimentaron un evento de rechazo dentro de los 5 años posteriores a la cirugía. ⁽⁴³⁾

Una investigación realizada el año 2016 por Ramírez y col. evaluaron mediante técnica de microscopía electrónica de barrido realizaron una caracterización de la morfología de hidrogeles sintetizados por dos métodos distintos, uno sintetizado mediante baño maría y otro por radiación microondas. Como resultado de la morfología de los poros, se encontró poros más profundos al utilizar la síntesis mediante baño maría y poros más uniformes en el preparado con radiación microondas. ⁽⁴⁴⁾

A pesar de los avances en el área, aún existen desafíos en el campo de la ingeniería de tejidos corneales sintéticos para lograr un diseño de tejido biocompatible, ópticamente transparente que logre mantener una estabilidad similar a la córnea, que permita el soporte adecuado de células y estas puedan desarrollar su propia matriz promoviendo la viabilidad celular. ⁽²⁸⁾

En el año 2018, el equipo de Griffith publicó un ensayo clínico de 6 pacientes con alto riesgo de rechazar aloinjertos a los que se les trasplantó matriz de córneas porcinas acelulares (APCM) con colágeno recombinante humano y fosforilcolina, en todos los pacientes evaluados se observó una mejoría significativa tanto en visión, sensibilidad y regeneración nerviosa demostrando que los implantes animales acelulares son una opción potencialmente segura y eficaz. ⁽⁶⁵⁾

3 Definición del problema

En el mundo hay 1300 personas que viven con deficiencia visual asociada a pérdida de transparencia corneal, hoy en día la donación de córneas sigue siendo escasa y este número se ha visto aún más disminuido debido a la pandemia del COVID 19. ^{(45), (46)}

En Chile existe una lista de espera para acceder a queratoplastia de 879 personas hasta diciembre de 2022, durante ese mismo año la realización de este procedimiento disminuyó en un 50% respecto de años anteriores. A su vez en nuestro país no existen investigaciones relacionadas a la fabricación de córneas artificiales y, no hay protocolos de caracterización morfológica de sustitutos corneales basados en hidrogeles como posible tratamiento oftalmológico. Basado en lo anterior, formulamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Los sustitutos corneales biomiméticos basados en hidrogeles multilaminares, lograrán tener las características morfológicas y morfométricas equivalentes a una córnea nativa?

Nuestro objetivo será analizar las características estructurales e imagenológicas de hidrogeles multilaminares sintéticos para desarrollar un protocolo de validación morfológica del sustituto corneal. Esto se realizará mediante técnicas histológicas convencionales y ultraestructurales del biomaterial.

4 HIPÓTESIS

Los hidrogeles multilaminares sintéticos inspirados en la arquitectura corneal poseen características morfológicas e imagenológicas equivalentes a una córnea nativa.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Obtener un protocolo para fabricar y validar hidrogeles multilaminares sintéticos a través del análisis de las características estructurales e imagenológicas de hidrogeles multilaminares sintéticos como posible sustituto corneal biomimético.

5.1.1 Objetivos específicos

1. Aplicar protocolo de inclusión que permita el procesamiento histológico de los sustitutos corneales sintéticos.
2. Caracterizar la estructura morfológica del sustituto corneal sintético mediante técnicas histológicas, hematoxilina- eosina y van Gieson
3. Describir las características ultraestructurales del sustituto corneal sintético mediante microscopía electrónica de barrido.
4. Evaluar el sustituto corneal sintético mediante tomografía de coherencia óptica.
5. Evaluar la viabilidad celular en un sustituto corneal sintético *in vitro*.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Metodología General.

6.1.1 Diseño de investigación: Estudio tipo experimental

En este estudio se utilizó material biológico, córnea nativa humana de descarte obtenida a través de consentimiento informado desde Clínica Oftalmológica ISV, (Ver Anexo 1). Además, matrices de hidrogel (sintéticas) obtenidas desde el Centro de Nanotecnología de la Universidad Mayor.

El control y las matrices sintéticas se procesaron mediante técnicas histológicas de rutina tinción de hematoxilina eosina (HE) y tinción Van Gieson (VG), la evaluación imagenológica ultraestructural se realizó a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) y tomografía de coherencia óptica (OCT). El número de muestras fue 15 por cada matriz evaluada, realizándose para cada protocolo experimental de validación 3 réplicas. Se utilizó como control córnea nativa humana (ver Figura 8) siendo preservada en suero fisiológico pH 7.0 a 4 °C desde que fue obtenida hasta su procesamiento.



Figura 8. Imagen de córnea nativa humana (Imagen propia, F. García 2022, Laboratorio

de Ciencias Morfológicas, Universidad Valparaíso).

A) Variables evaluadas:

Intensidad de tinción y distribución de los componentes analizados mediante morfología convencional. Grosor total, grosor por capas y porosidad. Diámetro total e individual de cada capa, paquimetría.

Composición de matrices sintéticas: Los biomateriales que componen las matrices sintéticas son los siguientes: 1% gelatina, 1% quitosano, 1% polilisina y como agente reticulador glutaraldehído en concentraciones [0,05% y 0,10%]. Cada una de estas formulaciones se preparó con 3 tipos de hidratación (ver Tabla 3). La hidratación se entiende como el medio en el cual fue hidratada cada lámina del hidrogel. Cada matriz sintética posee 4 capas iniciales de 50 µm de grosor promedio cada una.

B) Tipos de hidratación para matrices sintéticas:

H1: Utilización de agua miliQ a pH 7.0.

H2: Utilización de solución mezcla (todos los componentes de cada matriz).

H3: Utilización de solución reticulada compuesta por 1% de gelatina: 1%, de quitosano 1%, polilisina 1% y glutaraldehído 2%.

Tabla 3. Resumen de componentes para cada matriz sintética evaluada con técnicas histológicas.

Formulación	Componentes	Reticulación	Hidratación
C1H1	G1, Q1, P1	GA [0,05%]	H1
C1H2	G1, Q1, P1	GA [0,05%]	H2
C1H3	G1, Q1, P1	GA [0,05%]	H3
C2H1	G1, Q1, P1	GA [0,10%]	H1
C2H2	G1, Q1, P1	GA [0,10%]	H2
C2H3	G1, Q1, P1	GA [0,10%]	H3

Tabla 4. Resumen de componentes para cada matriz sintética evaluada con técnicas ultraestructurales basadas en composición C2H3.

Formulación	Componentes	Reticulación	Hidratación
C2H3-I	G1, Q1	GA [0,10%]	H3
C2H3-II	G1, P1	GA [0,10%]	H3
C2H3-III	G1, Q1, P1	GA [0,10%]	H3
C2H3-IV	G2, Q1, P1	GA [0,10%]	H3

*G: gelatina 1%, Q1: Quitosano1%, P1: Polilisina1% y GA: Glutaraldehído.

Objetivo específico N°1: Procesamiento de las matrices sintéticas candidatas a sustitutos corneales. Aplicación de protocolo de inclusión.

Inclusión en parafina

Para poder realizar el análisis histológico de las matrices artificiales se debió evaluar si estas no se degradan al realizar procedimiento de fijación de la muestra previo al protocolo de inclusión en parafina.

Método utilizado: Protocolo de inclusión (Fijadores acuosos)

Procedimiento:

- 1) Prefijación de la muestra con hidratación en agua destilada a pH 7.0 y sucralosa al 30% durante 5 minutos.
- 2) Fijación de la muestra se mantuvo en paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo campana, luego se deshidrató en etanol al 70 % durante 12 horas a 4 °C de temperatura.
- 3) Post Fijación de la muestra se deshidrató en alcohol al 70% durante 15 minutos.
- 4) Aplicación de protocolo de inclusión (Ver anexo 2).

Todos los tiempos utilizados en el protocolo de inclusión se realizaron en 15 minutos cada uno.

El primer protocolo de inclusión realizado no contemplaba sucralosa en el paso de prefijación, esto se modificó debido a los resultados en el proceso de caracterización morfológica de las muestras descrito en la sección de resultados para el objetivo específico N°2.

Una vez obtenido los tacos de parafina de todas las muestras se utilizó un micrótopo para realizar cortes histológicos de manera transversal de 5 micrómetros de grosor.

Objetivo específico N°2: Caracterizar la estructura morfológica de matrices sintéticas mediante técnicas histológicas de rutina.

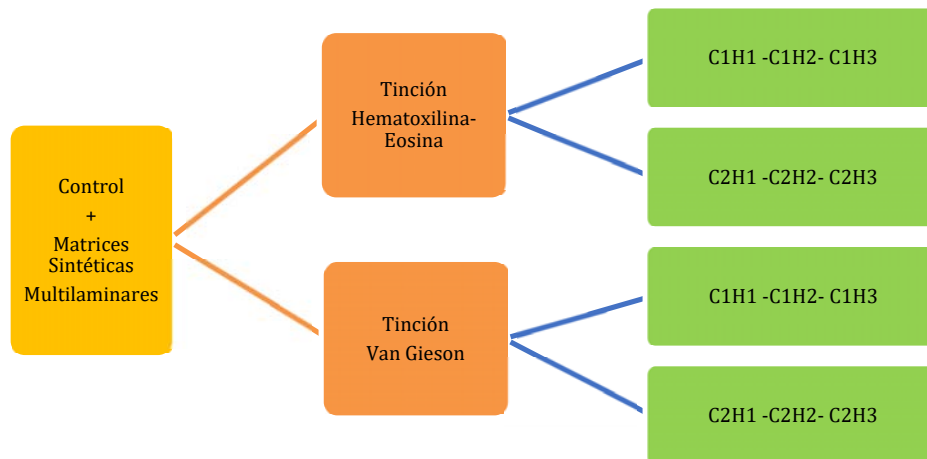


Figura 9. Esquema resumen del procesamiento de matrices sintéticas y control.

Método utilizado: Tinción histológica Hematoxilina- Eosina y Van Gieson.

- A) Técnica hematoxilina – Eosina (HE): la tinción hematoxilina consiste en un colorante catiónico este nos permitió observar estructuras ácidas en tono azul violeta como los núcleos en las células epiteliales y endoteliales en el tejido corneal humano, en las matrices sintéticas se une a las cargas negativas de sus compuestos en este caso a los aminoácidos presente en la gelatina y quitosano por otro lado, la eosina es un colorante aniónico que permitió evaluar las estructuras básicas en las matrices sintéticas lo que se observará de tono anaranjado rosa localizadas en la matriz extracelular.⁽⁴⁷⁾
- B) Técnica Van Gieson (VG): esta técnica permite la tinción de fibras de colágeno en los tejidos mostrando una tonalidad rosado-rojo y en color marrón a negro se puede observar estructuras con componentes básicos, que correspondería a

núcleos celulares y de color amarillo el restante de la matriz extracelular. En el tejido corneal las células epiteliales se observaron de color marrón y el estroma de color rosado. En las matrices sintéticas los grupos catiónicos de la gelatina sienten afinidad por los grupos aniónicos de la tinción, se observó mayormente en tonalidad amarillo anaranjado. ⁽⁴⁸⁾

Procedimiento: Se realizaron cortes en el microtomo de 5 µm de grosor de todos los tacos de parafina, cada una de las muestras se tiñeron con ambos protocolos de tinción (ver anexo 3). Se utilizaron portaobjetos con doble capa de polilisina, cada uno de los cortes se secaron durante 1 hora a 60 °C en la estufa, luego se desparafinó, rehidrató y lavó con agua destilada. Con respecto a los tiempos de tinción para H-E: hematoxilina se aplicó en las muestras durante 5 minutos y eosina se aplicó durante 4 segundos. En VG: hematoxilina de Weigert durante 5 minutos y van Gieson durante 30 minutos todas a temperatura ambiente. Para finalizar, las muestras fueron deshidratadas y aclaradas, para luego ser cubiertas con entellán.

Adquisición de imagen: Las imágenes histológicas se captaron mediante un microscopio óptico marca Olympus modelo CX43RF, cámara de captura marca Euromex modelo VC 3040. El software de captura de imágenes marca Euromex versión Image Focus Alpha v1.3.7.19728. Para obtener resultados fiables y reproducibles la adquisición fue estandarizada para todas las réplicas según cada tinción (ver anexo 4), ya sea tiempo de exposición, balance de blancos y fondo, se utilizó aumento 40x para imágenes de matrices sintéticas y 200x para control.

Procesamiento imagenológico: La cuantificación de tinción, morfometría de las matrices multicapas y control se realizó en el software de análisis ImageJ versión 1.53t. Se crearon dos algoritmos de aplicación (Macros) para cada una de las tinciones utilizadas para evaluar la intensidad de tinción y área (ver anexo 5). Esto permitió un análisis automatizado descrito en los siguientes pasos:

- a) Preparación de la imagen: Todas las imágenes fueron evaluadas en color RGB (red, green o blue) o en escala de grises, cada imagen se realizó una separación de estos colores seleccionando el que identificaba mejor los componentes de las matrices evaluadas luego se transformó a escala de grises en 8 bits (Figura 10).
- b) Seleccionar área de interés: Se seleccionó el área de interés mediante la herramienta "threshold" (umbral) en todas las imágenes.
- c) Análisis: Se utilizaron dos imágenes por cada muestra para calcular las intensidades de tinción, una imagen que contenga la señal a analizar (ROI), y otra con el área total evaluada de la imagen. El programa entregó las mediciones de área total, área de interés, promedio, mínimo y máximo de la intensidad. Las unidades de medida son en píxeles al cuadrado tanto para el área seleccionada de la tinción y el área total de las imágenes en escala 8 bits.

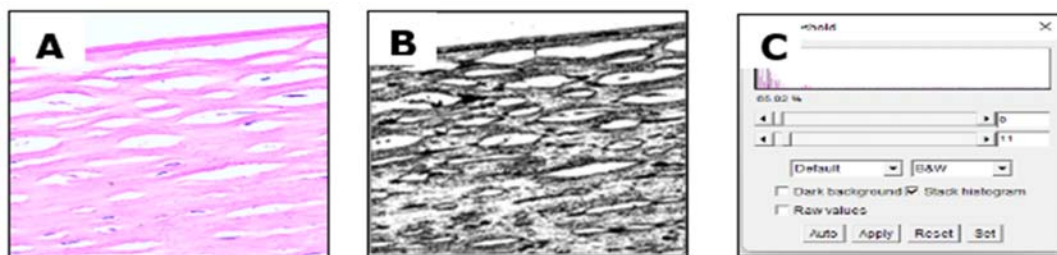


Figura 10. Imágenes representativas del proceso de cuantificación de intensidad de tinciones, utilizado para H-E y VG. A) Imagen obtenida por microscopía óptica B) Imagen en 8 bits, C) herramienta "threshold" utilizada en software ImageJ.

Para las mediciones de grosor total de las matrices se realizó una conversión de la unidad de medida desde píxel a micras, para ello se seleccionó la imagen obtenida mediante microscopio electrónico de barrido con barra de escala incluida. Se utilizó la herramienta "set scale", se ingresó el valor de la barra correspondiente y se seleccionó "global" para que todas las imágenes se puedan procesar con la misma unidad de medida, en este caso micras.

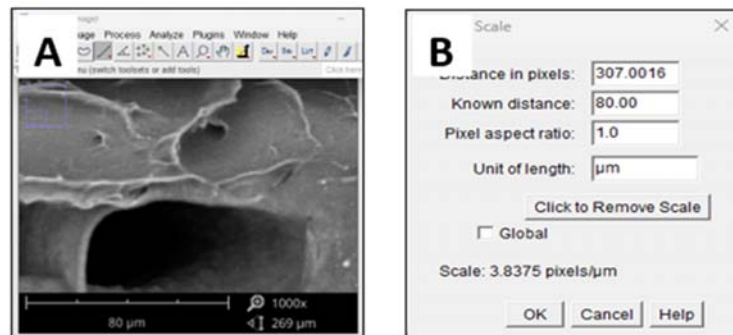


Figura 11. Imágenes representativas del proceso de conversión de escala, utilizado para imágenes obtenidas con microscopio óptico. A) Imagen obtenida por microscopía óptica con barra escala B) herramienta "set scale" utilizada en software ImageJ.

Objetivo específico N°3: Evaluación ultraestructural de matrices sintéticas mediante microscopio electrónico de barrido.

El microscopio electrónico de barrido (SEM) permite la observación y caracterización de alta resolución, entregando información morfológica superficial. ⁽⁴⁹⁾

Método Utilizado: Microscopio electrónico de Barrido

Procedimiento: Se realizó liofilización de las muestras durante 1 hora, antes de ser evaluadas en el microscopio, luego se ubicaron en un pin (Figura 12) con cinta adhesiva de carbono que es utilizado al interior del equipo al vacío donde el haz de electrones permitió la obtención de imágenes en distintas magnificaciones.



Figura 12. Pin utilizados para colocar las muestras evaluadas en microscopio electrónico de barrido.

Adquisición de imágenes: Las imágenes se obtuvieron con microscopio electrónico de barrido SEM Phenom en distintas magnificaciones. Las matrices se liofilizaron durante una hora, luego se colocó cada matriz sobre una cinta de carbono para ser fijadas a la estructura (pin) del equipo.

Procesamiento imagenológico: La cuantificación de grosores total e individual de las matrices multicapas y control se realizó en el software de análisis ImageJ versión 1.53t. Se realizó cambio de escala desde píxel a micras en todas las imágenes, para poder obtener las mediciones en micras. Se consideró en las imágenes una barra escala para poder hacer la conversión de la unidad de medida.

Conversión de unidad de medida:

Se seleccionó la imagen obtenida mediante microscopio electrónico de barrido con barra escala incluida (Figura 13). Se utilizó la herramienta "set scale" en donde se ingresó el valor de la barra correspondiente y seleccionó "global" para que todas las imágenes se puedan procesar con la misma unidad de medida en este caso micras.

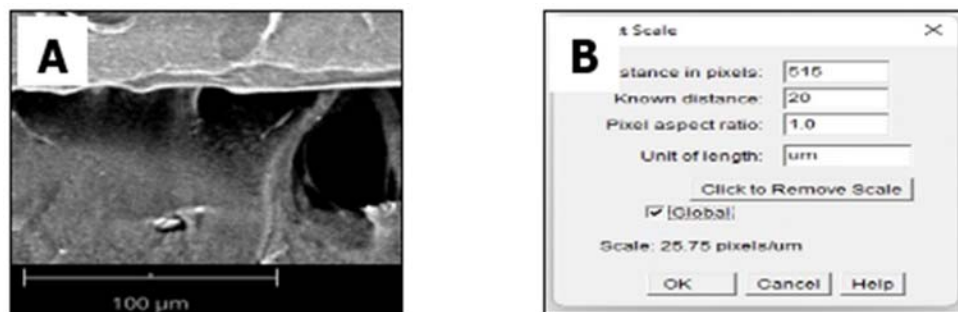


Figura 13. Imágenes para cambio de escala. A) Imagen de microscopio electrónico de barrido con barra escala en micras B) herramienta "set scale" utilizada en software ImageJ.

Análisis: El análisis de medidas obtenidas a través del software ImageJ, entregó el grosor total e individual de capas, el promedio, menor y mayor valor en micras. Para los resultados de porosidad se realizó procesamiento de imagen similar al de la intensidad de tinción.

a) Preparación de la imagen: Todas las imágenes pueden ser evaluadas en color RGB (red, green o blue) o en escala de grises, cada imagen se realizó una separación de estos colores seleccionando el que identificaba mejor los componentes de las matrices evaluadas luego se transforma a escala de grises en 8 bits.

b) Seleccionar área de interés: Se seleccionó la intensidad de interés mediante la herramienta "threshold" (umbral) en todas las imágenes.

c) Conversión de unidad de medida: Se debe hacer cambio en la unidad de medida de pixel a micras para poder medir el tamaño de los poros de cada imagen. Se seleccionó la imagen obtenida mediante microscopio electrónico de barrido con barra escala incluida (Figura 14). Se utilizó la herramienta "set scale" en donde se ingresó el valor de la barra correspondiente y seleccionó "global" para que todas las imágenes se puedan procesar con la misma unidad de medida en este caso micras.

d) Análisis: Se seleccionaron todos los poros que lograron ser definidos en las imágenes, luego se obtuvo el valor mínimo, máximo y promedio en micras.

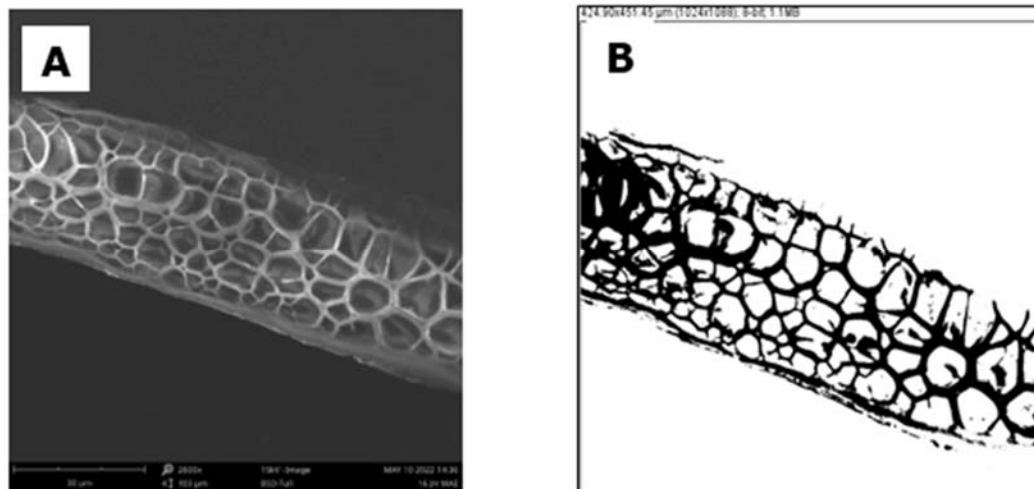


Figura 14. Imágenes representativas para cambio de escala y selección de área de interés. A) Imagen de microscopio electrónico de barrido de porosidad con barra escala en micras B) Imagen procesada a 8 bits y con cambio de escala con el área de interés seleccionada para ser medida en software ImageJ.

Objetivo específico N°4: Evaluación ultraestructural de matrices mediante Tomografía de coherencia óptica.

La tomografía de coherencia óptica (OCT) es una técnica de diagnóstico no invasiva y de no contacto en donde se obtienen imágenes caracterizadas por la realización de cortes tomográficos micrométricos a través de luz sobre el tejido *in vivo* a estudiar, con una resolución espacial superior al ultrasonido con detalles similares a los de la histología.⁽⁵⁰⁾ El principio básico y fundamental del OCT es la reflectometría de baja coherencia basado en interferometría de Michelson (1887) a esto se adiciona una fuente de luz infrarroja con longitud de onda que varía entre los 840 nm y los 1050 nm. La técnica de interferometría divide la señal en 2 haces, el de referencia y el otro proveniente de la muestra, para posteriormente acoplar ambos haces en un detector (interferómetro).

Procedimiento: Se utilizó un modelo fantoma tamaño escala de una córnea nativa este se instaló en apoya frente del equipo OCT (Figura 15), junto a las matrices sintéticas

multilaminares en dos condiciones: secas e hidratadas. Para las matrices secas se colocaron 4 capas de grosores similares una sobre la otra, y para las matrices hidratadas se sumergieron durante 5 minutos en agua destilada pH neutro (7.0) para luego ser montadas una sobre otra en el modelo fantoma.

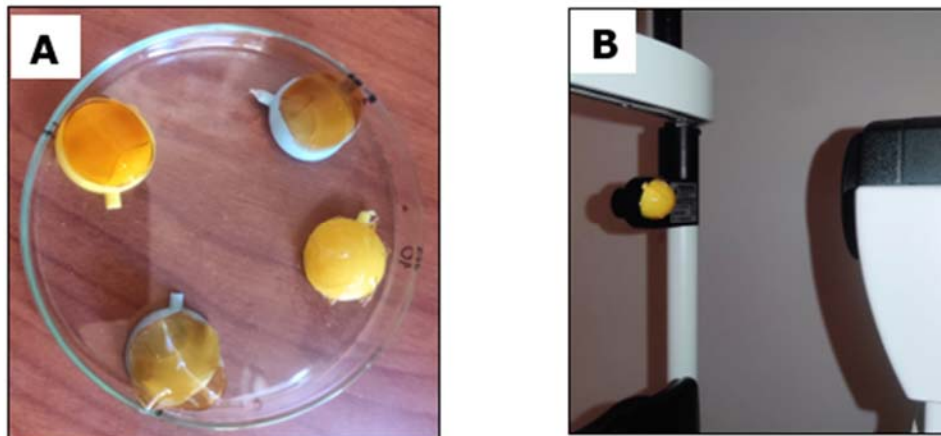


Figura 15. A) Matrices sintéticas multicapas hidratadas. B) Posicionamiento fantoma en equipo OCT de polo anterior.

Adquisición de las imágenes: Las imágenes se obtuvieron mediante tomografía de coherencia óptica de polo anterior Anterior versión 10.0.19042.

Procesamiento imagenológico: Se realizaron medición de grosores con la ayuda del caliper de medición del equipo oct de polo anterior, en zonas central (perpendicular al tejido), periférica (entre los 7 y 9 milímetros) y medición individual de capas obtenido en micras. Las imágenes se obtuvieron en imágenes 2D (scan) de 16 mm de diámetro mediante el cual se obtuvo los mapas paquimétricos de las matrices artificiales en ambas condiciones (seca e hidratada) para así evaluar la regularidad de las capas.

Objetivo específico N°5: Evaluar la viabilidad celular en un sustituto corneal sintético *in vitro*.

Método utilizado: Protocolo de cultivo y fijación.

Línea celular: Fibroblastos embrionarios de ratón NIH/3T3 (ATCC, CRL -1658).

Procedimiento: Protocolo utilizado se lava la placa con PBS 1 x 3 veces, añade tripsina y se incuba 5 minutos a 37 °C, se recogieron las células y se detuvo la acción de la tripsina con medio luego se centrifugó por 5 minutos a 2500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspenden en 1 mL para el conteo de células. Se sembraron 210.000 células por pocillo sobre las matrices sintéticas. Se realizó incubación a 37 °C con 5 % de CO₂. Se obtuvieron fotografías a campo claro a las 24 h, 48 h, y 72 h.

El protocolo de fijación utilizado fue con PFA 4 % durante 30 minutos, luego se lavó 3 veces con PBS 1x, se tiñó con DAPI. Se volvió a lavar 3 veces con PBS y se añadió PBS 1x para obtener imágenes en el DMI.

Procesamiento imagenológico: Se realizó procesamiento de las imágenes obtenidas con software ImageJ para el cálculo de porcentaje de área que recubrieron las células.

Análisis Estadístico:

Todos los resultados se registraron en una plantilla Excel/ versión 2022, según cada objetivo específico evaluado (Ver Anexo 6). Para este análisis de datos se utilizó el software estadístico Stata/ versión 17 y Graph Pad Prism / versión 8.0.2.

En el análisis estadístico se realizó una evaluación de distribución de datos para determinar si los datos se distribuyen de manera normal o no mediante test Kruskal Wallis obteniendo distribución de datos no normal (ver anexo 7), por lo tanto, se aplicó test no paramétrico Kruskal- Wallis. Para el análisis de correlación entre el espesor de las matrices y la intensidad de tinción se utilizó test de Kendall para revisar la independencia de los datos. En todos los casos la significación estadística se definió como $p < 0,05$ para un índice de confidencialidad del 95%.

7 RESULTADOS

7.1 Objetivo específico N°1: Procesamiento de las matrices candidatas a sustitutos corneales. Aplicación de protocolo de inclusión.

Se realizó el procesamiento de las muestras sintéticas aplicando el protocolo de inclusión de rutina, no obteniendo buenos resultados en la realización del objetivo específico n°2. Se observó que las muestras sintéticas se desintegraron y no se adherían a los portaobjetos luego de realizar el protocolo de inclusión (Figura 16). Posteriormente, se utilizó portaobjetos con doble polilisina, para mejorar la adherencia de las matrices al vidrio. También se redujo los tiempos de inclusión y se agregó sucralosa al 30% al proceso de hidratación de las muestras (Figura 17).

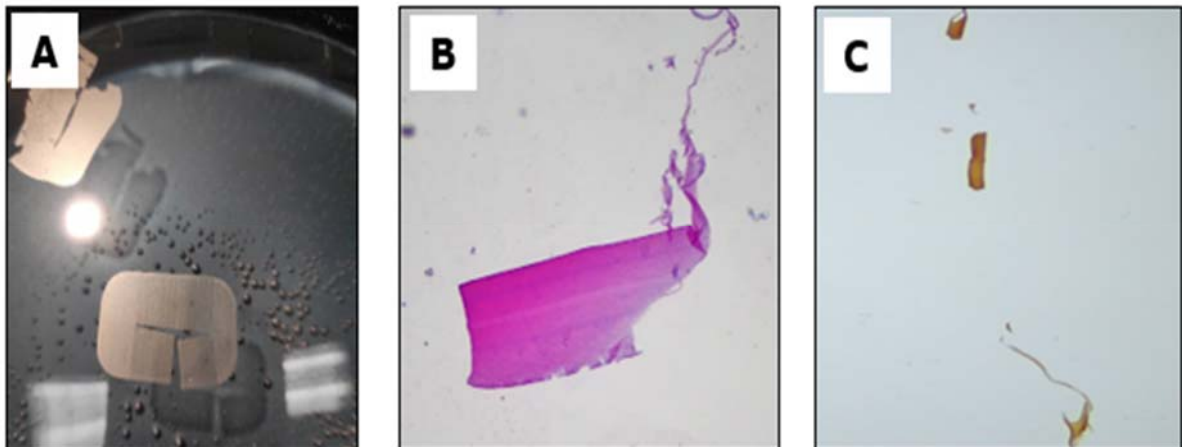


Figura 16. Imágenes post aplicación de protocolo de inclusión a muestras sintéticas en donde se puede observar defectos en el procesamiento histológico. A) Matrices sintéticas en el baño de estirado. B) Pérdida de la muestra post tinción H-E. C) Pérdida de la muestra post tinción VG.

7.1.1 Resultado objetivo específico 1

Protocolo de Inclusión aplicado a todas las matrices evaluadas:

Fijación de la muestra

- 1) Prefijación de la muestra con hidratación en agua destilada a pH 7.0 y sucralosa al 30% durante 5 minutos.
- 2) Fijación de la muestra se mantuvo en paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo campana, luego se deshidrató en etanol al 70% durante 12 horas a 4° de temperatura.
- 3) Post Fijación de la muestra se deshidrató en alcohol al 70% durante 15 minutos.

Inclusión de la muestra

- 1) Etanol de 70% durante 15 minutos
- 2) Alcohol de 80% durante 15 minutos
- 3) Alcohol de 95 (dos cambios de 15 minutos cada uno)
- 4) Alcohol de 100 (3 cambios de 15 minutos cada uno)
- 5) Xilol (3 cambios de 15 minutos cada uno)
- 6) Parafina (3 cambios de 15 minutos cada uno)

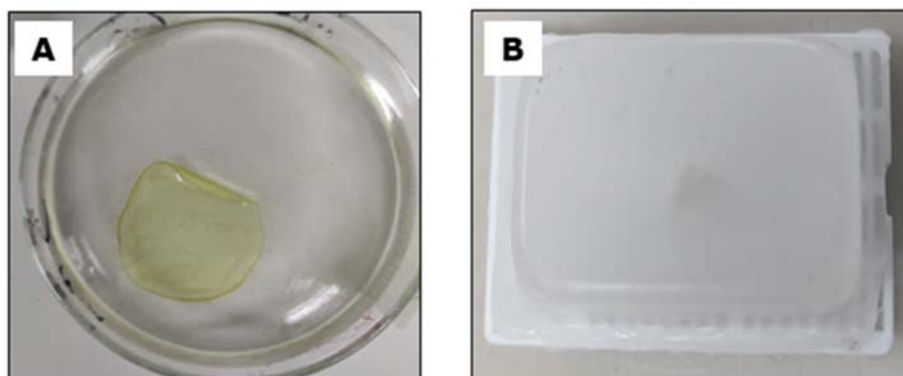


Figura 17. Imágenes macroscópicas de matrices sintéticas. A) Proceso de hidratación con sucralosa al 30%. B) Taco de parafina con matriz sintética post protocolo de inclusión.

7.2 Resultado objetivo específico N°2: Caracterizar la estructura morfológica de matrices mediante técnicas histológicas de rutina.

Para cada una de las 6 formulaciones, se generaron 15 muestras por cada tinción evaluada, las matrices sintéticas presentaron elasticidad y maleabilidad al momento de ser manipuladas en el laboratorio (Figura 18).



Figura 18. Imagen macroscópica de matriz sintética se observa conservación de forma y elasticidad luego de ser hidratada con sucralosa por 5 min.

7.2.1 Tinción Hematoxilina- Eosina

El análisis histológico en el grupo de control, córnea, (Figura 19) se observó laminillas entrelazadas organizadas en el centro y la periferia dejando ver espacios interfibrilares porosos en todo el estroma del tejido. Respecto a las matrices artificiales en concentración [0,05%] GA mostró una red de fibras homogéneas y regular conformada por al menos 3 capas, además hay una diferencia en la intensidad de la tinción entre las muestras.

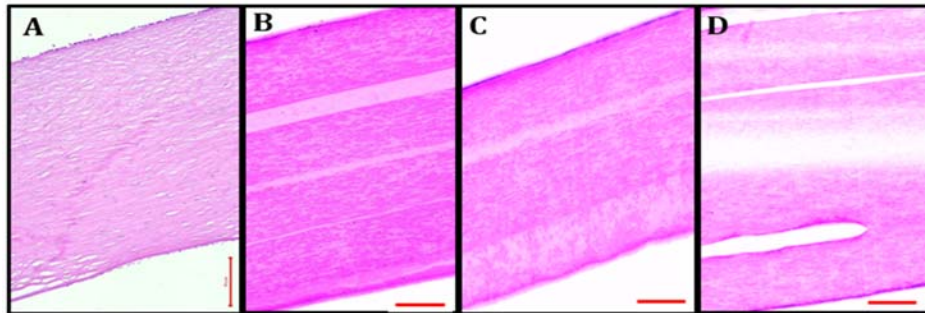


Figura 19. Análisis histológico de la integridad de matrices al [0,05 %] GA con tinción HE. A) Córnea nativa en aumento 10x. B) Matriz C1H1 aumento 40x. C) Matriz C1H2 aumento 40X. D) Matriz C1H3 aumento 40X. Barra escala representa de 20 μ m.

La intensidad de tinción HE se evaluó respecto del área total ocupada de las muestras, tanto del control como de las matrices sintéticas en concentración [0,05 %] GA. La mediana obtenida para el control fue de 0,571, mientras que, las matrices sintéticas C1H1 fue de 0,552 no observando cambios significativos luego de realizada la tinción, en cambio C1H2 y C1H3 si presentaron cambios significativos, siendo sus medianas de 0,380 y 0,362 respectivamente (Figura 20).

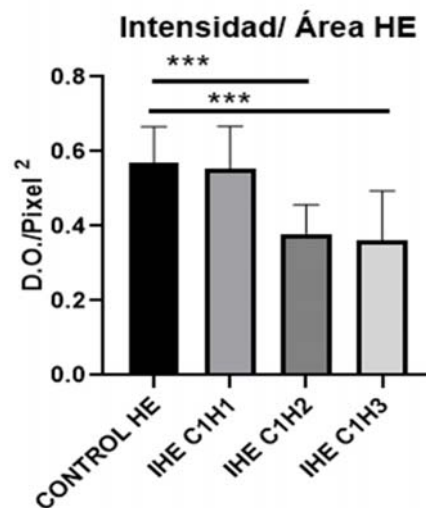


Figura 20. Gráfico de barras representativo de intensidad óptica de tinción HE en matrices sintéticas compuestas de [0,05 %] GA, *** $p < 0,05$ de significancia.

El análisis histológico para la tinción HE de las matrices sintéticas en concentración [0,10 %] GA se muestra una red de fibras homogéneas y regular homogénea conformada por al menos 3 capas, existe diferencia en la intensidad de tinción se logra apreciar más hematoxilina con respecto a las matrices de [0,05 %] GA y entre las muestras mismas (Figura 21).

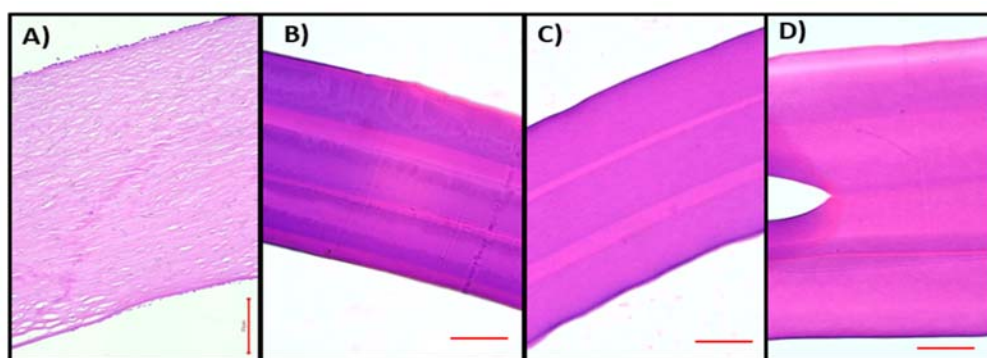


Figura 21. Análisis histológico de la integridad de capas de matrices en concentración [0,10 %] GA con tinción HE. A) Córnea nativa en aumento 10x. B) Matriz C2H1 aumento 40x. C) Matriz C2H2 aumento 40X. D) Matriz C2H3 aumento 40X. Barra escala representa 20 μm .

Para la intensidad de tinción de las matrices sintéticas en concentración [0,10 %] se obtuvo la mediana para cada una siendo estos valores para las matrices C2H1, C2H2 Y C2H3 de 0,548, 0,448 y 0,602, respectivamente, mientras que para el control se utilizó el mismo valor de la tinción HE anterior 0,571, no habiendo cambios significativos para estas matrices respecto del control (Figura 22).

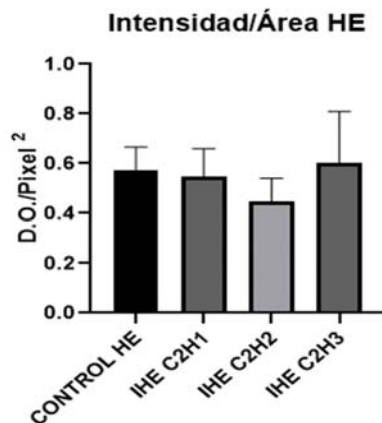


Figura 22. Gráfico de barras representativo de intensidad óptica de tinción HE en matrices sintéticas compuestas de [0,10%] GA, $p < 0,05$ de significancia.

Se realizó una comparación entre las intensidades de tinción con HE, en las matrices de concentración [0,05 %] y [0,10 %] de GA los resultados se observan en la siguiente gráfica (Figura 23).

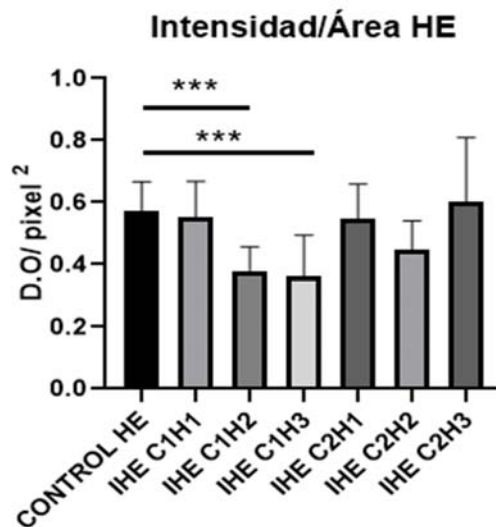


Figura 23. Gráfico de barras resumen de intensidad óptica de tinción HE para todas las matrices sintéticas compuestas de [0,05 %] y [0,10 %] GA, *** $p < 0,05$ de significancia.

7.2.2 Tinción Van Gieson

En el análisis histológico del grupo de control se observó una tinción rosada en el estroma correspondiente a fibras colágenas con espacios interfibrilares correspondiente a porosidades y marrón en las capas celulares (epitelio y endotelio). Respecto a las matrices artificiales en concentración [0,05 %] de GA mostró una red de fibras homogéneas y regular conformada por todos sus componentes en al menos 3 a 4 capas, si hay una diferencia en la intensidad de la tinción mediante la coloración amarilla (C) y anaranjada (B y D) en las muestras (Figura 24).

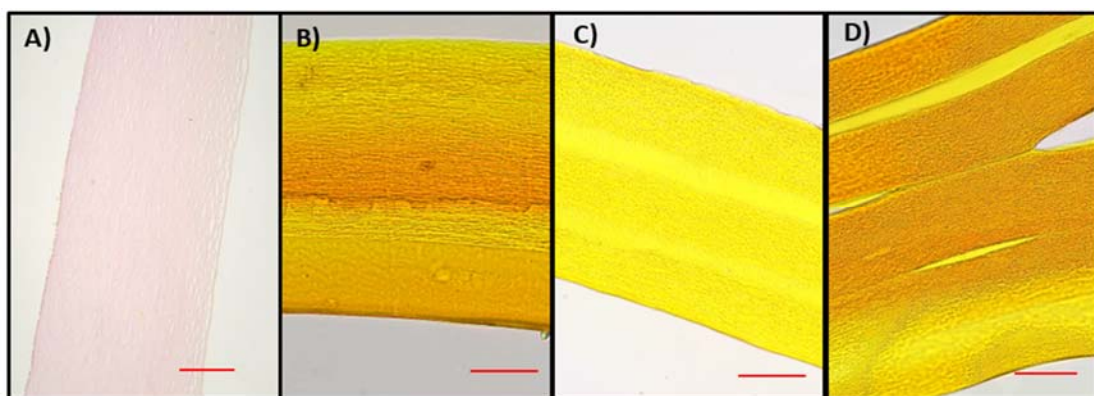


Figura 24. Análisis histológico de la integridad de capas de matrices sintéticas en concentración [0,05%] GA con tinción VG. A) Córnea nativa en aumento 10x. B) Matriz C1H1 aumento 40x. C) Matriz C1H2 aumento 40X. D) Matriz C1H3 aumento 40X. Barra escala representa 20 μm .

La mediana obtenida para la intensidad de tinción Van Gieson para las matrices sintéticas en concentración [0,05%] fueron de 0,649 para, el control y para las matrices C1H1, C1H2 Y C1H3 las medianas fueron 0,771, 0,457 y 0,725, respectivamente, no habiendo cambios significativos para estas matrices respecto del control (Figura 25).

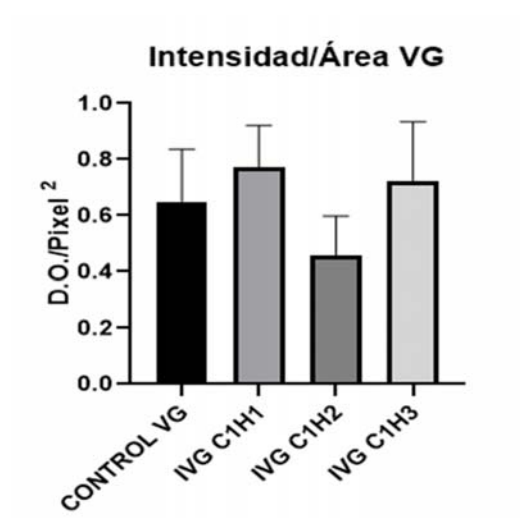


Figura 25. Gráfico de barras representativo de intensidad óptica de tinción VG en matrices sintéticas compuestas de [0,05 %] GA, $p < 0,05$ de significancia.

Para el análisis histológico del grupo de control se utilizó el mismo control que para las matrices sintéticas compuestas de [0,05%] GA. Respecto a las matrices artificiales en concentración [0,10%] de GA mostró una red de fibras homogéneas y regular conformada al menos de 3 a 4 capas, si hay una diferencia en la intensidad de la tinción mediante la coloración amarilla (B) y amarillo anaranjado (C y D) entre las muestras (Figura 26).

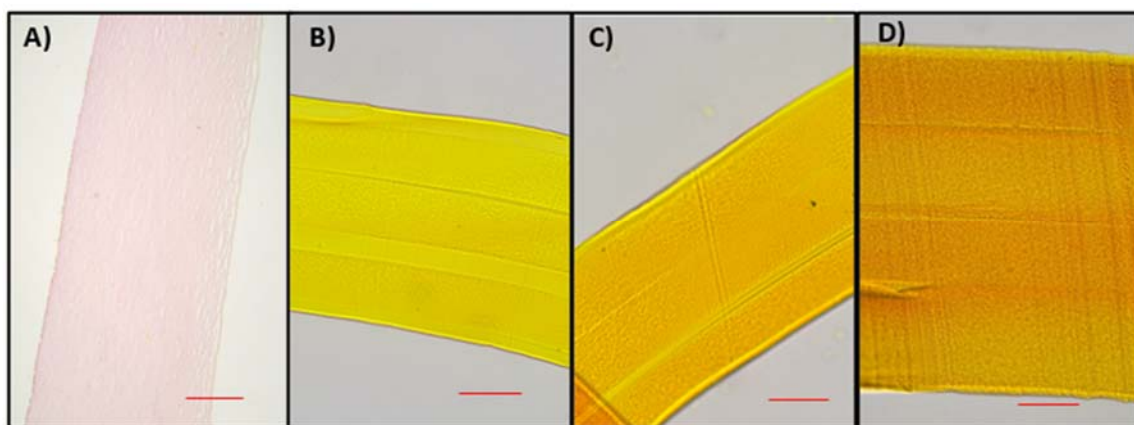


Figura 26. Análisis histológico de la integridad de capas de matrices sintéticas en concentración [0,10%] GA con tinción VG. A) Córnea nativa en aumento 10x. B) Matriz C2H1 aumento 40x. C) Matriz C2H2 aumento 40X. D) Matriz C2H3 aumento 40X. Barra escala representa 20 μm .

Las medianas obtenidas para la intensidades de tinción Van Gieson para las matrices sintéticas en concentración [0,10 %] fueron de 0,649 para el control y para las matrices C2H1, C2H2 Y C2H3 las medianas fueron 0,472, 0,345 y 0,722 respectivamente presentando un cambio significativo para la matriz C2H2 respecto del control (Figura 27).

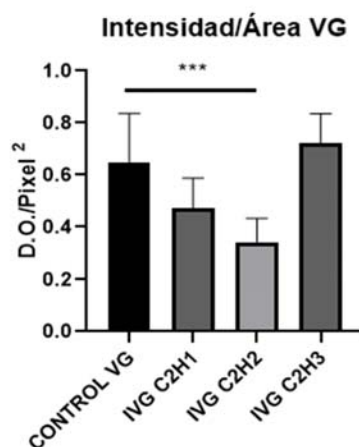


Figura 27. Gráfico de barras representativo de intensidad óptica de tinción VG en matrices sintéticas compuestas de [0,10%] GA, *** $p < 0,05$ de significancia.

Se realizó una comparación entre las intensidades de tinción con VG, en las matrices de concentración [0,05 %] y [0,10 %] de GA los resultados se observan en la siguiente gráfica (Figura 28).

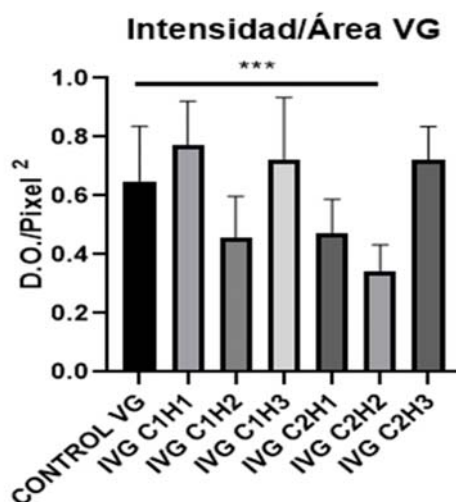


Figura 28. Gráfico de barras representativo de intensidad óptica de tinción VG para todas las matrices sintéticas compuestas de [0,05%] y [0,10%] GA, *** $p < 0,05$ de significancia.

7.2.3 Grosor Medio post tinciones histológicas

El grosor medio del control y para cada una de las matrices sintéticas en concentraciones de glutaraldehído [0,05 %] y [0,10 %] posterior a realizado el proceso de tinción con HE (Figura 29). Siendo los siguientes: Control 98 μm , C1H1 131 μm , C1H2, 60 μm , C1H3 91 μm , C2H1 88 μm , C2H2 83 μm y C2H3 116 μm . Se mostró que C1H2 tiene un cambio significativo $p < 0,05$.

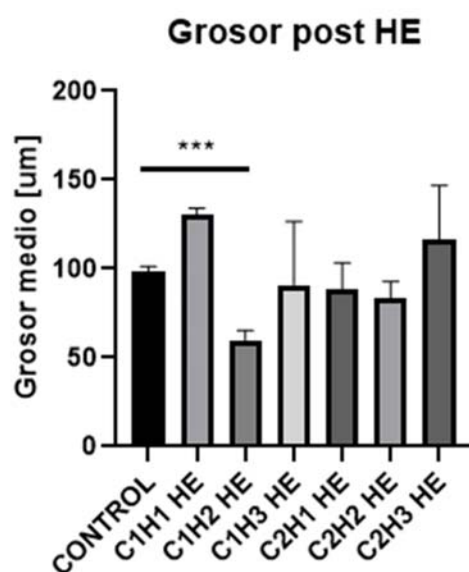


Figura 29. Gráfico de barras representativo de grosor medio posterior a tinción HE para todas las matrices sintéticas compuestas de [0,05%] y [0,10%] GA, *** $p < 0,05$ de significancia.

En el caso de la tinción VG los grosores medios para el control corresponde a 98 μm en las matrices sintéticas fueron los siguientes: C1H1 71 μm , C1H2 71 μm , C1H3 110 μm , C1H1 66 μm , C2H2 52 μm y C3H3 120 μm . Según los resultados se muestran cambios significativos en las matrices C2H1 y C2H2, $p < 0,05$ (Figura 30).

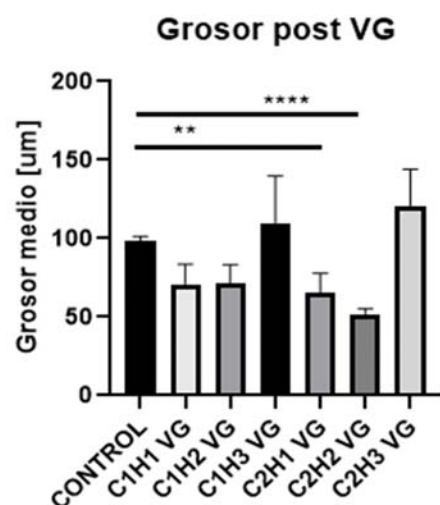


Figura 30. Gráfico de barras representativo de grosor medio posterior a tinción VG para todas las matrices sintéticas compuestas de [0,05%] y [0,10%] GA, **** $p < 0,05$ de significancia.

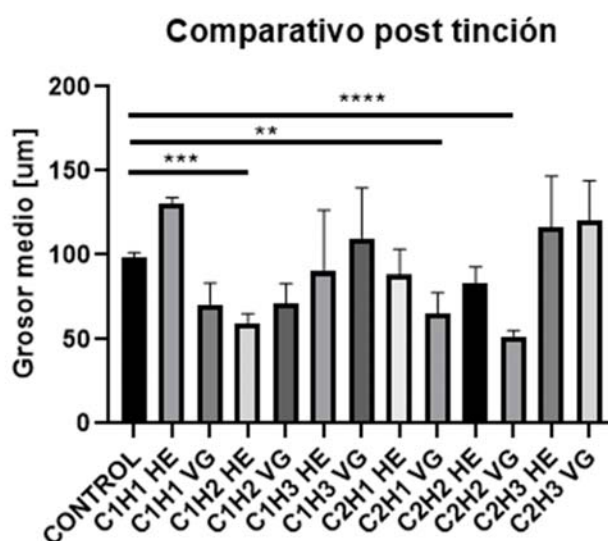


Figura 31. Gráfico de barras comparativo entre los resultados de grosor medio posterior a tinciones HE y VG G para todas las matrices sintéticas compuestas de [0,05%] y [0,10%] GA, **** $p < 0,05$ de significancia.

7.2.4 Cantidad de capas

La córnea (control) posee 5 capas en su estructura, los resultados luego de la aplicación de tinción HE en el caso de las matrices C1H1, C1H2, C1H3, C2H1, C2H2 todas registraron 3 capas y C2H3 registro 4 capas, todas presentando cambios con distinto nivel de significancia $p < 0,05$. En el caso de las matrices post tinción VG, C1H1, C1H2, C1H3, C2H1 y C2H2 registraron 3 capas y en el caso de C2H3 mostró 4 capas, todas presentan cambios significativos (Figura 32).

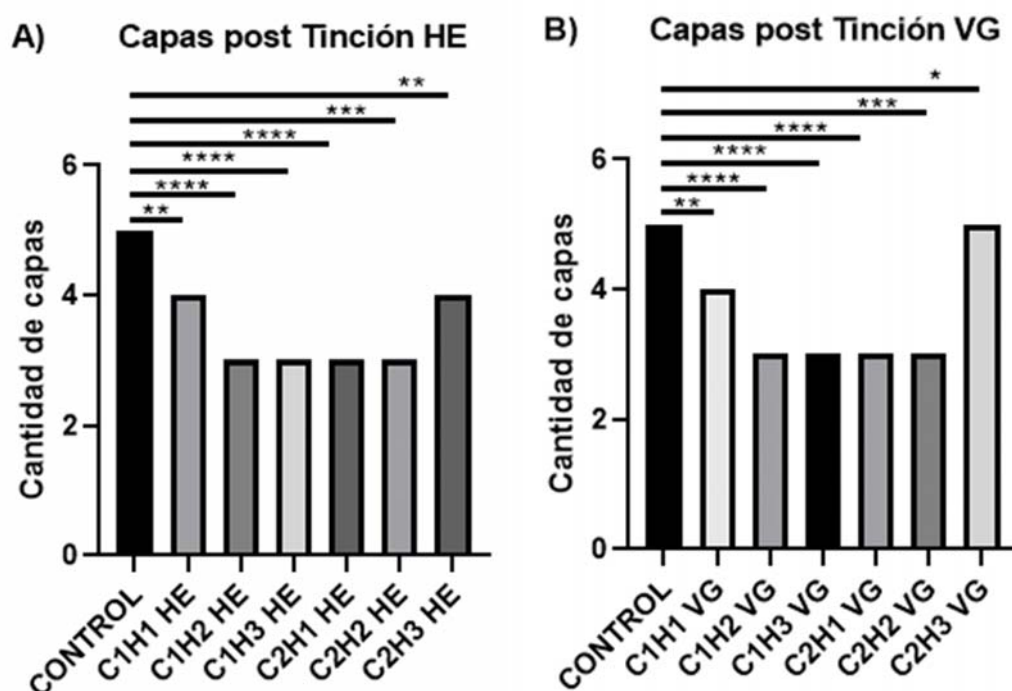


Figura 32. Gráfico de barras de cuantificación de capas posterior a tinción HE (A) y VG (B) para todas las matrices sintéticas compuestas de [0,05%] y [0,10%] GA, **** $p < 0,05$ de significancia.

7.3 Resultado objetivo específico N°3: Evaluación ultraestructural de matrices mediante microscopio electrónico de barrido.

Córnea Nativa (Control)

Las micrografías de la estructura corneal humana presentaron un patrón fibrilar regular con porosidades y espacios interfibrilares (Figura 33), se observó 3 capas en cada imagen debido a que es un remanente corneal de una córnea nativa.

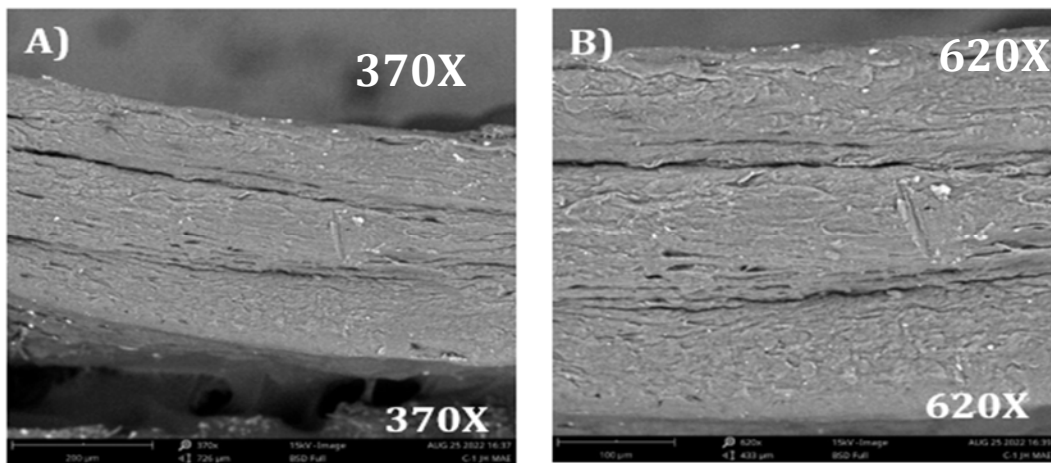


Figura 33. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de córnea nativa (remanente) se observa la disposición de capas en magnificaciones (370x y 620x). Barra escala presente en imágenes A) representa 200 μm y en imagen B) representa 100 μm.

Se obtuvieron imágenes de matrices artificiales en distintas concentraciones de GA, estas matrices son formulaciones iniciales que se utilizaron para crear las matrices evaluadas posteriormente en el estudio. En todas ellas se mostró una disposición de fibras paralelas, cantidad de capas desde 1 hasta 4 capas ([0,05 %, 0,10 % y 0,15 %] GA), algunas estructuras menos porosas ([0,15 % GA]), espacios interfibrilares mayores como en las matrices de concentración [0,15 % y 0,20 %] y en la matriz de concentración [0,30%] se observó una sola capa con alta porosidad (Figura 34).

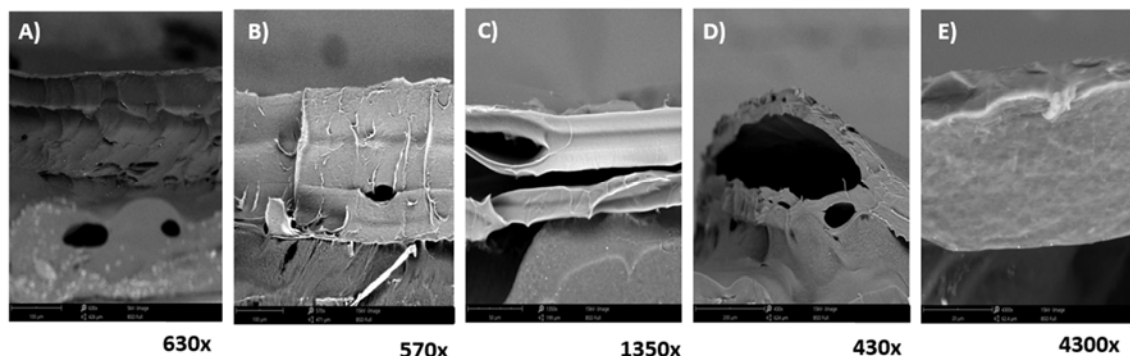


Figura 34. Micrografías estructurales de matrices sintéticas (5 láminas en estado seco) y laminar completo, cada una de las fabricaciones contiene distintas concentraciones de glutaraldehído. A) 0,05 %, B) 0,10 %, C) 0,15 %, D) 0,20 %, E) 0,30 % en distintas magnificaciones. Barra escala presente en imágenes A) y B) representan 100 µm, para imagen C) 50 µm, D) 200 µm y E) escala de 20 µm.

En las imágenes de matrices sintéticas compuestas en base a concentración C2 [0,10%] GA e hidratación H3 (Figura 35), se observó múltiples capas en cada una de ellas, con intensidad mayor en imágenes A y B, en todas se aprecia porosidad en cada una de las capas, existe espacio interfibrilar y al menos 3 capas en todas excepto en la imagen D.

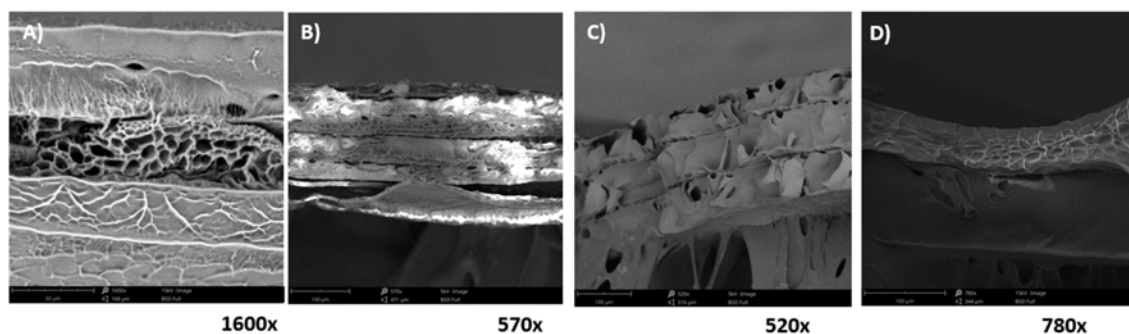


Figura 35. Microestructuras de matrices sintéticas multicapas, láminas en estado seco para cada una contiene [0,10%] GA en distintas magnificaciones. Barra escala presente en imágenes A) Matriz C2H3-I representa 50 µm, para imagen B) Matriz C2H3-II, C) Matriz C2H3-III y D) Matriz C2H3-IV representa barra escala de 100 µm.

7.3.1 Grosor Medio

Los resultados del grosor para todas las capas de matrices sintéticas iniciales en distintas concentraciones de GA incluyendo el control se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Valores de grosor medio para cada matriz sintética.

Matriz	Grosor medio (μm)
Control	98
A1 [0,05%] GA	44
B2 [0,10%] GA	78
C3 [0,15%] GA	26
D4 [0,20%] GA	31
E5 [0,30%] GA	45

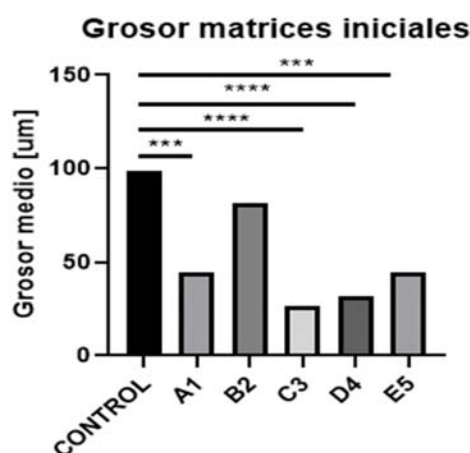


Figura 36. Gráfico representativo de los grosores medios del control y matrices sintéticas en distintas concentraciones de GA. En las matrices A1, C3, D4 y E5 existen cambios significativos **** $p < 0,05$.

Los resultados para el grosor total de las matrices sintéticas comparadas con el control (Figura 37), se consideraron 4 capas para cada una de las matrices. Las medianas para el control fue 424 μm , matriz A1 228 μm , matriz B2 503 μm , matriz C3 452 μm , matriz D4 487 μm y matriz E5 445 μm . Los resultados que presentaron cambios significativos son para la matriz B2 y D4.

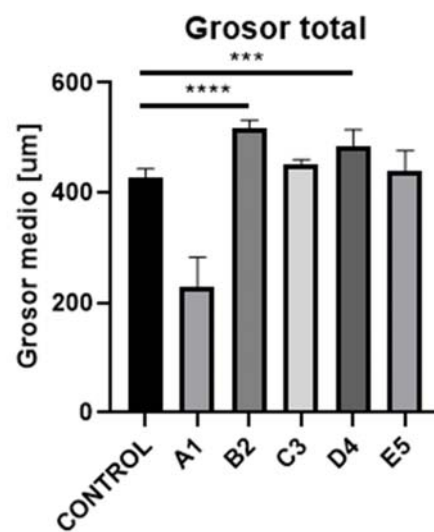


Figura 37. Gráfico de barras representativo del grosor total del control y matrices sintéticas en distintas concentraciones de GA. En las matrices B2 y D4 existen cambios significativos **** $p < 0,05$.

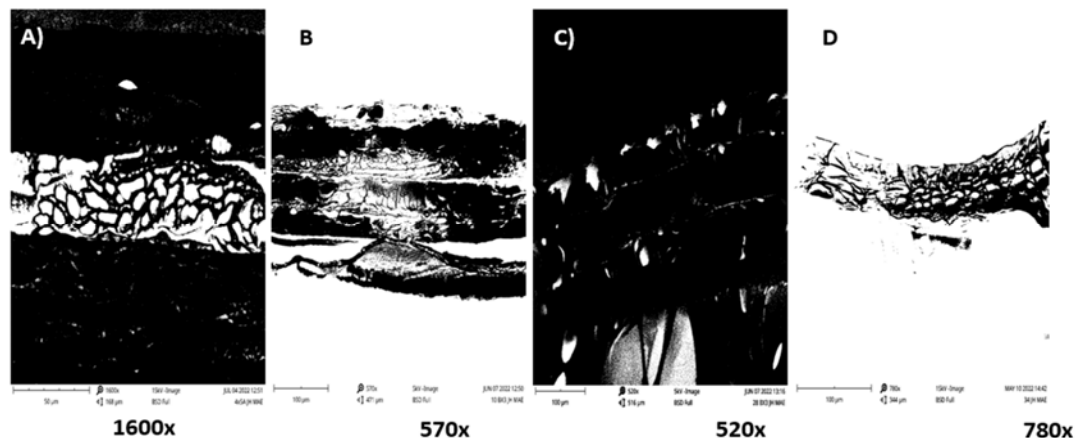


Figura 39. Microestructuras de matrices sintéticas multicapas, láminas en estado seco para cada una contiene [0,10%] GA en distintas magnificaciones. Barra escala presente en imágenes A) Matriz C2H3-I representa 50 µm, para imagen B) Matriz C2H3-II, C) Matriz C2H3-III y D) Matriz C2H3-IV representa barra escala 100 µm.

El resultado de los valores de las medianas del grupo control y cada una de las matrices en concentración [0,10%] GA. Para el grupo control se obtuvo una media correspondiente a 17 µm, matriz C2H3-I 25 µm, matriz C2H3-II 29 µm, matriz C2H3-III 211 µm y matriz C2H3-IV 17 µm, solo se presentó un cambio significativo en la matriz C2H3-III (Figura 40).

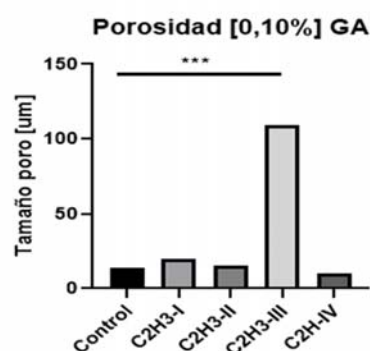


Figura 40. Gráfico de barras representa las medianas de los poros en el grupo control y las matrices sintéticas compuestas [0,10%] de GA, ***p<0,05 de significancia.

7.4 Resultado objetivo específico N°4: Evaluación ultraestructural de matrices mediante Tomografía de coherencia óptica.

En el análisis ultraestructural realizado mediante OCT se utilizó dos tipos de fantoma, uno de ellos similar a las curvaturas de la córnea nativa (Figura 41) y otro realizado mediante impresora 3D. Se comparó la disposición de capas de cada matriz sobre los moldes en condiciones seca e hidratada.

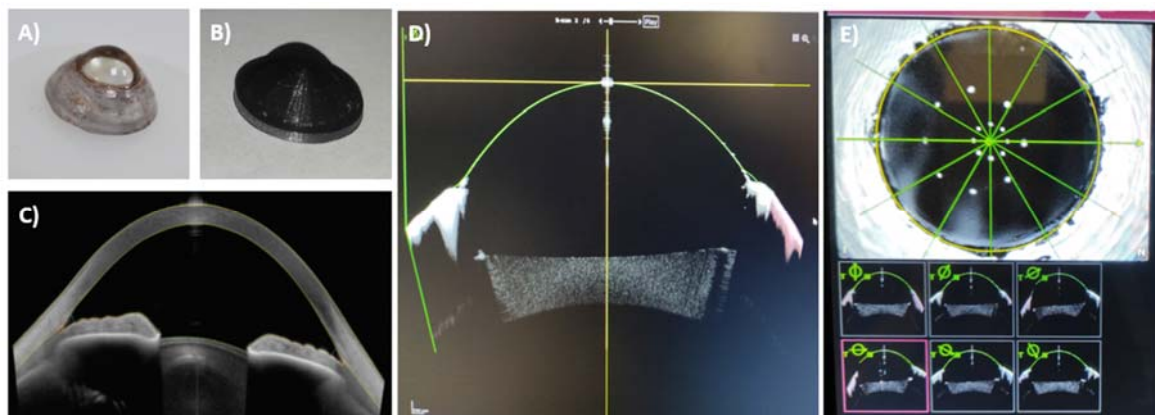


Figura 41. Imagen resumen de fantoma y tomografía óptica obtenida con OCT de polo anterior. A) Fantoma corneal B) Fantoma impresora 3D C) Tomografía corneal humana D) Tomografía corte transversal fantoma corneal E) Tomografía vista frontal de fantoma.

La disposición de las matrices sintéticas multilaminares (4 capas c/u), permitió apreciar que las capas de cada matriz se amoldan sin problema a la superficie de los moldes una vez dispuestos una sobre otra, tienden a caer por los costados haciendo el centro más delgado por la elasticidad de las matrices. Hay diferencias en la disposición de capas secas e hidratadas, las matrices en condiciones secas resultan más delgadas en toda su extensión a diferencia de las matrices hidratadas que mantienen su grosor en toda la extensión. Se observó que al estar secas adoptan la forma de la superficie en la que están apoyadas (Figura 42 y Figura 43).

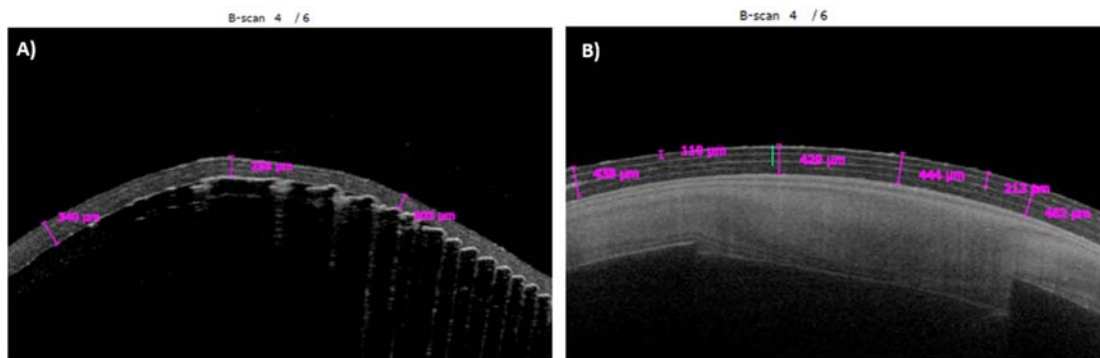


Figura 42. Tomografía corneal. A) Fantoma corneal 3D, se aprecia irregularidad de superficie B) Fantoma corneal, se aprecia superficie lisa en toda su extensión.

Cada una de las matrices presentó irregularidades en la superficie, debido a la estructura del fantoma realizado en impresora 3D; además, en todas las matrices se observó una leve delimitación entre las capas. En cambio, para las matrices hidratadas estas se dispusieron en el fantoma con curvaturas similares al control (Figura 44), obteniendo matrices con disposición regular en casi toda la extensión de la imagen, la delimitación entre cada capa se percibió de forma más clara que en la condición seca en todas las matrices sintéticas (Figura 43).

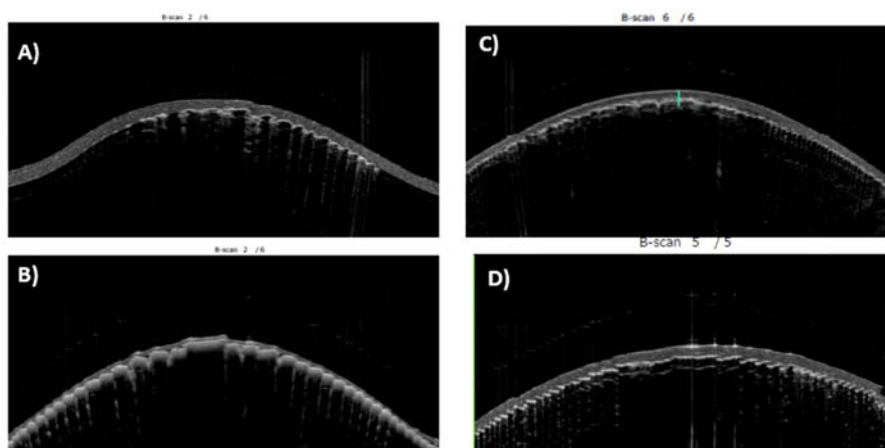


Figura 43. Tomografías matrices sintéticas en condición seca. A) Matriz C2H3-I B) Matriz C2H3-II C) Matriz C2H3-III D) Matriz C2H3-IV.

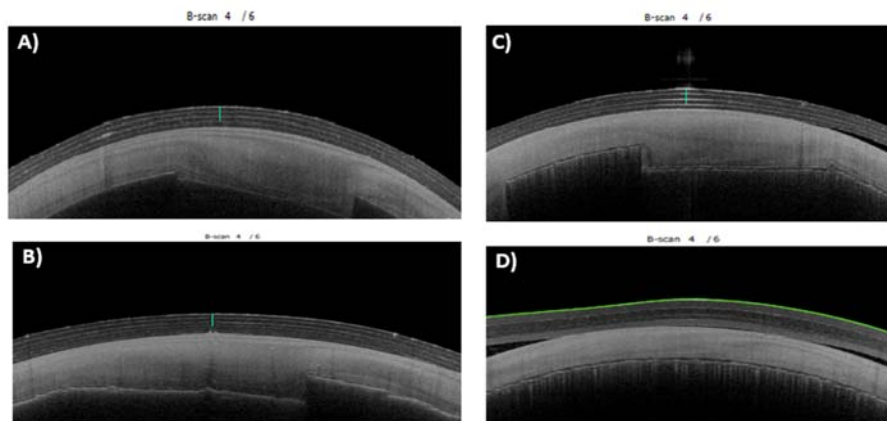


Figura 44. Tomografías matrices sintéticas en condición hidratada. A) Matriz C2H3-I B) Matriz C2H3-II C) Matriz C2H3-III D) Matriz C2H3-IV.

Los valores obtenidos del grosor de cada matriz se detallan en Tabla 6, se registró cada medición obtenida mediante el caliper del equipo (medición manual) y el valor paquimétrico (medición automática) que midió el equipo en cada condición evaluada (Figura 45).

Tabla 6. Valores de grosor central para cada matriz sintética.

Matriz	Matriz Seca (μm)	Matriz Hidratada (μm)	Paquimetría Seca (μm)	Paquimetría Hidratada (μm)
C2H3-I	256	429	332	no
C2H3-II	106	534	341	357
C2H3-III	332	494	no	378
C2H3-IV	220	797	320	324

Considerando que el grosor medio del control (córnea humana) está entre los 520 μm y 565 μm , el resultado más aproximado se encuentra en la condición hidratada siendo la matriz C2HE-II ya que el resto se encuentra por debajo de la media o por sobre la media.

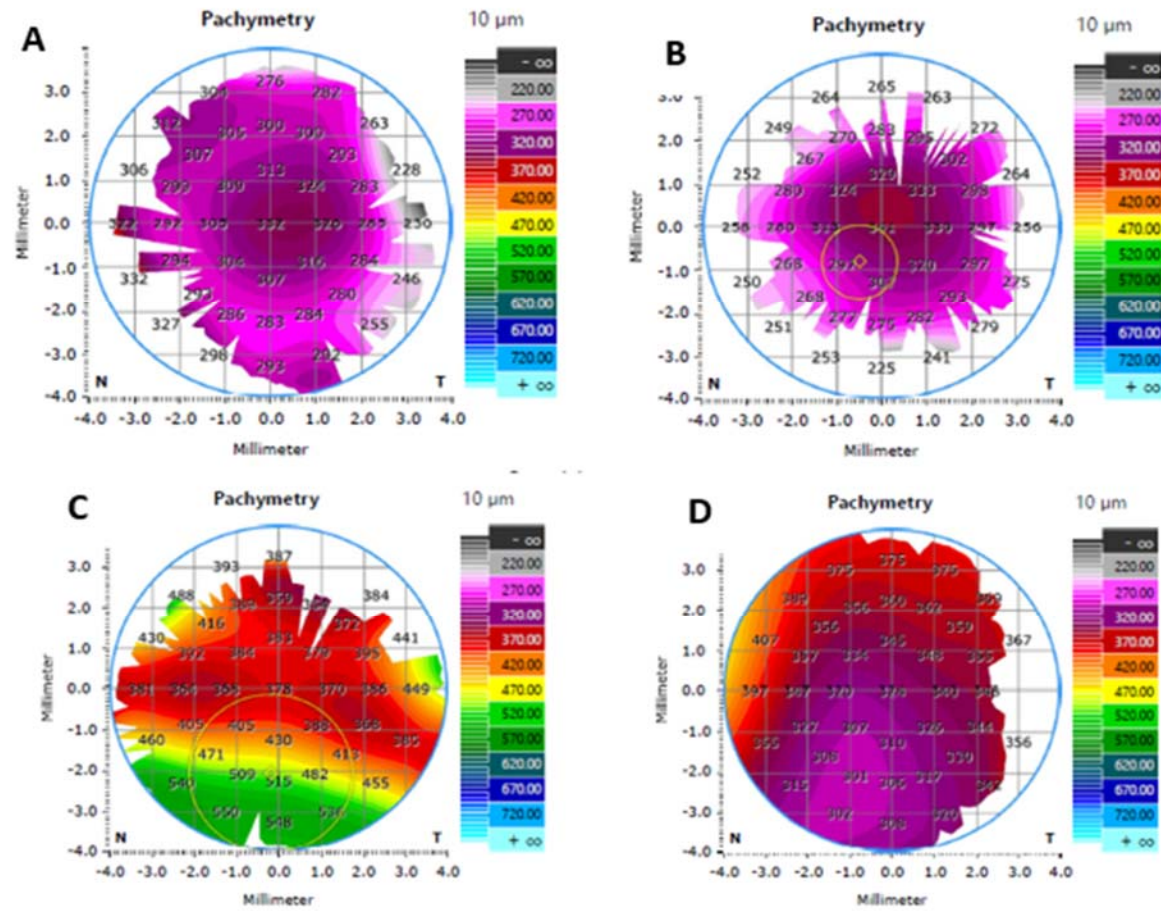


Figura 45. Mapas paquimétricos donde se aprecia topografía en distintas condiciones, se observa distribución de superficie de cada matriz. A) Matriz C2HE-I seca B) Matriz C2H3-II seca C) Matriz C2H3-III hidratada D) Matriz C2H3-IV hidratada.

7.5 Resultado objetivo específico N°5: Evaluar el sustituto corneal sintético *in vitro*.

Se evaluó la presencia de fibroblastos en las matrices multicapas en 3 tiempos distintos, al cabo de 24 h, 48 h y 72 h, en donde todos los fibroblastos porcinos sobrevivieron y proliferaron en las matrices (Figura 46).

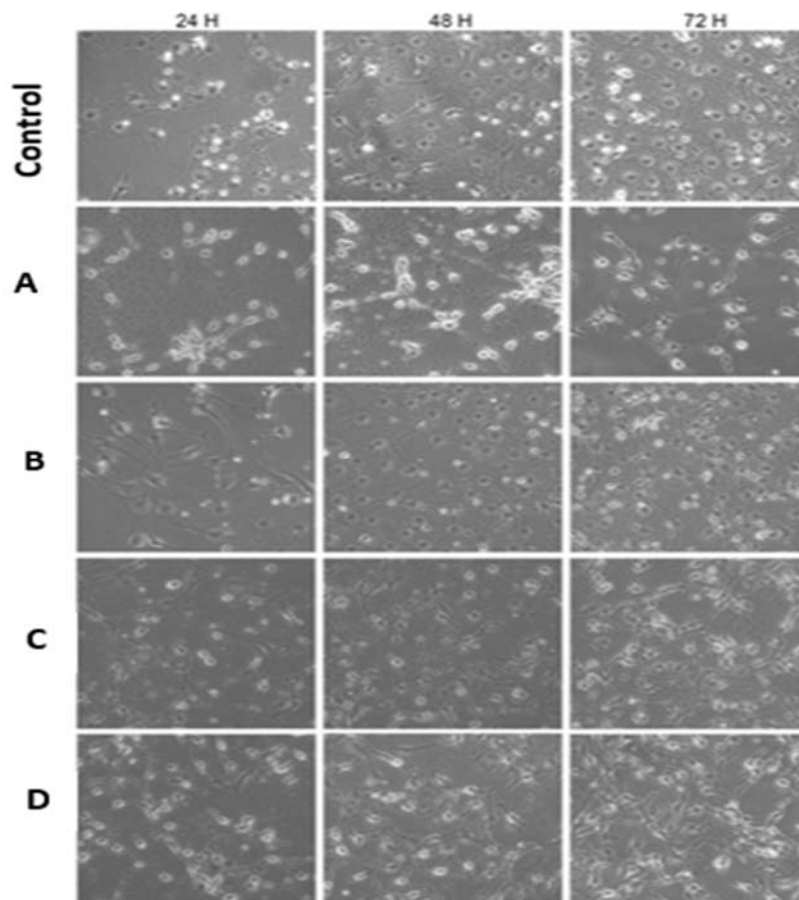


Figura 46. Microscopía de campo claro evidencia el resultado de evaluación *in vitro*. Matrices multicapas con fibroblastos porcinos a las 24 h, 48 h y 72 h. A) Matriz C2H3-I B) Matriz C2H3-II C) Matriz C2H3-III D) Matriz C2H3-IV.

Mediante tinción DAPI se realizó evaluación de viabilidad celular (Figura 47), en el caso

de la matriz C2H3-I (imagen A) se logró apreciar en todos los tiempos previos a 72 horas, luego no se logró evidenciar presencia de núcleos celulares en la imagen.

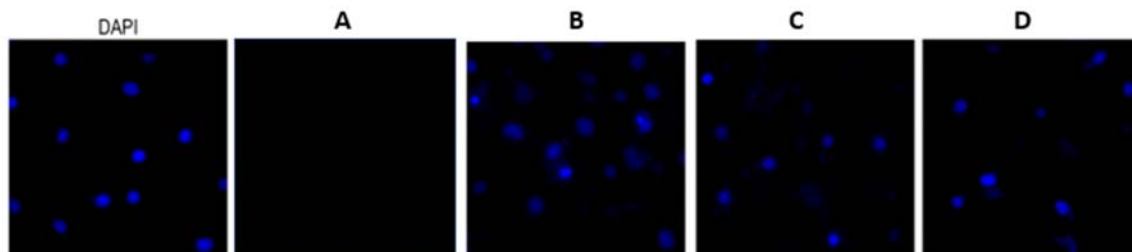


Figura 47. Micrografías de inmunofluorescencia de viabilidad celular luego de 72 horas de cultivo *in vitro* de matrices sintéticas en concentración [0,10%] de GA, A) Matriz C2H3-I B) Matriz C2H3-II C) Matriz C2H3-III D) Matriz C2H3-IV.

Respecto a la tasa de supervivencia posterior a las 72 horas no se pudo cuantificar la matriz C2H3-I y para las matrices C2H3-II, C2H3-III y C2H3-IV no hay cambios significativos respecto del control (Figura 48).

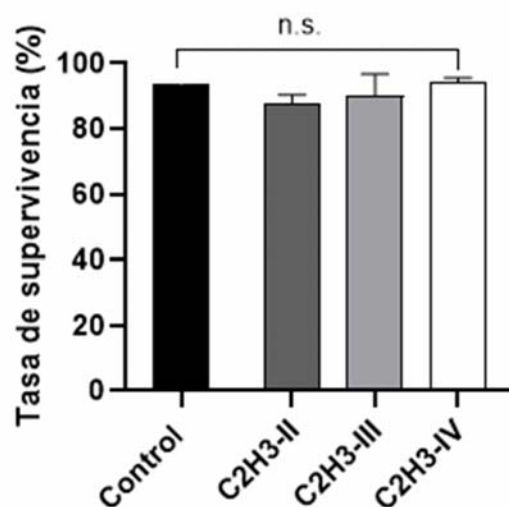


Figura 48. Gráfico de barras representativo de tasa de supervivencia celular en matrices sintéticas, no se obtiene cuantificación de matriz C2H3-I y no hay cambios significativos para matrices C2H3-II, C2H3-III Y C2H3-IV.

Los resultados del área de cobertura de las células a las 24 h, 48 h y 72 h (Figura 49), en la matriz C2H3-I se registra el menor porcentaje área de cobertura en todos los tiempos representando cambios significativos respecto al control. A las 48 h y 72 h la matriz C2H3-II no presenta cambios significativos y luego de las 72 horas aumenta el área de cobertura respecto de todas las otras matrices. Con respecto a las matrices C2H3-III y C2H3-IV presentan cambios significativos respecto al control en las 24 h y 72 h.

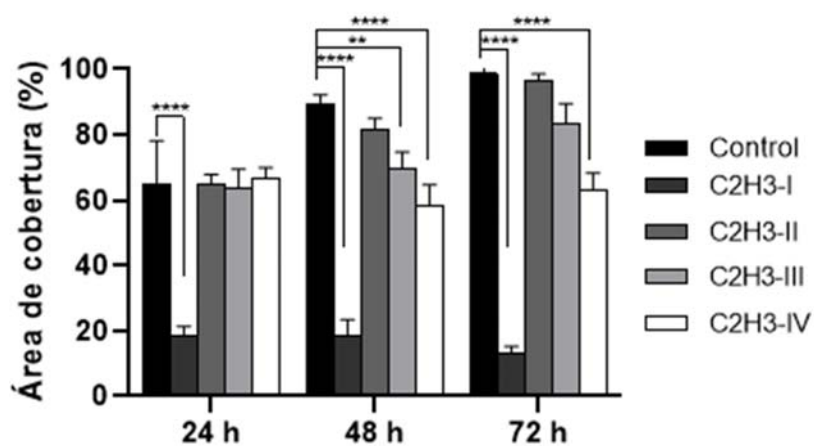


Figura 49. Gráfico de barras representativo de área de cobertura a las 24 h, 48 h y 72 horas luego del cultivo celular en matrices sintéticas *in vitro*. **** $p < 0,05$ significativo.

Al realizar el procesamiento histológico de las matrices sintéticas con tinción HE y utilizando el protocolo de inclusión con sucralosa al 30%, el cultivo de células fue ubicado en el centro de las matrices y entre las capas para cada una de las muestras. Se observó fibroblastos porcinos presentes en distintas profundidades de todas las matrices evaluadas esto se puede observar en las imágenes con microscopio óptico en aumento de 100x (Figura 50).

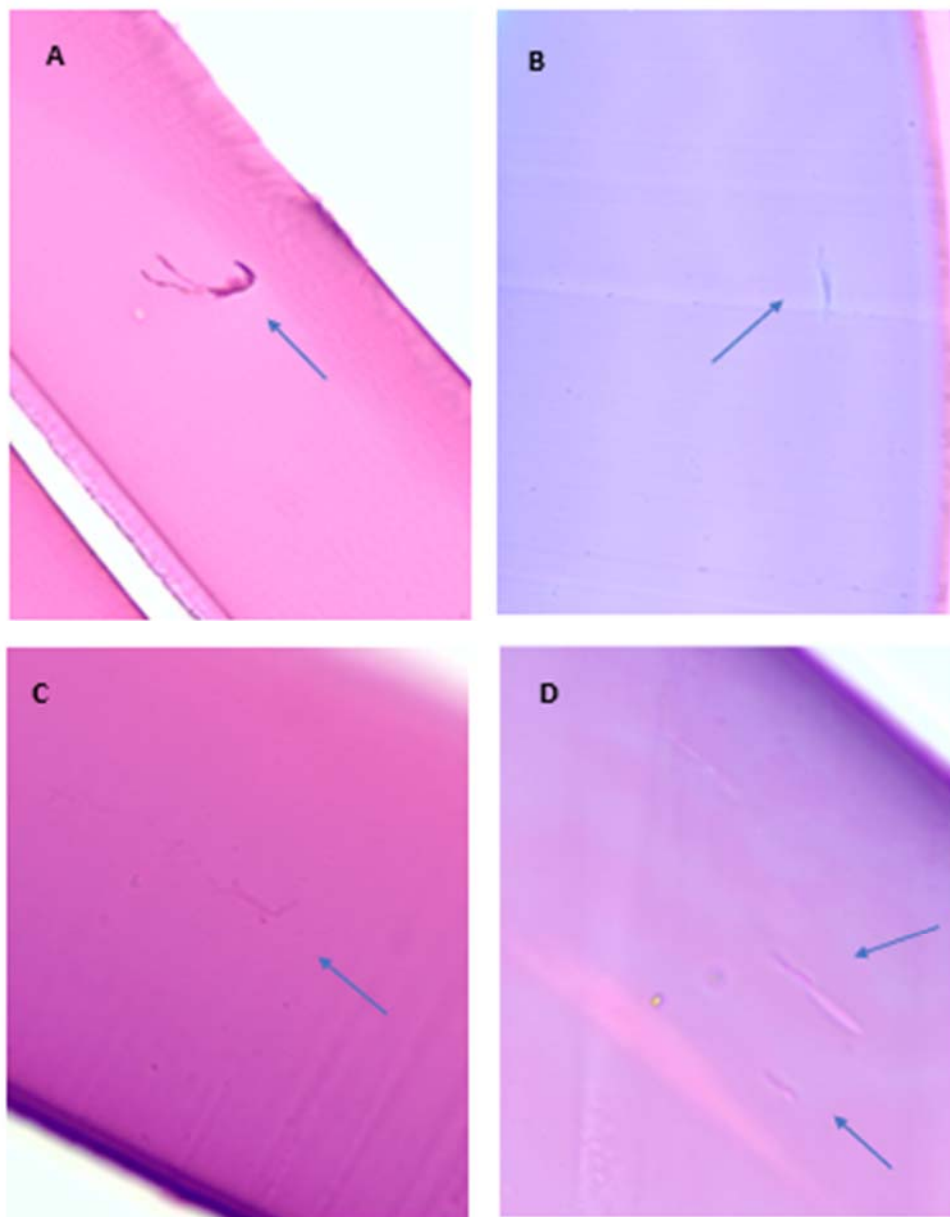


Figura 50. Cortes histológicos con tinción HE se observan algunos fibroblastos porcinos indicados con flechas en las distintas matrices con [0,10%] GA en aumento 100x. A) Matriz C2H3-I B) Matriz C2H3-II C) Matriz C2H3-III D) Matriz C2H3-IV.

8 DISCUSIÓN.

El diseño de una córnea mediante ingeniería tisular puede ser una alternativa para el reemplazo de una córnea dañada, considerando que los implantes sintéticos biomiméticos están logrando dar una respuesta ante la escasez de tejidos ya que son capaces de simular las propiedades ópticas, estructurales y biológicas para cumplir con las funciones del tejido nativo al cual van a reemplazar. ^{(52), (68)}

En este estudio se logró establecer un protocolo de inclusión para constructos sintéticos basados en hidrogeles. Se utilizó gelatina como principal biomaterial, este biopolímero posee una red tridimensional interconectada y puede contribuir a la generación de tejido conectivo similar a los tejidos nativos. ⁽⁵³⁾ Se utilizó una técnica de entrecruzamiento químico con glutaraldehído (GA) ⁽⁷¹⁾ capaz de proporcionar una mejora sustancial en las propiedades mecánicas de los hidrogeles. Según la literatura tanto la gelatina como el colágeno son utilizados para generar andamios debido a que mejoran la infiltración, adhesión y proliferación celular. ⁽⁵³⁾ La incorporación de un biopolímero natural tiene efectos benéficos respecto a las señales de reconocimiento biológico, por tanto, se espera que las células tengan la capacidad de migrar, los andamios presenten una mejor elasticidad y deformabilidad facilitando la formación de cavidades para la incorporación celular. ^{(54), (55)}

Estudios previos en distintos lugares del mundo han evaluado las propiedades que tienen las matrices multilaminares de hidrogel para regenerar el tejido corneal de manera in vitro ⁽²⁸⁾ e in vivo ⁽⁴¹⁾ en conejos, no obstante, en Chile estamos alejados de esta realidad ya que no hay un protocolo para la fabricación de sustitutos corneales sintéticos, tampoco se han realizado estudios de caracterización morfológica en hidrogeles como posible reemplazo corneal.

El protocolo que se utilizó para la inclusión de hidrogeles fue determinante para la realización del proceso histológico posterior de matrices sintéticas multilaminares, estuvo basado, pero con modificaciones, en la metodología habitual de procesamiento

para inclusión de tejidos acuosos en parafina. Algunas de las diferencias que se establecieron fue la reducción en los tiempos de hidratación e inclusión de las muestras, además de la incorporación de sucralosa al 30% en el proceso de hidratación inicial. La incorporación de sucralosa genera cambios en la red estructural del hidrogel logrando una red más densa ya que, potencia el efecto del agente entrecruzante utilizado, aumentando la capacidad de absorción de agua de las matrices.⁽⁷⁰⁾ El protocolo propuesto en este estudio permitió la inclusión de hidrogeles compuestos de quitosano, gelatina, polilisina y glutaraldehído (GA) en parafina y el procesamiento histológico con dos técnicas de tinción de rutina; Hematoxilina eosina (HE) y Van Gieson (VG), en ambos protocolos fue necesario realizar modificaciones en los tiempos.

La evaluación histológica permitió medir la intensidad de tinción de las matrices con técnica HE y VG, obteniendo cambios significativos en matrices C1H2 Y C1H3 para HE y C2H2 en VG. Para ambas tinciones se pudo observar distintas intensidades de tinción, áreas más claras asociadas a una mayor porosidad entre las capas del hidrogel o menor presencia de matriz, zonas más oscurecidas en donde el tejido sintético logró mayor captación de tinción. En un estudio se creó un protocolo para la fabricación de un hidrogel en base a piel porcina acelular⁽⁵⁶⁾, el procesamiento histológico fue similar al utilizado en este estudio, las muestras fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 24 horas, en nuestro caso se utilizó paraformaldehído solo durante 12 horas. Respecto a la tinción, las matrices se sumergieron el mismo tiempo en el caso de la hematoxilina, pero se requirió menor tiempo para la eosina en nuestro protocolo, el etanol y xileno, mientras que para realizar los lavados se utilizaron las mismas concentraciones.

En otro estudio de andamios biomiméticos para soporte de cartílago e interfaz osteocondral⁽⁵⁷⁾, se utilizó en el protocolo fijación paraformaldehído al 3,7% parecido a nuestro protocolo, pero solo durante 3 horas. El proceso de baño de estirado se realizó de la misma manera, utilizando un baño de estirado a 40° C. Previamente las muestras se mantuvieron en estufa toda la noche a 37°C, distinto a lo que se realizó en este estudio, nuestras muestras se mantuvieron durante una hora en la estufa a 60° C.

La realización del procesamiento histológico con la técnica HE se pudo llevar a cabo sin mayores complicaciones, basándose en el protocolo establecido en el caso de la técnica VG. Las matrices se perdieron constantemente en el proceso de deshidratación, a pesar de ocupar portaobjetos con doble capa de Poli-L-lisina, tanto para matrices en concentración 0,05% y 0,10% GA. Una diferencia entre ambos protocolos de tinción es el tiempo utilizado en las tinciones, para VG se aplica durante más tiempo la tinción VG (30 minutos). Esto puede provocar cambios estructurales en la matriz, debido a que los grupos ácidos de la hematoxilina se unirán a los grupos aminos de la gelatina y del quitosano, pudiendo generar desestabilización de la estructura, conllevando a la pérdida de las matrices y la dificultad para lograr evaluar la estructura a nivel macroscópico.

Los resultados de la evaluación macroscópica de hidrogeles a través de microscopía óptica, mostraron la conservación de los hidrogeles (mayormente en la tinción HE), presencia de estructuras fibrilares paralelas con distintas densidades y espacios interfibrilares entre sus láminas, además de mantener al menos 3 capas en todas las matrices tanto para tinción HE como VG.

En la literatura sobre reticulación con glutaraldehído se evaluó la disposición fibrilar de hidrogeles de gelatina según distintas concentraciones de este reticulador (GA).^{(58) (69)} Se compararon los resultados de 3 concentraciones de GA (2,5%, 5,0% y 8,0%) en las muestras reticuladas al 2,5% y 5%, observándose una disposición fibrilar paralela y una porosidad de menor tamaño y en mayor cantidad. En cambio, para los hidrogeles reticulados al 8%, se pudo observar un patrón poroso mayor e heterogéneo, en el cual no se logra apreciar definidamente las fibras del hidrogel. Comparado con nuestros resultados, se utilizaron concentraciones de GA al 0,05% y 0,10%, para ambos casos, la caracterización microscópica evidencia estructuras fibrilares paralelas, tanto para HE como VG. A través de microscopía electrónica de barrido, se evaluó la porosidad de hidrogeles, en donde se aprecia porosidad en todas las matrices, con diferentes tamaños y distribución. No hay un patrón ordenado de poros, nuestros resultados son similares a la concentración 2,5% GA referidos en el estudio anterior, el cual mostró una alta porosidad con tamaños pequeños.

Es importante considerar que la reticulación con GA de hidrogeles puede afectar la biocompatibilidad, un estudio evaluó la citocompatibilidad de un hidrogel de gelatina reticulada con GA y encontró que en concentraciones mayores al 8% inhibe el crecimiento celular. ⁽⁵³⁾ En nuestra investigación se utilizaron concentraciones menores a 8% GA, específicamente 0,05% y 0,10% GA, donde los resultados de viabilidad mostraron supervivencia de fibroblastos porcinos durante al menos 72 horas en hidrogeles al 0,10%. En un futuro se podría evaluar qué concentración máxima de GA es la idónea para mantener las propiedades de los hidrogeles sin generar citotoxicidad, tanto para las células como para el receptor del sustituto corneal.

La evaluación morfológica mediante microscopía electrónica de barrido requiere de un proceso de preparación de los hidrogeles, esta contempla un paso de liofilización, en el cual se elimina la humedad de las muestras, obteniendo la masa seca y esponjosa de los hidrogeles, manteniendo la estructura tridimensional. Los resultados de la ultraestructura mostraron capas irregulares con espacios entre ellas, se perdieron láminas de los hidrogeles en algunas de las muestras durante la obtención de imágenes. Las mediciones del grosor de cada capa que conforma los hidrogeles y la porosidad tanto del control (córnea nativa) como de las matrices multilaminares, son similares a las reportadas en un estudio de hidrogeles de quitosano. ⁽⁵⁹⁾ En los soportes de ingeniería de tejidos los poros deben presentar un tamaño mayor a 10 μm para que ocurra migración celular adecuada y no interferir en la difusión de nutrientes, hormonas o metabolitos en el interior de la matriz. ⁽⁶⁰⁾ En los andamios de hidrogel un aspecto importante para la proliferación celular es la porosidad, las estructuras generadas mediante ingeniería tisular deben considerar una red interconectada que fomente el crecimiento celular, la distribución uniforme y que sea capaz de ayudar a la neovascularización del tejido. ⁽⁶¹⁾ Además, existen parámetros como el tamaño, volumen y forma de los poros para cumplir con la transferencia de nutrientes y oxígeno. El tamaño de los poros está descrito según la función que cumplirá el tejido, la porosidad óptima para permitir la penetración celular es de 0,8 μm a 8 μm , para neovascularización es de 5 μm , para el crecimiento de hepatocitos es de 20 μm , en el caso de fibroblastos es de 5 μm a 15 μm al igual que en el tejido corneal. ⁽⁶²⁾ Respecto a los resultados de porosidad la media obtenida para el grupo control fue de 17 μm solo un grupo presentó un cambio

significativo siendo la matriz C2H3-II, el resto presentaron valores similares al control y los de una córnea nativa. La importancia de poder controlar la porosidad en los andamios de hidrogel también se relaciona con las propiedades ópticas (dispersión de la luz) ya que, si se aumenta la porosidad permitirá mayor permeabilidad en el tejido, crecimiento celular no deseado y, por lo tanto, una disminución de la transparencia del hidrogel. ⁽⁶⁰⁾

La evaluación mediante tomografía de coherencia óptica nos entregó imágenes de los hidrogeles en dos condiciones (secas e hidratadas), donde se pudo observar que para ambas condiciones las 4 capas utilizadas se acoplan al fantoma corneal utilizado. En el caso de los hidrogeles secos, tomaron la disposición del relieve del fantoma en el cual no se logró distinguir la separación entre cada capa. En el caso de los hidrogeles hidratados, estos mantienen una curvatura homogénea en el centro sobre el fantoma utilizado, además se puede determinar en toda su extensión la separación entre las capas. Se midió el grosor medio de cada uno de los hidrogeles, en el caso de las matrices en estado seco, fue más delgado alcanzando un valor de 228,5 μm correspondiente a la matriz C2H3-I, y en las matrices hidratadas el grosor medio fue de 563,4 μm . Este último valor se asemeja al control nativo. Cabe destacar que los hidrogeles del estudio solo poseen 4 capas y en el caso de la córnea humana tiene 5 capas. Al obtener un valor menor al grosor corneal control, esta matriz no logrará cumplir con las propiedades mecánicas que el tejido requiere, ya que será inestable ante las presiones intra y extra oculares, las córneas en personas que reportan grosores menores a 300 μm corren riesgo de perforación corneal ⁽⁶³⁾. Por lo tanto, no cumpliría con las condiciones biomiméticas para ser un sustituto corneal.

En un ensayo clínico se evaluó la regeneración corneal con implantes libres de células, que contenían colágeno recombinante humano reticulado con carbodiimida, luego de 4 años posteriores a la implantación, se controló el grosor de las neocórneas utilizando OCT. Los resultados muestran que la forma, grosor y áreas de los bordes permanecieron constantes hasta 4 años postoperados. El grosor corneal obtenido a los 4 años fue de 358 μm , siendo más delgado que un implante corneal humano que alcanzó un grosor de 576 μm . ⁽⁶⁴⁾ Nuestros resultados se acercan a los grosores de una córnea nativa.

En los mapas paquimétricos de cada una de las matrices, se observó irregularidad de la superficie, asociándose a la disposición de las capas utilizadas ya que solo se unen en el centro, hacia la periferia de los fantasmas no se logró acoplar las membranas de manera homogénea, quedando capas levantadas. Esta la causa de los patrones irregulares en los mapas colorimétricos obtenidos con OCT de polo anterior.

En las investigaciones de ingeniería de tejidos, los hidrogeles son un biomaterial ideal para permitir que las células crezcan se diferencien en el espacio 3D y formen tejidos funcionales deseados. ⁽⁶⁵⁾ En el análisis de biocompatibilidad realizado en los hidrogeles con GA al 0,10% se utilizó fibroblastos porcinos, en los hidrogeles es importante el grado de entrecruzamiento debido a que esto influye en la compactación de la estructura, a mayor concentración de GA, menor capacidad de hinchamiento presentarán los hidrogeles, generando poros más pequeños e influyendo en la capacidad de propagación celular de los andamios. ⁽⁶⁶⁾ En nuestro caso, la evaluación de viabilidad celular se realizó incorporando fibroblastos porcinos a los hidrogeles. La proliferación celular se evaluó mediante microscopía de campo claro, las imágenes mostradas confirmaron que las células colonizaron y lograron adherirse con éxito a la matriz polimérica, donde estas proliferaron con el tiempo logrando cubrir mayor áreas del hidrogel hasta 72 horas de implantadas, sólo la matriz C2H3-I evidenció un cambio significativo desde las 24 horas hasta las 72 horas de implantación. Además, los hidrogeles se tiñeron con tinción DAPI para monitorizar la proliferación celular posterior a las 72 horas del cultivo, en el caso de la matriz C2H3-I no se alcanzó a evidenciar este marcaje, sin embargo, esto no quiere decir que no existió proliferación en las horas previas, ya que si se logró cuantificar previamente.

En un estudio se evaluó un hidrogel fabricado en base a colágeno porcino que posteriormente fue implantado en córneas de conejo, luego de 6 meses se observó en el tejido sintético proliferación celular, teniendo una viabilidad del 83%. Nuestra tasa de supervivencia en los 4 hidrogeles es superior al 89% y no hay diferencias significativas en este aspecto. ⁽⁶⁷⁾

9 CONCLUSIONES

- 1-** Los hidrogeles multilaminares basados en gelatina, quitosano, poli-Lisina y glutaraldehído son posibles de procesar mediante técnicas morfológicas, sin embargo, se debe realizar una adaptación de los protocolos convencionales.
- 2-** Las evaluaciones ultraestructurales de hidrogeles multilaminares mostraron que las matrices adoptan una disposición fibrilar, grosor y porosidad similar a una córnea nativa.
- 3-** El ensayo in vitro evidenció que los hidrogeles multilaminares permiten la proliferación y sobrevivencia de fibroblastos cultivados en su interior.

Nuestros resultados permiten comprobar que los hidrogeles multilaminares con los componentes y concentraciones estudiadas son una alternativa en la creación de sustitutos corneales biomiméticos.

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la visión. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020 [citado 17 de febrero de 2023].
2. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian J Ophthalmol. febrero de 2018;66(2):190-4.
3. Perea J. Estrabismo. Anatomía Ocular. [citado 17 de enero de 2023] (1): 36-38.
4. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Progress in Retinal and Eye Research. 1 de noviembre de 2015; 49:1-16.
5. Hassell JR, Birk DE. The molecular basis of corneal transparency. Experimental Eye Research. 1 de septiembre de 2010;91(3):326-35.
6. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J. Regeneration of the ocular Surface: stem cells and reconstructive techniques. Anales del Sistema Sanitario de Navarra. abril de 2008;31(1):53-69.
7. Torres RM, Merayo-Llodes J, Jaramillo MA, Galvis V. Biomecánica de la córnea. Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología. abril de 2005;80(4):215-23.
8. Afanador AMM, Urrea-Victoria T. Revisión de Queratocono y su Enfoque como Enfermedad Inflamatoria. Revista Sociedad Colombiana de Oftalmología; Vol. 48 Núm. 3 (2015)
9. Nosrati H, Ashrafi-Dehkordi K, Alizadeh Z, Sanami S, Banitalebi-Dehkordi M. Biopolymer-based scaffolds for corneal stromal regeneration: A review. Polim Med. 13 de noviembre de 2020;50(2):57-64.
10. Meek KM, Knupp C. Corneal structure and transparency. Progress in Retinal and Eye Research. 1 de noviembre de 2015; 49:1-16.

11. Meek KM, Leonard DW, Connon CJ, Dennis S, Khan S. Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. *Eye*. noviembre de 2003;17(8):927-36.
12. Garnacho Saucedo GM, Salido Vallejo R, Moreno Giménez JC. Efectos de la radiación solar y actualización en fotoprotección. *Anales de Pediatría*. 1 de junio de 2020;92(6): 377.e1-377.e9.
13. Wise S, Diaz C, Termote K, Dubord PJ, McCarthy M, Yeung SN. Corneal Cross-Linking in Pediatric Patients With Progressive Keratoconus. *Cornea*. noviembre de 2016;35(11):1441-3.
14. López González M, Rodríguez de la Paz U, López Hernández SM, Lapidó Polanco S, Baldoquin Rodríguez W. Características clínicas de la distrofia corneal endotelial de Fuchs. *Revista Cubana de Oftalmología*. diciembre de 2014;27(4):0-0.
15. Yang T, Mokey Castellanos MO, Álvarez Rivero MB, Yang T, Mokey Castellanos MO, Álvarez Rivero MB. Actualización terapéutica de la queratopatía bullosa pseudoafáquica. *Revista Cubana de Oftalmología [Internet]*. marzo de 2020 [citado 13 de junio de 2021];33(1).
16. Sanz-Marco E, García Delpech S, López-Prats MJ, Díaz-Llopis M. El cross-linking: un nuevo abordaje de la queratopatía bullosa. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. diciembre de 2011;86(12):419-20.
17. Austin A, Lietman T, Rose-Nussbaumer J. Update on the Management of Infectious Keratitis. *Ophthalmology*. noviembre de 2017;124(11):1678-89.
18. Cano FM, Redondo YA. Leucoma corneal lineal paracentral inferior por traumatismo corneal. *Caso Clínico*. 2021.
19. Gallo Borrero DE, Letfor Allen S, Gallo Borrero DE, Letfor Allen S. El trauma ocular en la infancia. *Revista Cubana de Oftalmología [Internet]*. septiembre de 2019 [citado 16 de marzo de 2022];32(3).

20. Ahmad S, Mathews PM, Lindsley K, Alkharashi M, Hwang FS, Ng SM, et al. Boston Type 1 Keratoprosthesis versus Repeat Donor Keratoplasty for Corneal Graft Failure: A Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology*. enero de 2016;123(1):165-77.
21. Abad JC, Jaramillo MC, Jaramillo JE, Cuevas M, Sanchez JG, Villada OA. Desenlaces en pacientes operados con queratoprótesis boston tipo 1 en un centro oftalmológico especializado en la ciudad de Medellín. 2018;51.
22. Garralda A, Epelde A, Iturralde O, Compains E, Maison C, Altarriba M, et al. Trasplante de córnea. *Anales Sis San Navarra [Internet]*. agosto de 2006 [citado 10 de marzo de 2022];29.
23. Hawa-Montiel H. Trasplante de córnea: Criterio clínico quirúrgico. *Revista de investigación clínica*. abril de 2005;57(2):358-67.
24. Carmona R, Carriel V, Ghinea R, González-Andrades E, González-Andrades M, Ionescu AM. Generación y caracterización de un modelo lesional corneal ex vivo para su uso en ingeniería tisular. *Actualidad Médica [Internet]*. [citado 9 de noviembre de 2022];(797).
25. Ludwig PE, Huff TJ, Zuniga JM. The potential role of bioengineering and three-dimensional printing in curing global corneal blindness. *J Tissue Eng*. diciembre de 2018;9:2041731418769863.
26. Dong Q, Wu D, Li M, Dong W. Polysaccharides, As Biological Macromolecule-based Scaffolding Biomaterials in Cornea Tissue Engineering: A Review. *Tissue and Cell*. 9 de marzo de 2022;101782.
27. Chen H, Zeng Y, Liu W, Zhao S, Wu J, Du Y. Multifaceted applications of nanomaterials in cell engineering and therapy. *Biotechnol Adv*. octubre de 2013;31(5):638-53.
28. Shah A, Brugnano J, Sun S, Vase A, Orwin E. The Development of a Tissue-

- Engineered Cornea: Biomaterials and Culture Methods. *Pediatr Res.* mayo de 2008;63(5):535-44.
29. Ramirez A, Benítez JL, Rojas de Astudillo L, Rojas de Gáscue B. Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales.* diciembre de 2016;36(2):108-30.
 30. Chen Z, You J, Liu X, Cooper S, Hodge C, Sutton G, et al. Biomaterials for corneal bioengineering. *Biomed Mater.* 6 de marzo de 2018;13(3):032002.
 31. Vasco SR, Isaza CAV, Suaza MLM, Giraldo JZ, Acevedo MEM. Ingeniería de tejidos y aplicaciones. Instituto Tecnológico Metropolitano; 2016. 377 p.
 32. Molfino HMG, Alcalde-Yañez A, Valverde-Morón V, Villanueva-Salvatierra D, Molfino HMG, Alcalde-Yañez A, et al. Electrospinning: Avances y aplicaciones en el campo de la biomedicina. *Revista de la Facultad de Medicina Humana.* octubre de 2020;20(4):706-13.
 33. Liu L, Wen H, Rao Z, Zhu C, Liu M, Min L, et al. Preparation and characterization of chitosan - collagen peptide / oxidized konjac glucomannan hydrogel. *Int J Biol Macromol.* marzo de 2018;108:376-82.
 34. Hurtado A, Selgas R, Serrano-Aroca Á. El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales. *Nereis Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.* 17 de julio de 2020;12:137.
 35. Ludwig PE, Huff TJ, Zuniga JM. The potential role of bioengineering and three-dimensional printing in curing global corneal blindness. *J Tissue Eng.* 13 de abril de 2018;9:2041731418769863.
 36. Calixto S, Ganzherli N, Gulyaev S, Figueroa-Gerstenmaier S. Gelatin as a Photosensitive Material. *Molecules.* 17 de agosto de 2018;23(8):2064.

37. Sharifi S, Islam MM, Sharifi H, Islam R, Koza D, Reyes-Ortega F, et al. Tuning gelatin-based hydrogel towards bioadhesive ocular tissue engineering applications. *Bioact Mater.* 17 de abril de 2021;6(11):3947-61.
38. Borri C, Centi S, Ratto F, Pini R. Polylysine as a functional biopolymer to couple gold nanorods to tumor-tropic cells. *J Nanobiotechnology.* 31 de mayo de 2018;16:50.
39. Albaladejo-García V, Campos F, Carriel V, Chato-Astrain J, Diaz-Ramos M, Durand-Herrera D, et al. Hidrogeles de gelatina entrecruzados para aplicaciones en Ingeniería Tisular. Un estudio preliminar. *Actualidad Médica [Internet]*. [citado 2 de marzo de 2023];(803).
40. Zhang B, Xue Q, Li J, Ma L, Yao Y, Ye H, et al. 3D bioprinting for artificial cornea: Challenges and perspectives. *Medical Engineering & Physics.* 1 de septiembre de 2019;71:68-78.
41. Shah A, Brugnano J, Sun S, Vase A, Orwin E. The Development of a Tissue-Engineered Cornea: Biomaterials and Culture Methods. *Pediatr Res.* mayo de 2008;63(5):535-44.
42. Fagerholm P, Lagali NS, Merrett K, Jackson WB, Munger R, Liu Y, et al. A Biosynthetic Alternative to Human Donor Tissue for Inducing Corneal Regeneration: 24-Month Follow-Up of a Phase 1 Clinical Study. *Science Translational Medicine.* 25 de agosto de 2010;2(46):46ra61-46ra61.
43. Stulting RD, Sugar A, Beck R, Belin M, Dontchev M, Feder RS, et al. Effect of Donor and Recipient Factors on Corneal Graft Rejection. *Cornea.* octubre de 2012;31(10):1141-7.
44. Ramirez A, Benítez JL, Rojas de Astudillo L, Rojas de Gáscue B. Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales.* diciembre de 2016;36(2):108-30.

45. Sharma N, Nathawat R, Parihar J. Policy framework for advancing eye banking and cornea transplantation. *Indian J Ophthalmol.* octubre de 2021;69(10):2563-4.
46. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la visión [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2020 [citado 17 de febrero de 2023].
47. Carmona R, Carriel V, Ghinea R, González-Andrades E, González-Andrades M, Ionescu AM. Generación y caracterización de un modelo lesional corneal ex vivo para su uso en ingeniería tisular. *Actualidad Médica* [Internet]. [citado 20 de marzo de 2022];(797).
48. Swaminathan SS, Monsalve P, Zhou XY, Enriquez-Algeciras M, Bhattacharya SK, Dubovy SR, et al. Histologic Analysis of Trabecular Meshwork Obtained From Kahook Dual Blade Goniotomy. *American Journal of Ophthalmology.* 1 de agosto de 2018;192:198-205.
49. Ramirez A, Benítez JL, Rojas de Astudillo L, Rojas de Gáscue B. Materiales polimeros de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales.* diciembre de 2016;36(2):108-30.
50. Ang M, Baskaran M, Werkmeister RM, Chua J, Schmidl D, Aranha dos Santos V, et al. Anterior segment optical coherence tomography. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1 de septiembre de 2018;66:132-56.
51. Ang M, Baskaran M, Werkmeister RM, Chua J, Schmidl D, Aranha dos Santos V, et al. Anterior segment optical coherence tomography. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1 de septiembre de 2018;66:132-56.
52. Zhang C, Du L, Sun P, Shen L, Zhu J, Pang K, et al. Construction of tissue-engineered full-thickness cornea substitute using limbal epithelial cell-like and corneal endothelial cell-like cells derived from human embryonic stem cells. *Biomaterials.* 1 de abril de 2017;124:180-94.

53. Albaladejo-Garcia V, Campos F, Carriel V, Chato-Astrain J, Diaz-Ramos M, Durand-Herrera D, et al. Hidrogeles de gelatina entrecruzados para aplicaciones en Ingeniería Tisular. Un estudio preliminar. Actualidad Médica [Internet]. [citado 2 de marzo de 2023];(803).
54. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling - Hutmacher - 2001 - Journal of Biomedical Materials Research - Wiley Online Library [Internet]. [citado 12 de junio de 2023].
55. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. Glob Cardiol Sci Pract. 1 de noviembre de 2013;2013(3):316-42.
56. Hara H, Cooper DKC. Xenotransplantation – The future of corneal transplantation. Cornea. abril de 2011;30(4):371-8.
57. Asensio G, Benito-Garzón L, Ramírez-Jiménez RA, Guadilla Y, Gonzalez-Rubio J, Abradelo C, et al. Biomimetic Gradient Scaffolds Containing Hyaluronic Acid and Sr/Zn Folates for Osteochondral Tissue Engineering. Polymers (Basel). 21 de diciembre de 2021;14(1):12.
58. Oosthuysen A, Zilla PP, Human PA, Schmidt CAP, Bezuidenhout D. Bioprosthetic tissue preservation by filling with a poly(acrylamide) hydrogel. Biomaterials. 1 de marzo de 2006;27(9):2123-30.
59. Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al. Study on Biocompatibility of Complexes of Collagen–Chitosan–Sodium Hyaluronate and Cornea. Artificial Organs. 2005;29(2):104-13.
60. Hutmacher DW, Schantz T, Zein I, Ng KW, Teoh SH, Tan KC. Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modeling. J Biomed Mater Res. mayo de 2001;55(2):203-16.
61. Myung D, Koh W, Bakri A, Zhang F, Marshall A, Ko J, et al. Design and fabrication of

- an artificial cornea based on a photolithographically patterned hydrogel construct. *Biomed Microdevices*. 1 de diciembre de 2007;9(6):911-22.
62. Chirila TV. An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. *Biomaterials*. 15 de diciembre de 2001;22(24):3311-7.
 63. De Bernardo M, Capasso L, Lanza M, Tortori A, Iaccarino S, Cennamo M, et al. Long-term results of corneal collagen crosslinking for progressive keratoconus. *Journal of Optometry*. 1 de julio de 2015;8(3):180-6.
 64. Fagerholm P, Lagali NS, Ong JA, Merrett K, Jackson WB, Polarek JW, et al. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials*. 1 de marzo de 2014;35(8):2420-7.
 65. Song K, Li liying, Yan X, Zhang W, Zhang Y, Wang Y, et al. Characterization of human adipose tissue-derived stem cells in vitro culture and in vivo differentiation in a temperature-sensitive chitosan/ β - glycerophosphate/collagen hybrid hydrogel. *Materials Science and Engineering: C*. 1 de enero de 2017;70:231-40.
 66. Chavda H, Patel C. Effect of crosslinker concentration on characteristics of superporous hydrogel. *Int J Pharm Investig*. 2011;1(1):17-21.
 67. Xeroudaki M, Thangavelu M, Lennikov A, Ratnayake A, Bisevac J, Petrovski G, et al. A porous collagen-based hydrogel and implantation method for corneal stromal regeneration and sustained local drug delivery. *Sci Rep*. 9 de octubre de 2020;10(1):16936.
 68. Alaminos M, Campos F, Carriel V, Martín Piedra MÁ, Quintero-Campos P, Sánchez-Quevedo MC. Caracterización de Agarosas Tipo I y Tipo VII para su uso en Ingeniería Tisular. *Actualidad Médica [Internet]*. [citado 13 de julio de 2023];(802).
 69. Lin FH, Yao CH, Sun JS, Liu HC, Huang CW. Biological effects and cytotoxicity of the composite composed by tricalcium phosphate and glutaraldehyde cross-linked

gelatin. *Biomaterials*. 1 de mayo de 1998;19(10):905-17.

70. Bealer EJ, Onissema-Karimu S, Rivera-Galletti A, Francis M, Wilkowski J, Salas-de la Cruz D, et al. Protein–Polysaccharide Composite Materials: Fabrication and Applications. *Polymers*. febrero de 2020;12(2):464.
71. Rajesh A, Zimmerman D, Spivack K, Abdulmalik O, Elmer J. Glutaraldehyde Cross-Linking Increases the Stability of *Lumbricus terrestris* Erythrocrucorin. *Biotechnol Prog*. marzo de 2018;34(2):521-8.

11.1 Anexo 1. Consentimiento Informado Donante Córnea Humana.

86

11.2 Anexo 2. Protocolo de inclusión hidrogeles multilaminares

Preparación de la muestra

1. **Prefijación de la muestra:** Cada una de las matrices se hidratarán con agua destilada y sucrulosa al 30% a pH de 7.0 durante 5 minutos.
2. **Fijación de la muestra:** tras el proceso de hidratación cada matriz será incluida en paraformaldehído durante 30 minutos a temperatura ambiente bajo campana. Luego se deshidratarán las muestras en etanol al 70% durante 12 horas a 4° C de temperatura
3. **Post fijación de la muestra:** continuación de proceso de deshidratación de cada matriz en alcohol de 70% durante 15 minutos.

Protocolo de procesamiento de inclusión:

- 1) etanol de 70% durante 15 minutos
- 2) alcohol de 80% durante 15 minutos
- 3) alcohol de 95 (dos cambios de 15 minutos cada uno)
- 4) alcohol de 100 (3 cambios de 15 minutos cada uno)
- 5) xilol (3 cambios de 15 minutos cada uno)
- 6) parafina (3 cambios de 15 minutos cada uno)

11.3 Anexo 3. Protocolo de Tinción H&E para hidrogeles sintéticos

Desparafinación

Desparafinar los cortes en xilol I por 5 minutos

Desparafinar los cortes en xilol II por 5 minutos

Desparafinar los cortes en xilol III por 10 minutos

Hidratación

Hidratar alcohol absoluto (100°) I por 5 minutos

Hidratar alcohol absoluto (100°) I por 5 minutos

Alcohol 95° por 5 minutos

Alcohol 70° por 5 minutos

Lavado con agua destilada

Coloración Hematoxilina Han's por 30 segundos

Viraje en agua corriente

Alcohol 95° por 5 minutos

Eosina alcohólica 0,5 % por 4 segundos

Alcohol absoluto (100) I por 1 dipping

Alcohol absoluto (100) II por 1 minuto

Alcohol / xilol (1:1) por 1 minuto

Xilol I por 1 minuto

Xilol II por 1 minuto

Xilol III por 1 minuto

Montaje con Entellán

11.4 Anexo 3. Protocolo de tinción VG para hidrogeles sintéticos

Desparafinación

Desparafinar los cortes en xilol I por 5 minutos

Desparafinar los cortes en xilol II por 5 minutos

Desparafinar los cortes en xilol III por 10 minutos

Hidratación

Hidratar alcohol absoluto (100°) I por 5 minutos

Hidratar alcohol absoluto (100°) I por 5 minutos

Alcohol 95° por 5 minutos

Alcohol 70° por 5 minutos

Lavado con agua destilada

Teñir con hematoxilina de Weiggert por 5 minutos

Agua corriente por 10 minutos para virar hematoxilina

Teñir en solución Van Gieson por 30 minutos

Alcohol absoluto (100) I por 1 dipping

Alcohol absoluto (100) II por 1 minuto

Alcohol / xilol (1:1) por 1 minuto

Xilol I por 1 minuto

Xilol II por 1 minuto

Xilol III por 1 minuto

Montaje con Entellán

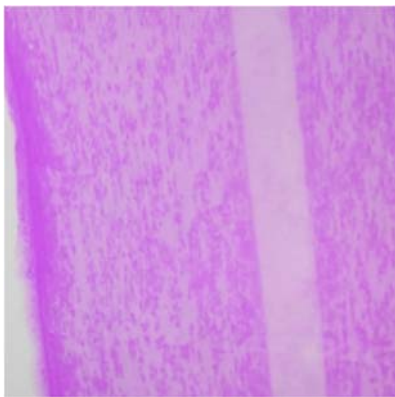
11.5 Anexo 4. Estandarización adquisición de imágenes microscopio óptico (Olympus)

Tinción HE	Tinción VG
Exposición y Gain	Exposición y Gain
Exposición de destino: 120	Exposición de destino: 120
Tiempo de exposición: 30 ms	Tiempo de exposición: 30 ms
Ganancia: 0	Ganancia: 0
Balance de blancos	Balance de blancos
ROI (manual)	ROI (seleccionado)
Rojo: 79	Rojo: 84
Verde: 102	Verde: 102
Azul: 103	Azul: 107
Ajuste de color	Ajuste de color
Hue: 0	Hue: 0

Saturación: 70	Saturación: 70
Brillo: 70	Brillo: 70
Contraste: 70	Contraste: 70
Gamma: 6	Gamma: 6

Visión imagen microscopio óptico

HE



VG



11.6 Anexo 5. Macros para ImageJ tinción HE

11.6.1 Macros para ImageJ tinción HE

```
StartupMacros.fiji.ijm  Macro_H&E_um.ijm
1  rename("x");
2  run("Duplicate...", " ");
3  run("Set Scale...", "distance=820 known=100 unit=um global");
4  run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] hide [r1]=36.775585 [g1]=95.57569 [b1]=3.14974 [r2]=2.501944");
5  selectWindow("x-1-(Colour_3)");
6  close();
7  selectWindow("x-1-(Colour_1)");
8  close();
9  selectWindow("x-1-(Colour_2)");
10 setAutoThreshold("Default");
11 //run("Threshold...");
12 call("ij.plugin.frame.ThresholdAdjuster.setMode", "B&W");
13 //setThreshold(0, 29);
14 setOption("BlackBackground", true);
15 run("Convert to Mask");
16 selectWindow("x");
17 close();
18 selectWindow("x-1");
19 run("8-bit");
20 run("Images to Stack", "use");
```

11.6.2 Macros para ImageJ tinción VG

```
StartupMacros.fiji.ijm  Macro_H&E_um.ijm  MACRO VG.ijm
1  rename("x");
2  run("Duplicate...", " ");
3  run("Set Scale...", "distance=820 known=100 unit=um global");
4  run("Colour Deconvolution", "vectors=[User values] hide [r1]=0.19591005 [g1]=-0.18011133 [b1]=92.713234 [r2]=2.8888276");
5  selectWindow("x-1-(Colour_3)");
6  close();
7  selectWindow("x-1-(Colour_1)");
8  close();
9  selectWindow("x-1-(Colour_2)");
10 setAutoThreshold("Default");
11 //run("Threshold...");
12 call("ij.plugin.frame.ThresholdAdjuster.setMode", "B&W");
13 //setThreshold(0, 85);
14 setOption("BlackBackground", true);
15 run("Convert to Mask");
16 selectWindow("x");
17 close();
18 selectWindow("x-1");
19 run("8-bit");
20 run("Images to Stack", "use");
```

11.7 Anexo 6. Tabla resumen de datos para cada objetivo específico

11.7.1 Intensidad de Tinción HE (IHE)

n	CONTROL HE	IHE C1H1	IHE C1H2	IHE C1H3
1	0,644213815	0,799347494	0,282135657	0,471155335
2	0,555194097	0,796837889	0,372278997	0,392751839
3	0,604962887	0,620772418	0,290098176	0,250463791
4	0,66871769	0,471982024	0,318861667	0,313901326
5	0,563015337	0,507459357	0,390497385	0,392948384
6	0,486297911	0,599093689	0,456567866	0,469047987
7	0,586895742	0,420015526	0,475696075	0,407258336
8	0,523060708	0,526543803	0,483921431	0,30189154
9	0,625826618	0,494439121	0,306081105	0,396277129
10	0,464992895	0,490450826	0,376746282	0,157491275
11	0,590335089	0,491934281	0,406747325	0,668745353
12	0,648889575	0,515292941	0,449082605	0,450320037
13	0,338576556	0,430109496	0,437488286	0,338967191
14	0,53061453	0,610172	0,237770806	0,266664776
15	0,731663872	0,507004209	0,413858766	0,149599202
n	CONTROL HE	IHE C2H1	IHE C2H2	IHE C2H3
1	0,644213815	0,466285434	0,386431129	0,58009017
2	0,555194097	0,619520494	0,526373584	0,581249696
3	0,604962887	0,740698279	0,606890532	0,512790847
4	0,66871769	0,48050894	0,55595155	0,191768028
5	0,563015337	0,406743192	0,341044618	0,834574477
6	0,486297911	0,4847187	0,352855312	0,64827571
7	0,586895742	0,554286119	0,397317347	0,897780141
8	0,523060708	0,434953092	0,440864096	0,675924108
9	0,625826618	0,416793685	0,313766144	0,683243545
10	0,464992895	0,423043056	0,340978029	0,708866516
11	0,590335089	0,581947484	0,501187046	0,655149581
12	0,648889575	0,621898882	0,560969193	0,31547284
13	0,338576556	0,702956819	0,425675347	0,249129889
14	0,53061453	0,607697965	0,509531424	0,766081018
15	0,731663872	0,675055432	0,456796779	0,728222997

11.7.2 Intensidad de Tinción VG (IVG)

n	CONTROL VG	IVG C1H1	IVG C1H2	IVG C1H3
1	0,496578031	0,978446641	0,275367088	0,851195628
2	0,688470949	0,669437293	0,422941854	0,948846156
3	0,697659608	0,782066732	0,395672821	0,792544334
4	0,458565386	0,488963585	0,401463535	0,850536454
5	0,701507026	0,844815476	0,420172251	0,921714119
6	0,767660842	0,802513405	0,515606534	0,967714254
7	0,869298271	0,99139297	0,558675672	0,950789408
8	0,893816939	0,968601972	0,748695935	0,754536499
9	0,727802415	0,740403994	0,643888196	0,671517184
10	0,815932894	0,856471167	0,383728708	0,674254038
11	0,900535343	0,828357845	0,292429101	0,723310956
12	0,379707983	0,710041148	0,578929517	0,548738751
13	0,402390309	0,717258474	0,568482772	0,562700036
14	0,518814658	0,676237292	0,26321059	0,349655639
15	0,422444379	0,519851523	0,384516504	0,303319276
n	CONTROL VG	IVG C2H1	IVG C2H2	IVG C2H3
1	0,496578031	0,67645801	0,378675292	0,66046188
2	0,688470949	0,483106106	0,43257864	0,732209981
3	0,697659608	0,530898231	0,54991168	0,743523354
4	0,458565386	0,484457254	0,303074867	0,813645242
5	0,701507026	0,517672594	0,298555781	0,867408094
6	0,767660842	0,463430808	0,378468368	0,800194856
7	0,869298271	0,422810904	0,383491022	0,912650579
8	0,893816939	0,35256298	0,437766128	0,780622767
9	0,727802415	0,307874736	0,262957095	0,66529451
10	0,815932894	0,285215328	0,320071065	0,604034844
11	0,900535343	0,343946405	0,239520228	0,824983076
12	0,379707983	0,501228239	0,35446977	0,562350886
13	0,402390309	0,486830034	0,230439864	0,538659154
14	0,518814658	0,574094628	0,246737841	0,715817867
15	0,422444379	0,65350449	0,357028768	0,606421528

11.7.3 Grosor post tinción

n	CONTROL	C1H1 HE	C1H2 HE	C1H3 HE	C2H1 HE	C2H2 HE	C2H3 HE
1	101,892	132,769	53,204	92,732	71,283	80,898	122,526
2	101,894	131,009	55,066	109,553	84,072	80,254	111,272
3	104,131	133,121	56,488	98,861	92,657	78,285	110,647
4	99,019	129,195	57,853	102,085	80,914	79,285	51,259
5	95,302	128,275	59,089	103,222	70,218	71,020	138,959
6	93,104	124,532	60,131	138,532	105,379	73,448	147,614
7	97,497	137,781	59,802	104,760	94,195	76,314	147,302
8	94,285	128,015	61,716	108,788	74,888	78,365	135,477
9	95,424	135,203	60,264	70,545	70,606	78,204	147,808
10	96,101	132,137	60,490	33,695	69,640	78,844	130,294
11	99,204	131,544	60,006	145,174	95,239	87,022	127,997
12	98,269	130,040	60,503	117,846	97,453	96,709	67,662
13	98,226	129,791	58,934	71,136	104,622	100,269	72,638
14	99,037	128,782	57,206	33,455	105,779	97,543	127,262
15	100,274	123,110	77,188	32,717	109,724	95,338	104,126
n	CONTROL	C1H1 VG	C1H2 VG	C1H3 VG	C2H1 VG	C2H2 VG	C2H3 VG
1	101,892	63,690	79,075	109,565	79,133	53,249	130,956
2	101,894	63,226	77,805	113,518	69,957	55,149	151,502
3	104,131	60,862	79,011	128,104	68,803	56,520	126,723
4	99,019	67,876	78,996	131,322	70,179	43,629	126,141
5	95,302	76,738	78,544	131,172	70,792	46,100	126,691
6	93,104	60,499	80,346	135,195	72,078	52,073	126,177
7	97,497	80,222	79,494	150,030	66,213	51,637	129,588
8	94,285	84,102	81,761	126,959	52,520	50,345	129,902
9	95,424	83,683	85,202	156,082	45,211	51,088	128,999
10	96,101	94,480	58,502	86,798	44,966	54,351	114,455
11	99,204	82,580	65,888	86,090	46,653	52,218	126,471
12	98,269	74,287	64,406	78,230	66,051	52,144	130,237
13	98,226	68,026	63,606	74,165	71,457	52,493	63,406
14	99,037	56,284	50,043	61,622	76,754	52,970	64,667
15	100,274	47,211	48,475	80,732	82,257	55,563	126,495

11.7.4 Grosor por capa matrices iniciales

MATRICES INICIALES

n	CONTROL	A1	B2	C3	D4	E5
1	101,892	44,475	67,741	31,017	31,731	43,169
2	101,894	50,221	75,079	26,747	26,829	43,726
3	104,131	45,269	83,3	19,384	24,39	44,048
4	99,019	45,679	90,636	19,767	31,801	44,374
5	95,302	39,92	92,448	17,054	22,487	44,382
6	93,104	44,858	64,099	24,421	20,001	44,264
7	97,497	45,679	70,504	22,093	32,196	45,147
8	94,285	47,737	74,164	28,682	36,197	44,918
9	95,424	48,603	73,232	29,46	29,996	46,126
10	96,101	45,679	81,485	32,982	36,585	46,015
11	99,204	41,977	81,485	26,359	42,7	47,653
12	98,269	39,506	83,295	28,706	23,171	47,219
13	98,226	39,508	84,215	26,789	38,274	46,666
14	99,037	38,307	65,91	33,73	39,043	44,384
15	100,274	41,171	81,485	24,833	35,867	40,548
Promedio	98,2439333	43,9059333	77,9385333	26,1349333	31,4178667	44,8426

11.7.5 Grosor total matrices iniciales

n	CONTROL	A1	B2	C3	D4	E5
1	450,97	244,205	430	474,004	488,201	468,038
2	434,653	234	442,005	450,16	508,098	468,038
3	443,215	226,009	464,108	458,039	516,062	476,151
4	449,51	194	484,004	440	518	438,292
5	443,984	180,011	474	460,004	528,545	394,005
6	394,328	170	498,004	446,004	513,887	390,185
7	409,164	154,052	528,004	456,018	514,875	368,266
8	407,702	184,011	518,313	460,109	474,342	394,183
9	404,147	188,043	522,75	444,018	438,292	410,044
10	385,298	228,009	518,313	440,005	460,626	428,019
11	424,243	248,032	508,016	444,113	468,209	436,293
12	430,797	282,064	536,015	456,018	484,5	464,017
13	427,599	304,007	540,133	462,039	458,354	504,099
14	429,587	298,107	544,092	444,041	448,361	502,143
15	416,561	288,34	532,004	452,018	484	532,004
PROMEDIO	423,450533	228,192667	502,650733	452,439333	486,9568	444,918467

11.7.6 Cantidad de capas matrices HE y VG

n	CONTROL	C1H1 HE	C1H2 HE	C1H3 HE	C2H1 HE	C2H2 HE	C2H3 HE
1	5	4	2	3	3	3	4
2	5	4	2	3	3	3	4
3	5	4	3	3	3	3	2
4	5	3	3	3	1	3	4
5	5	3	3	4	3	3	4
6	5	3	3	4	3	3	4
7	5	4	3	3	3	3	4
8	5	2	3	3	3	3	4
9	5	4	3	2	3	3	4
10	5	4	3	1	2	3	4
11	5	4	3	4	3	4	2
12	5	4	3	4	2	4	2
13	5	3	3	4	3	4	4
14	5	3	3	2	3	4	3
15	5	3	3	1	3	4	4
Promedio	5	3	3	3	3	3	4
n	CONTROL	C1H1 VG	C1H2 VG	C1H3 VG	C2H1 VG	C2H2 VG	C2H3 VG
1	5	4	2	4	3	3	5
2	5	4	2	4	3	3	5
3	5	4	3	4	3	3	5
4	5	3	3	3	1	3	4
5	5	3	3	3	3	3	5
6	5	3	3	4	3	3	5
7	5	4	3	4	3	3	5
8	5	2	3	2	3	3	5
9	5	4	3	2	3	3	2
10	5	4	3	3	2	3	4
11	5	4	3	3	3	4	3
12	5	4	3	2	2	4	2
13	5	3	3	2	3	4	2
14	5	3	3	2	3	4	2
15	5	3	3	2	3	4	5
Promedio	5	3	3	3	3	3	4

11.7.7 Porosidad

n	Control	A	B	C	D
1	22,924	40,794	40,657	646,196	36,147
2	1,935	39,203	86,11	595,44	13,513
3	1,854	18,487	107,585	14,646	2,14
4	13,625	21,379	8,131	71,715	2,928
5	14,673	17,4	28,147	146,713	13,513
6	26,175	75,223	26,896	640,893	24,999
7	4,972	64,162	21,058	317,921	0,676
8	34,802	36,471	74,851	37,878	2,477
9	3,977	12,944	10,008	239,135	47,295
10	0,86	4,987	5,421	45,453	72,069
11	6,557	4,96	9,591	66,918	5,63
12	26,31	22,519	2,293	37,12	0,563
13	57,43	5,305	5,421	247,974	26,35
14	33,351	4,217	6,672	42,676	1,013
15	10,83	6,127	0,625	20,454	6,869
PROMEDIO	17,3516667	24,9452	28,8977333	211,4088	17,0788

11.8 Anexo 7. Evaluación de distribución de datos

11.8.1 Intensidad HE

Tabular results

Normality and Lognormality Tests	A	B	C	D	E	F	G
Tabular results	CONTROL HE	IHE C1H1	IHE C1H2	IHE C1H3	IHE C2H1	IHE C2H2	IHE C2H3
Test for normal distribution							
Anderson-Darling test							
A2*	0.2380	1.038	0.3178	0.2844	0.4127	0.2727	0.8029
P value	0.7443	0.0071	0.5050	0.5785	0.2958	0.8152	0.0958
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
D'Agostino & Pearson test							
K2	3.502	8.188	1.587	1.571	2.551	2.046	2.225
P value	0.1738	0.0454	0.4523	0.4558	0.2792	0.3594	0.3287
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk test							
W	0.9837	0.8308	0.9454	0.9547	0.9280	0.9518	0.9119
P value	0.7585	0.0093	0.4547	0.8014	0.2379	0.5508	0.1448
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
Kolmogorov-Smirnov test							
KS distance	0.1087	0.2542	0.1275	0.1378	0.1813	0.1185	0.1912
P value	>0.1000	0.0100	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns
Number of values	15	15	15	15	15	15	15

11.8.2 Test Kruskal Wallis HE

ANOVA results									
Multiple comparisons									
Kruskal-Wallis test									
Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A?			
6	CONTROL HE vs. IHE C1H1	5.733	No	ns	>0.9999	B	IHE C1H1		
7	CONTROL HE vs. IHE C1H2	44.67	Yes	***	0.0004	C	IHE C1H2		
8	CONTROL HE vs. IHE C1H3	45.13	Yes	***	0.0003	D	IHE C1H3		
9	CONTROL HE vs. IHE C2H1	7.000	No	ns	>0.9999	E	IHE C2H1		
10	CONTROL HE vs. IHE C2H2	28.40	No	ns	0.0639	F	IHE C2H2		
11	CONTROL HE vs. IHE C2H3	-2.133	No	ns	>0.9999	G	IHE C2H3		
12									
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2			
14	CONTROL HE vs. IHE C1H1	71.40	65.67	5.733	15	15			
15	CONTROL HE vs. IHE C1H2	71.40	26.73	44.67	15	15			
16	CONTROL HE vs. IHE C1H3	71.40	26.27	45.13	15	15			
17	CONTROL HE vs. IHE C2H1	71.40	64.40	7.000	15	15			
18	CONTROL HE vs. IHE C2H2	71.40	43.00	28.40	15	15			
19	CONTROL HE vs. IHE C2H3	71.40	73.53	-2.133	15	15			
20									
21									

11.8.3 Distribución de datos Intensidad VG

Tabular results								
	A	B	C	D	E	F	G	H
	CONTROL VG	IVG C1H1	IVG C1H2	IVG C1H3	IVG C2H1	IVG C2H2	IVG C2H3	
1	Test for normal distribution							
2	Anderson-Darling test							
3	A2*	0.5166	0.2561	0.3675	0.4273	0.2992	0.2677	0.1875
4	P value	0.1590	0.6728	0.3833	0.2715	0.5390	0.5668	0.8960
5	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
6	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
7								
8	D'Agostino & Pearson test							
9	K2	4.294	0.3074	0.8165	1.925	0.07657	2.183	1.033
10	P value	0.1168	0.8575	0.6648	0.3819	0.9615	0.3358	0.5967
11	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
12	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
13								
14	Shapiro-Wilk test							
15	W	0.9066	0.9521	0.9447	0.9136	0.9566	0.9423	0.9695
16	P value	0.1203	0.5573	0.4449	0.1539	0.6328	0.4127	0.8512
17	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
18	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
19								
20	Kolmogorov-Smirnov test							
21	KS distance	0.1829	0.1152	0.1952	0.1333	0.1373	0.1298	0.1124
22	P value	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000	>0.1000
23	Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
24	P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
25								
26	Number of values	15	15	15	15	15	15	

11.8.4 Test Kruskal Wallis VG

ANOVA results						Multiple comparisons			
Kruskal-Wallis test Multiple comparisons									
1	Number of families	1							
2	Number of comparisons per family	6							
3	Alpha	0.05							
4									
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value	A-?			
6	CONTROL HE vs. IHE C1H1	5.733	No	ns	>0.9999	B	IHE C1H1		
7	CONTROL HE vs. IHE C1H2	44.67	Yes	***	0.0004	C	IHE C1H2		
8	CONTROL HE vs. IHE C1H3	45.13	Yes	***	0.0003	D	IHE C1H3		
9	CONTROL HE vs. IHE C2H1	7.000	No	ns	>0.9999	E	IHE C2H1		
10	CONTROL HE vs. IHE C2H2	28.40	No	ns	0.0639	F	IHE C2H2		
11	CONTROL HE vs. IHE C2H3	-2.133	No	ns	>0.9999	G	IHE C2H3		
12									
13	Test details	Mean rank 1	Mean rank 2	Mean rank diff.	n1	n2			
14	CONTROL HE vs. IHE C1H1	71.40	65.67	5.733	15	15			
15	CONTROL HE vs. IHE C1H2	71.40	26.73	44.67	15	15			
16	CONTROL HE vs. IHE C1H3	71.40	26.27	45.13	15	15			
17	CONTROL HE vs. IHE C2H1	71.40	64.40	7.000	15	15			
18	CONTROL HE vs. IHE C2H2	71.40	43.00	28.40	15	15			
19	CONTROL HE vs. IHE C2H3	71.40	73.53	-2.133	15	15			
20									
21									

11.9 Anexo 8. Resultado evaluación hinchamiento matrices concentración 0,10%.

Resultado: Porcentaje de masa seca de cada formulación.

N °	Masa seca [%]	N °	Masa seca [%]	N °	Masa seca [%]
1	N/A	13	N/A	25	24.52
2	6.27	14	4.20	26	7.82
3	14.66	15	6.03	27	25.24
4	35.99	16	21.46	28	31.94
5	12.63	17	5.27	29	5.97
6	16.08	18	9.55	30	6.67
7	6.61	19	10.96	31	7.57
8	12.52	20	12.08	32	11.13
9	20.47	21	15.66	33	17.66
10	34.28	22	23.17	34	28.97
11	12.49	23	8.59	35	7.80
12	13.51	24	13.51	36	8.25