



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



**“Desarrollo de sustituto corneal por técnica de
descelularización”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN
OPTOMETRÍA**

Presenta

Itza Alan Uribe Santa María

Director de tesis

Marco A. Álvarez Pérez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México, Marzo de 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Director de tesis:

- Marco Antonio Álvarez Pérez

Asesores de Tesis:

- Josefina Vázquez Medrano
- Janeth Serrano Bello

Dictaminadores de tesis:

- Mary Carmen Bates Souza
- Rosa María García González

Agradecimientos

Puedo reconocer que, al concluir el proceso de la construcción de mi tesis, no fue nada sencillo. Como todo buen trabajo satisfactorio que deja un gran sabor, me doy cuenta que aquellos obstáculos grandes por los que pasé, no pudiera haberlo hecho sin el apoyo de mi familia. Por lo que el principal agradecimiento es correspondiente a ellos por ser los promotores de este gran logro. Les agradezco por inculcarme paciencia, educación, valores que me forman hoy día como persona y por el apoyo incondicional que tanto recibí.

Gracias a mi padre por guiarme en esta etapa de mi vida y por recordarme que cada paso que ascienda va con la principal finalidad de ayudar a los demás. A mi madre por su cariño, consejos y por su motivación diaria. A mis abuelitas por ser parte de los pilares en cada logro en este trayecto. A Tita por su reconocible compañía en cada noche de estudio, y a Estelita por enseñarme la sencillez y humildad personal, que es fundamental para todo. Sin olvidar a Carolina R. que también me brindó su apoyo, atención, compañía y cariño, un apoyo esencial y personal en este trayecto de mi tesis e investigación. Gracias.

Por otro lado, agradezco a mi amigo y director de tesis, Dr. Marco A. Álvarez Pérez por abrirme las puertas e incorporarme al laboratorio, por su interés en el proyecto, confianza, humanismo, concreta enseñanza y apoyo personal en los momentos débiles del proceso.

Agradezco a la Dra. Janet Serrano Bello por su paciente dedicación, consejos y ayuda en el transcurso de la investigación.

De igual manera, a mi amigo y maestro, Esp. Oscar A. Ramos Montes por su interés y empeño, amplia visión y arduas ganas por revolucionar la carrera de Optometría en la UNAM, a través del Proyecto de Inducción a la Investigación de Optometría (PIIO) al incentivar a los alumnos a la investigación clínica-científica.

Agradezco a la Dra. Patricia González Alva, a la Dra. Febe Carolina Vázquez Vázquez, a mis compañeros y amigos de maestría y doctorado del LABORATORIO de BIOINGENIERÍA DE TEJIDOS, como al Técnico histotecnólogo Teodomiro Pérez Salazar del LABORATORIO DE PATOLOGÍA en el DEPARTAMENTO DE ESTUDIOS DE POSGRADO E

INVESTIGACIÓN (DEPeI) de la Facultad de Odontología, UNAM, por apoyarme en la curva de aprendizaje y enseñanza dentro del laboratorio.

Agradezco al LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA VEGETAL, de la UNIDAD DE BIOTECNOLÓGÍA Y PROTOTIPOS (UBPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM, por brindarme apoyo en materiales y reactivos. Agradezco infinitamente a mi amiga y asesora, la M. en C. Josefina Vázquez Medrano, por acompañarme desde un inicio en la comprensión bioquímica de esta investigación, por sus consejos y por su paciencia en el desarrollo de la misma. También agradezco al Mtro. en C. Rafael Quintanar Zúñiga por el espacio y apoyo en la caracterización microtopográfica y ultraestructural de las muestras, y a la bióloga Anabel Ruíz Flores por su amable atención y aporte científico en el laboratorio.

Agradecemos el apoyo del INSTITUTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLÓGÍA (ICAT), UNAM, por brindarnos su infraestructura, al Dr. José Manuel Saniger Blesa, al Dr. José Ocotlán Flores Flores, y a la Dra. América Vázquez Olmos por darme la participación en el curso de técnicas espectroscópicas. Y dentro de esta institución, al LABORATORIO UNIVERSITARIO DE CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA (LUCE), principalmente, al personal docente en el que me apoyó en la caracterización bioquímica de los andamios descelularizados de este trabajo de tesis: M. en C. José Guadalupe Bañuelos Muñetón y a la Dra. Selene Rubí Islas Sánchez. Al Dr. Augusto García Valenzuela y a la M. I. Anays Acevedo Barrera del LABORATORIO DE SENSORES ÓPTICOS Y ELÉCTRICOS, por recibirme después de los numerosos intentos de búsqueda por caracterizar propiedades ópticas de las biopelículas.

Agradezco al Dr. Edgar Oliver Villegas del CENTRO DE MICROSCOPIA en la ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS del INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, por su colaboración y apoyo en la preparación de muestras.

Agradezco al Dr. Daniel Chavarría Bolaños de la UNIVERSIDAD DE COSTA RICA por su confianza y amistad al permitirme llevar una estancia interuniversitaria en la Beca de Métodos de Investigación 2018, DGAE. Al igual que por su enseñanza en la caracterización de membranas descelularizadas, como también por la presentación y vinculación con el Dr. José R. Vega Baudrit, director en LABORATORIO NACIONAL DE

ALTA TECNOLOGÍA (LANOTEC) en el que colaboré para dicho proceso. Al igual se agradece la ayuda a los integrantes, Dra. Galia Moreno y al Esp. Reynaldo Pereira, entre otros, por el apoyo en el procesamiento de la caracterización del biomaterial y atención dentro de la estancia.

Agradezco el apoyo del financiamiento por parte del programa DGAPA-UNAM: PAPIITIT203618 al proyecto que he permitido la realización de esta investigación.

Agradezco el apoyo por parte de CONACyT del proyecto A1-S-9178 del programa del Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, que ha permitido la realización de esta investigación.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1. Anatomía y fisiología corneal	2
2.2. Enfermedades corneales	13
2.3. Tratamientos de reemplazo	21
2.4. Ingeniería Tisular	26
2.4.1. Andamios	26
2.4.2. Descelularización.....	28
2.5. Técnicas de caracterización para biomaterial, fundamentos teóricos	31
2.5.1. Tinción histológica	32
2.5.2. Tinción fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol	33
2.5.3. Cuantificación de ADN por fluorometría.....	33
2.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido	34
2.5.5. Espectroscopia Raman.....	36
2.5.6. Análisis térmico.....	40
2.5.7. Refractometría por Reflexión	44
3. Antecedentes	50
4. Justificación	55
5. Hipótesis	55
6. Objetivos	56
6.1. Objetivo general.....	56
6.2. Objetivos específicos	56
7. Materiales y métodos	57
7.1. Procuración corneal	57
7.2. Descelularización	57
7.3. Evaluación de descelularización	58
7.3.1. Evaluación histológica por hematoxilina y eosina.....	58
7.3.2. Tinción fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol	59
7.3.3. Cuantificación de ADN por fluorometría.....	60
7.4. Caracterización del andamio	61
7.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido	61

7.4.2. Espectroscopía Raman.....	61
7.4.3. Análisis térmico.....	62
7.4.4. Refractometría por Reflexión	62
8. Resultados	64
8.1. Procuración corneal	64
8.2. Descelularización	65
8.3. Evaluación histológica por hematoxilina y eosina	65
8.4. Tinción fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol	68
8.5. Cuantificación de ADN por fluorometría	69
8.6. Microscopía Electrónica de Barrido.....	71
8.7. Espectroscopía Raman.....	74
8.8. Análisis térmico	78
8.8.1. Calorimetría Diferencial de Barrido	78
8.8.2. Análisis Termogravimétrico.....	80
8.9. Refractometría por Reflexión	84
9. Discusión	88
10. Conclusión.....	94
11. Prospectos y traslación	95
12. Anexos	96
13. Bibliografía.....	102

1. Resumen

Hoy en día las enfermedades corneales son la segunda causa de ceguera funcional en el mundo, para ello, el tratamiento convencional es la queratoplastia penetrante y sus derivados, sin embargo, factores como la escasez de injerto corneal, tasa de rechazo por el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y la pérdida del privilegio inmune son limitantes en el tratamiento de la ceguera funcional.

Investigaciones actuales han colocado a la ingeniería de tejidos como puntal en la medicina regenerativa siendo una alternativa a estas limitantes. Numerosos investigadores han probado andamios naturales, sintéticos y mixtos para una regeneración corneal. La descelularización se ha considerado una técnica prometedora para la obtención de andamios, en esta investigación el objetivo fue desarrollar un biomaterial corneal derivado de córnea porcina con características físico-bioquímicas y ópticas similares a la córnea nativa humana, por medio de un método de descelularización involucrando factores físicos y químicos utilizando el surfactante Dodecil Sulfato Sódico (SDS) en una concentración de 0.5%. Una vez que se obtuvo el andamio corneal se realizó una serie de pruebas de caracterización donde se confirmó: un estado libre de células en todos los estratos de córnea por la tinción histológica hematoxilina y eosina (HyE), disminución del material nuclear por la cuantificación de ADN residual con la diferencia de promedio en córnea nativa de 124 ng/mL y 98.47 ng/mL del biomaterial, confirmado estadísticamente por la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney* con una significancia de $p < 0.05$, que fue rectificado con una prueba objetiva con marcaje fluorescente DAPI. Además, el andamio descelularizado mostró una microtopografía, así como una ultraestructura similar a la córnea nativa. Así mismo, presentó una estabilidad bioquímica por la detección del triplete de *Gly-Pro-Hyp* por espectroscopia Raman, también, se obtuvo por análisis térmico, la conservación de materia corneal a temperaturas anatómicas del globo ocular y por Refractometría por Reflexión se obtuvo que las propiedades refractivas fueron similares al medio acuoso en el que se encontraba el biomaterial, obteniendo un índice de refracción del andamio hidratado de 1.39 en una película de 10 μm de espesor del material. Se concluye que la descelularización es una opción para obtener andamios que podrían tener un gran potencial para realizar estudios posteriores *in-vivo* considerando que una de sus finalidades es poder implantarse como terapéutica de espesor personalizado en patologías corneales, evitando un aloinjerto de derivado de queratoplastia.

2. Introducción

2.1. Anatomía y fisiología corneal

La córnea es un medio refringente, es un tejido transparente inmunológicamente privilegiado por su avascularidad, situado en la parte anterior del globo ocular, es de naturaleza convexa esférica y es considerado el principal medio refringente del sistema visual aportando un valor dióptrico del 70% aproximadamente del poder refractivo total del globo ocular (43,05 de 60.00 dioptías). La córnea con la ayuda de la regularidad de la película lagrimal y medios refringentes focaliza la imagen a la retina neurosensorial⁽¹⁾.

La dimensión corneal generalmente en un estado no patológico de limbo a limbo es de 11-12 mm horizontal y 10-11 mm vertical dando una apariencia oval con diámetro 11.71 ± 0.42 mm, con un radio de curvatura anterior de 7.8 mm, en su cara posterior es cerca de 6.5 mm y su índice de refracción es de 1.376^(1,2).

Una de las funciones importantes junto con el tejido adyacente (la esclera) es la protección de las estructuras dentro del ojo actuando como barrera o recubrimiento protector contra infecciones, además de estar a cargo de la regulación de paso del fluido exterior. El espesor central contempla 535-585 μm y con un aumento en la periferia dado con espesor de 612-640 μm que este mismo en su totalidad, tiende a disminuir con edad⁽³⁾.

La córnea presenta una composición de 5 capas (figura 1), estas aportan determinado espesor y función del tejido; 3 capas principales (epitelio, endotelio y estroma) junto con 2 interfaces (membrana de Bowman y Descemet).

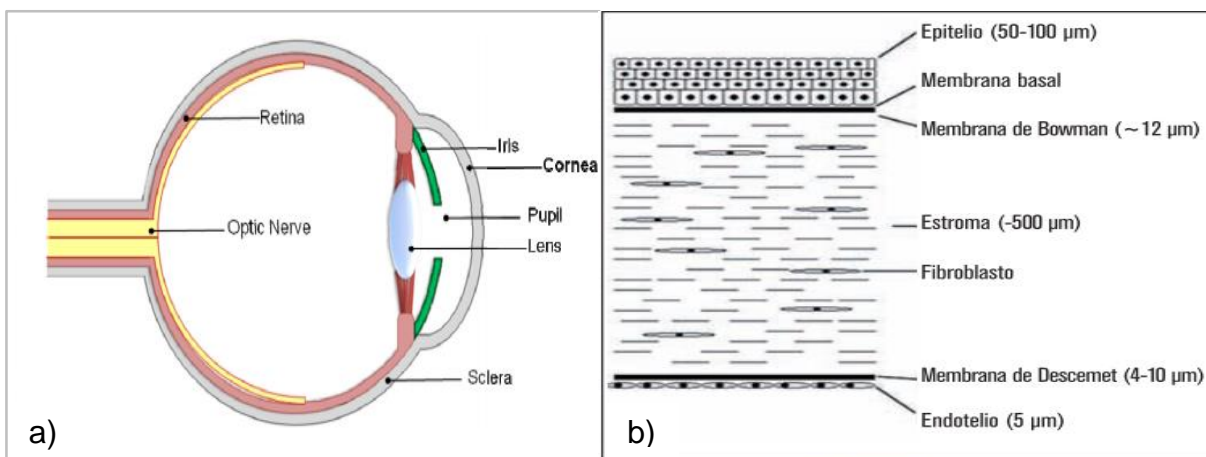


Figura 1. Composición del globo ocular. a) anatomía del ojo y ubicación de córnea⁽⁴⁾; b) 5 capas de córnea⁽⁵⁾.

El **epitelio** corneal, es un epitelio estratificado no queratinizado, tiene un espesor de cerca de 50 μm , conformado por 5 a 7 capas de células epiteliales derivadas del epitelio basal del limbo esclerocorneal provenientes del ectodermo epidérmico⁽¹⁾. Tiene una funcionalidad de ser una barrera para el paso de agua, químicos y microorganismos, así como para proporcionar una superficie óptica lisa como parte interna de la película lagrimal. El epitelio tiene una relación simbiótica con la película lagrimal por el contacto directo que tiene la mucina con el epitelio (producto de las células de Glovet en la conjuntiva), así como, las moléculas de glucocálix de las células epiteliales corneales, permiten la extensión de la película lagrimal en cada parpadeo⁽¹⁾. En esta capa podemos encontrar en la periferia células de Langerhans que realizan una función inmunológica⁽⁵⁾. En la parte más profunda del epitelio se encuentra la **membrana basal** de 40-65 μm de espesor, donde se alojan las células basales de forma cúbica, estas son células del epitelio basal provenientes del limbo corneal capaces de regenerar el epitelio por el desplazamiento centrípeto llamado "X, Y y Z". Estas células basales se alojan en la parte inferior del epitelio migrando hacia la parte superficial pasando por un trayecto ascendente con cambio en su morfología a forma alada, posteriormente adquiere una forma de célula escamosa plana, pequeña, clara o joven con microvellosidades abundantes precediendo a otra de coloración oscura o madura más grande cubierta de una cantidad menor de microvellosidades, esta, llegando al final del ciclo de vida desprendiéndose, siendo parte del recambio del epitelio^(1,5-8). La matriz extracelular de la capa basal está conformada de colágena tipo IV, laminina lúcida y laminina densa secretada por células, contiene fibras de anclaje de colágena tipo VII que inician su trayecto en la membrana basal y llegan a las placas de anclaje de colágena tipo I ubicadas en la capa subsecuente inferior, el estroma. Se cree que la colágena tipo XX está presente en el epitelio y actualmente es poco entendida⁽⁹⁻¹¹⁾. Las células epiteliales basales como indicativo de diferenciación terminal expresan citoqueratina 3, 19, conexina 43 e integrina $\alpha 9$ con expresión preferencialmente de marcadores progenitores tales como p63, especialmente isoforma $\Delta\text{Np}63\alpha$, Bcrp1/ABCG2 y N-Caderina^(7,12).

Membrana de Bowman tiene una condensación o interfaz de colágena compuesta del tipo I y V, anclada a la membrana basal del epitelio por las fibras de colágena tipo VII y proteoglicanos que ayudan a mantener su forma, tiene un espesor 12-17 μm y carece de regeneración^(5,10).

Estroma, comprende del 80-85% de extensión corneal con un espesor aproximado de 500 μm , tiene la característica de una alta transparencia cuál es el resultado de la organización precisa de las fibras de colágena y matriz extracelular (MEC)⁽¹⁾ sintetizada por los queratocitos provenientes de la cresta neural después de la estabilización del endotelio primitivo, existiendo alrededor de 2,4 millones de queratocitos con una densidad estimada del 30% mayor en el estroma anterior que en el posterior^(5,10). Los queratocitos, también llamados fibroblastos corneales, son capaces de sintetizar moléculas de colágena, glicosaminoglicanos (GAGs) (que mantienen uniones estrechas entre las fibras estromales) mientras que también crean

metaloproteasas, todo es crucial para el mantenimiento de la homeostasis estromal^(1,5,10). Los fibroblastos tienen forma aplanada, de modo que también se ubican paralelos a la superficie y sus extensiones se entrelazan entre sí mediante uniones tipo gap⁽⁵⁾ (figura 2). Se conoce que los queratocitos participan en la estabilidad de las lamelas, juegan un papel importante en la cicatrización después de cirugía refractiva y realizan el recambio de la MEC junto con el mantenimiento de la integridad de las fibras de colágena por una rotación constante^(13,14). La mayoría de estos queratocitos residen en el estroma anterior y contienen proteínas llamadas “proteínas cristalinas corneales” representando el 25-30% de proteínas solubles en las células que son responsables de reducir la retroreflexión de la luz y mantener la transparencia corneal^(1,15). La disposición circular de los queratocitos giran gradualmente a la derecha como las manecillas del reloj formando una ortogonalidad del centro a la periferia, de esta manera se da la oportunidad en que la luz pasa por uno o más queratocitos y minimiza así la variación de la dispersión de luz contribuyendo a la transparencia en toda la córnea⁽¹³⁾.

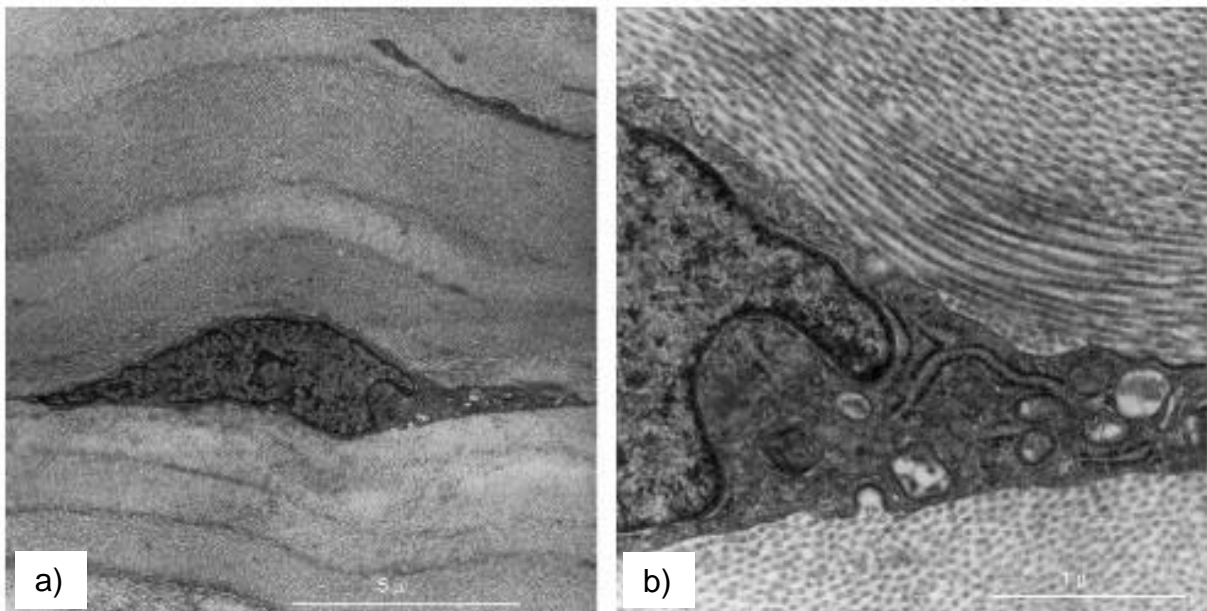


Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión de estroma corneal humano. a) localización de queratocitos entre lamelas del estroma mostrando su forma aplanada; b) alta magnificación que muestra un queratocito en relación con las fibras de colágena cursando varias direcciones⁽¹⁾.

Las fibras de colágena tienen un calibre o diámetro de 22-35 nm y están uniformemente espaciadas por 41 nm aproximadamente^(5,14). Estas fibras están dispuestas en paquetes paralelos llamados fibrillas, estas fibrillas están empaquetadas en paralelo en capas o lamelas⁽¹⁾. La red de lamelas presenta diferencias regionales entrecruzándose más densamente en el tercio anterior que en los dos tercios posteriores del estroma donde se disponen paralelas a la superficie corneal. El estroma humano contiene 200 a 250 lamelas, estas estructuras de grosor variable, en humanos se ha encontrado una variabilidad de 0,2 mm de ancho hasta 0,2 - 2.5 μ m de espesor^(5,10,14). La densidad en los haces es mayor en el estroma anterior que en el

posterior, sin embargo, las capas más profundas están más estrictamente organizadas que las superficiales y esta diferencia explica la respuesta ante la presencia de un edema corneal mencionado adelante^(1,10).

La composición de las fibras de colágena del estroma está dada por colágena predominante y fundamental tipo I en un complejo heterodinámico con la colágena tipo V para obtener su diámetro único y estrecho. En este compuesto hay 300 a 400 moléculas de triple hélice dentro de la sección transversal de la fibra de colágena. La colágena tipo II sólo se encuentra en la córnea embrionaria^(1,5,10). El tipo V y VI se encuentran en pequeñas cantidades y algunos autores mencionan haber encontrado colágena III, IX y XII en estroma⁽¹⁰⁾. Estos compuestos están rodeados por cadenas de glicosaminoglicanos; el estroma posterior presenta más concentración del proteoglicano queratán sulfato o sulfato de condroitina (molécula hidrofílica) mientras que el anterior es mayor la concentración de dermatán sulfato (molécula hidrofóbica) que ayuda a regular la hidratación y las propiedades estructurales^(1,5,10).

La **Membrana de Descemet** es una estructura de 5-7 μm formada de colágena tipo IV, VIII y laminina, se considera la segunda interface, esta es continuamente secretada por el endotelio antes y después del nacimiento con la función de ensamblamiento de redes hexagonales para formar el endotelio y posteriormente es totalmente dependiente del endotelio^(5,10,11).

Endotelio, comprende una capa de células escamosas, de morfología predominante hexagonal de 5-18 μm de espesor, estas células no tienen reproducción en condiciones normales, solo llegan a sufrir mitosis en condiciones patológicas y especiales. La función del endotelio es regular el fluido como el transporte de nutrientes del humor acuoso al estroma a través de las uniones entre células, y simultáneamente expulsan el exceso de agua para prevenir el edema corneal y mantener una hidratación y ósmosis óptima⁽⁸⁾. La membrana lateral contiene una alta cantidad de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPasa}$ ya que son altamente metabólicas^(10,12). El número de células endoteliales aproximadamente al nacer es de 3500 células/ mm^2 , el número de células endoteliales necesarias para mantener la transparencia corneal es de 700 a 1000 células/ mm^2 , ya que la densidad central decrece en un valor de 0,6% por año en córneas normales. La superficie basal del endotelio contiene numerosas uniones hemidesmosomas que promueven la adhesión a la membrana de Descemet⁽¹⁾.

La participación de varios tipos de colágenas en la córnea es amplia (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, XII, y XX). Cada tipo de colágena tiene una forma, función y estructuralmente son diferentes, [cuadro 1](#). Dependiendo de la estructura de cada tipo de colágena determinan la función y su agrupación en familias. Basados en su organización supramolecular pueden ser agrupados en colágenas formadoras de fibras, colágenas asociadas a fibras con red de triple hélice interrumpida (por sus siglas en inglés, FACIT), colágenas formadoras de redes, fibras de anclaje, colágenas transmembranales, colágena de membrana basal y otras con funciones únicas⁽¹¹⁾. Y a pesar de su diversidad estructural altamente variada, todos los miembros de la familia

de la colágena, tienen un rasgo característico, una triple hélice compuesta por tres cadenas “ α ”. Estas pueden estar formadas por tres cadenas idénticas (homotriméricas) como la colágena tipo II, III, VII, XII, XX y otros por cadenas diferentes (heterotriméricas) como la colágena tipo I, IV, V, VI, VIII y IX. Cada una de estas tres cadenas “ α ” dentro de la molécula forma una hélice zurda extendida con 18 aminoácidos por turno. Las tres cadenas escalonadas por un residuo entre sí, se superenrollan alrededor de un eje central de forma derecha para formar la triple hélice. C-propéptido se piensa que juega un papel fundamental en la iniciación de la formación de la triple hélice, mientras que N-propéptido está involucrado en la regulación de los diámetros primarios de fibras⁽¹⁷⁾.

La unidad básica estructural de la colágena consiste en tres cadenas de polipéptidos que se enrollan en un eje central en una triple hélice derecha, una estructura supramolecular característica estabilizada por enlaces de hidrógeno intermoleculares. Las cadenas de polipéptidos que forman las unidades estructurales de colágena son ricas en residuos de glicina (Gly), frecuentemente ocupan la posición prolina (Pro) X e hidroxiprolina (Hyp) Y, unidos entre sí con un patrón repetitivo característico “Gly-X-Y”, prerequisite estructural para el ensamblaje dentro una triple hélice, que caracteriza los dominios “colágenas” de todos los tipos (figura 3 y 4). Las cadenas α son ensambladas alrededor de un eje central de manera que todos los residuos de glicina son posicionados en el centro de la triple hélice, mientras que las cadenas laterales más voluminosas de los otros aminoácidos ocupan las posiciones externas, permitiendo un empaquetado cercano a lo largo del eje central de la molécula. Dependiendo del tipo de colágena, específicamente residuos de prolina y lisina son modificados por hidroxilación enzimática⁽¹¹⁾.

Cuadro 1. Composición y estructura corneal⁽¹¹⁾.

Tipo de estructura corneal	Composición molecular	Localización genómica	Distribución tisular y función
Colágena tipo I. Colágena formadora de fibrillas	$\alpha 1(I)_2 \alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	Conforma la membrana de Bowman con adherencia a la membrana basal epitelial por fibras de colágena tipo VII y fundamental en el estroma corneal conformando la colágena de la matriz extracelular, como en hueso, dermis, tendón, ligamento y córnea ^(1,5,10,11) . Proporciona resistencia al estiramiento y rigidez en la tracción incorporado a la colágena III y V.

Colágena tipo II. Colágena formadora de fibrillas	$[\alpha 1(\text{II})]_3$	COL2A1 (12q13.11–q13.2)	Se encuentra en cartílago, cuerpo vítreo, córnea embrionaria y núcleo pulposo ^(5,11) . Proporciona resistencia a la presión intermitente.
Colágena tipo III. Colágena formadora de fibrillas	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	COL3A1 (2q31)	En estroma corneal, conforma la matriz extracelular de la córnea, abunda en el tejido conjuntivo laxo, piel, pared del vaso, fibras reticulares de la mayoría de los tejidos (pulmones, hígado, bazo, etc.) ^(5,10,11) . Sus fibras reticulares en los tejidos intersticiales proporcionando elasticidad.
Colágena tipo IV. Colágenas de membrana basal	$[\alpha 1(\text{IV})]_2$ $\alpha 2(\text{IV})$; $\alpha 1 - \alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36–q37) COL4A4 (2q36–q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	Forma la lámina basal que subyace a los epitelios, normalmente organizado en una red de moléculas orientadas al azar, asociadas a proteoglicanos y conforma la membrana de Descemet hecha con colágena IV y laminina ^(5,10,11) . Proporciona sostén, fijación y restringe membranas basales.
Colágena tipo V. Colágena formadora de fibrillas	$\alpha 1(\text{V})$, $\alpha 2(\text{V})$, $\alpha 3(\text{V})$	COL5A1 (9q34.2–q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)	Pulmón, córnea, hueso, membrana fetal, conforma la matriz extracelular de la córnea; se considera un tejido intersticial asociado a la colágena tipo I y III ^(1,5,10,11) . Su incorporación a las heterofibras controla su ensamblaje, crecimiento y diámetro de cada una.
Colágena tipo VI.	$\alpha 1(\text{VI})_2$ $\alpha 2(\text{VI})$; $\alpha 3(\text{VI})$	COL6A1 (21q22.3)	Generalizado: dermis, cartílago, placenta,

Colágena microfibrilar		COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	pulmones, pared vascular, disco intervertebral, compone la matriz extracelular del estroma corneal. Sirve de anclaje de las células en su entorno en tejido intersticial porque es microfibrilar y contribuye a una red de filamentos asociado con las fibras de colágena tipo I ^(5,10,11) .
Colágena tipo VII. Fibras de anclaje	[α 1(VII)] ₃	COL7A1 (3p21.3)	Piel, unión dérmica – epidérmica; mucosa oral, cuello uterino, se encuentra en láminas basales ^(5,11) . Adhiere la membrana de Bowman a la membrana basal epitelial.
Colágena tipo VIII. Colágena hexagonal formadora de red	[α 1(VIII)] ₂ α 2(VIII)	COL8A1 (3q12–q13.1) COL8A2 (1p34.3–p32.3)	Células endoteliales, Membrana de Descemet ^(5,11) . Función de ensamblamiento de redes hexagonales, producido por células endoteliales que contribuye a la formación de la membrana de Descemet en córnea.
Colágena tipo IX. Colágena FACIT	α 1(IX) α 2(IX) α 3(IX)	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33–p32.2)	Cartílago articular maduro, humor vítreo y córnea, <u>interactúa con el tipo II</u> ^(5,11) . Localizada en dirección anti paralela a lo largo de la superficie de las fibras de colágena tipo II.
Colágena tipo XII. Colágena FACIT	[α 1 XII)] ₃	COL12A1 (6q12–q13)	Pericardio, ligamento, tendón, tejido corneal. Presente en tejidos sometidos a altas tensiones, como los tendones y ligamentos. Interactúa con los tipos I y III ^(5,11) . Secuencia homóloga a la colágena tipo IX y ambas, asociadas al tipo I.

Colágena tipo XIII. Colágena transmembran al	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	COL13A1 (10q22)	Es ampliamente encontrado como una proteína asociada a la membrana celular. Interactúa con los tipos I y III ^(5,11) .
Colágena tipo XX. Colágena FACIT	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$	COL19A1 (6q12–q14)	Ubicado en epitelio y estroma corneal, piel de embrión, cartílago esternal, tendón, pared de vasos sanguíneos ^(10,11) .

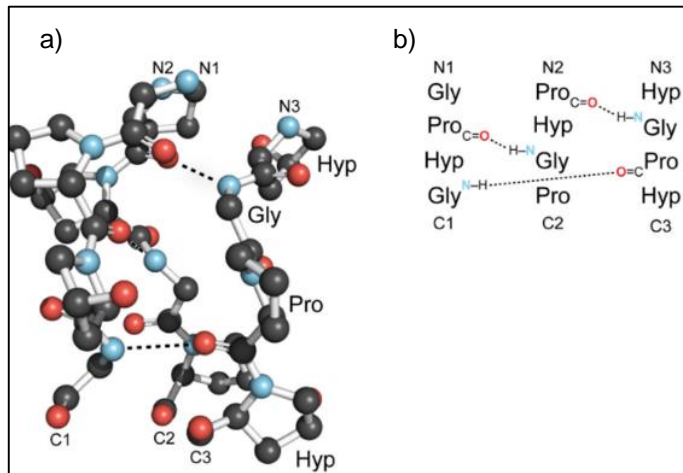


Figura 3. Conformación espacial de la molécula de colágena. a) Imagen de bola y palo de un segmento de triple hélice de colágena destacando la escala de enlaces de hidrógeno entre cadenas; b) Escalonamiento de los tres hilos del segmento en la imagen anterior. El paquete de las hélices de la molécula, exige que cada tercer residuo sea *Gly*, lo que resulta en secuencia repetitiva Xaa-Yaa-*Gly*, donde Xaa y Yaa pueden ser cualquier aminoácido, esta repetición ocurre en cualquier tipo de colágena, por lo tanto, para diferenciarse, algunos son interrumpidos en ciertas locaciones dentro

del dominio de triple hélice. Los aminoácidos en las posiciones Xaa y Yaa frecuentemente son prolina (*Pro* 28%) e hidroxiprolina (*Hyp* 38%), y la repetición de *Gly-Pro-Hyp* es el triplete más común en colágena (10.5%). En animales vertebrados la triple hélice individual es conocida como tropocolágena^(18,19).

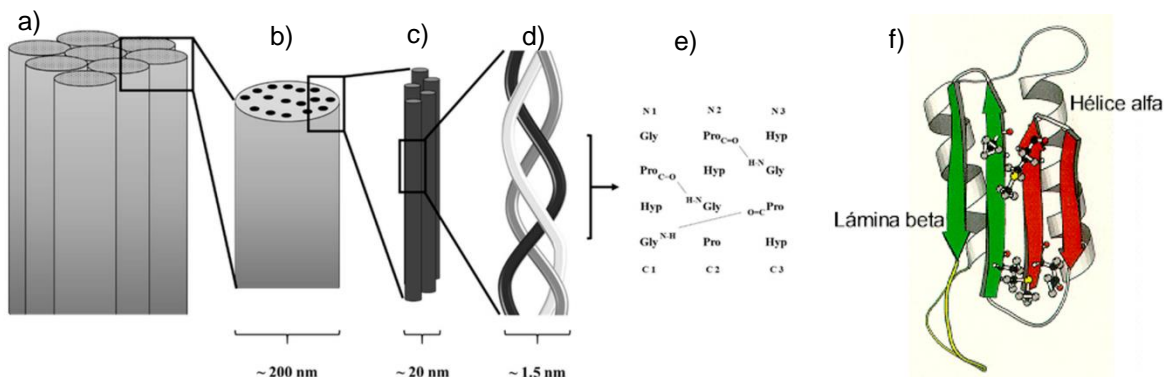


Figura 4. Estructura esquemática de colágena. a) Lamela de colágena, b) Fibra de colágena ensamblada por fibrillas de colágena; c) Fibrillas de colágena; d) triple hélice de tropocolágena ensamblado; e) puentes de hidrógeno entre cadenas α de colágena; f) conformación espacial de la estructura secundaria de colágena con α hélices y hojas β paralelas y antiparalelas, estas mismas unidas por puentes de hidrógeno a las cadenas α ⁽²⁰⁾.

Adyacente al estrato corneal se encuentra el **limbo esclerocorneal**, es una estructura o zona de transición periférica, semi vascularizada radial y fuertemente inervada localizada en la unión del borde vascular de la conjuntiva y córnea, tiene la función de proporcionar protección física y nutrición a las células madre (CM) como regeneración celular⁽²¹⁾.

A diferencia de la córnea, el limbo tiene una superficie ondulada y rugosa con papilas o “estacas” por la extensión del estroma hacia arriba⁽⁹⁾. La composición del limbo es de cadenas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ de colágena tipo IV y VII, laminina-1 ($\alpha 1$, $\beta 1$ y $\gamma 1$) laminina-5 ($\alpha 3$ $\beta 3$ y $\gamma 3$) como fibronectina siendo una de las moléculas más observables también en toda la membrana basal limbar epitelial^(7,22). Está alineada a la periferia corneal donde se alojan las células madre del epitelio, siendo una zona con una capacidad regenerativa por su alto potencial de proliferación en diferentes en cultivos celulares *in-vitro*. Anatómicamente el nicho de células madre limbares están localizadas en el área palizada de Vogt, la cual es altamente pigmentada por la presencia de melanocitos que tiene una exclusiva síntesis de melanina, una infiltración de células presentadoras de Langerhans^(23–25) con la producción de vimentina y participación linfocitos T supresores^(7,26) (figura 5). El nicho de células proporciona un entorno de refugio que protege a las células madre de estímulos que promueven de manera adversa la diferenciación y apoptosis, lo que amenaza la reserva de CMs⁽²⁷⁾.

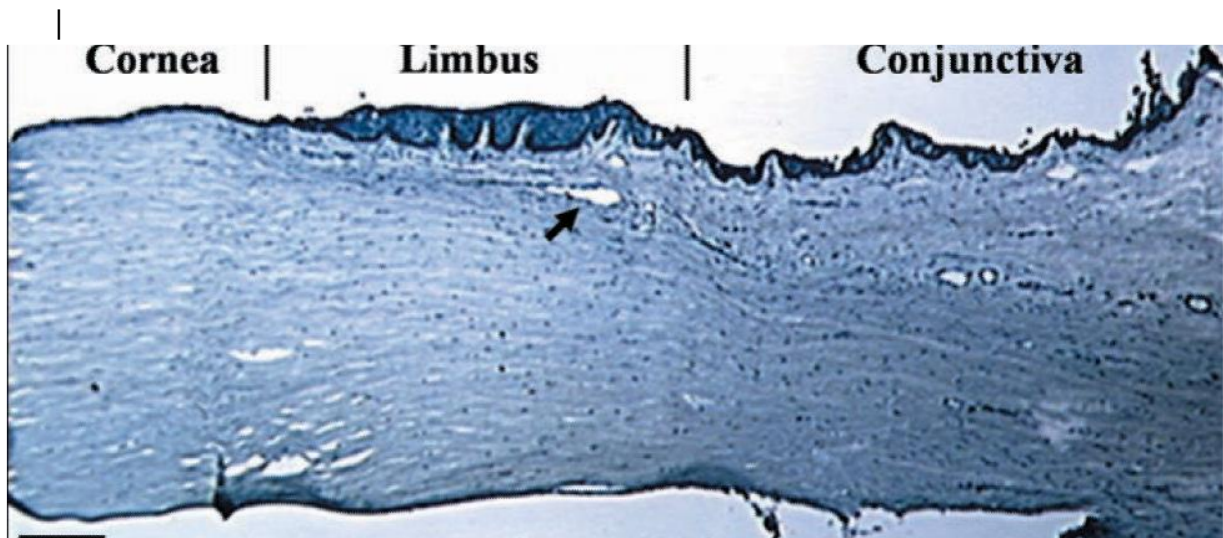


Figura 5. Tinción histológica revela una adyacente celularidad y vascularidad (señalada con la flecha) con una estratificación y ondulación mayor que la del epitelio corneal correspondiente al limbo esclerocorneal. También se logra observar una desorganización generalizada del estrato que progresa del epitelio y estroma corneal a esclera (capa de colágena debajo del tejido epitelial, conjuntival)⁽⁷⁾.

La regeneración del epitelio deriva en esta capa y es una de las exclusividades de la córnea, gracias a la capacidad y sistema de migración proveniente del limbo esclerocorneal. Las células madre limbares tienen la capacidad de autorenovación con un ciclo lento que producen células amplificadoras transitorias (CAT), estas células

pueden realizar múltiples rondas de división a comparación del homeostasis normal produciendo una mayor proliferación que puede aumentar nueve veces en la regeneración corneal (por lo general el tiempo del ciclo promedio es de 60 horas y 24 horas con estimulación)⁽²¹⁾.

Las capacidades proliferativas de las CATs amplifican todas las divisiones celulares y reducen la necesidad de proliferación de células madre, así, al mismo tiempo evitan introducir errores de ADN replicativo en la población de células madre, lo que da como resultado una gran cantidad de células post-mitóticas diferenciadas de manera terminal que se mueven hacia el centro de la córnea y hacia arriba desde la capa de células epiteliales basales⁽²¹⁾ (figura 6). Se cree que las células epiteliales migratorias se mueven a través de la superficie de una herida mediante un proceso cíclico formando adhesiones temporales que involucra a filopodios (proyecciones citoplasmáticas delgadas, con filamentos de actina entrecruzados formando adhesiones locales con el sustrato, afirmando el desplazamiento a la superficie ocular) y lamelipodios (prolongaciones anchas y laminares transitorias de la membrana celular, producidas por la acción de microfilamentos de actina del citoesqueleto celular) y con ayuda de los mecanismos contráctiles intercelulares, hacen que la célula avance mientras que las adherencias focales se escinden para permitir que se repita el proceso cíclico⁽⁴⁾.

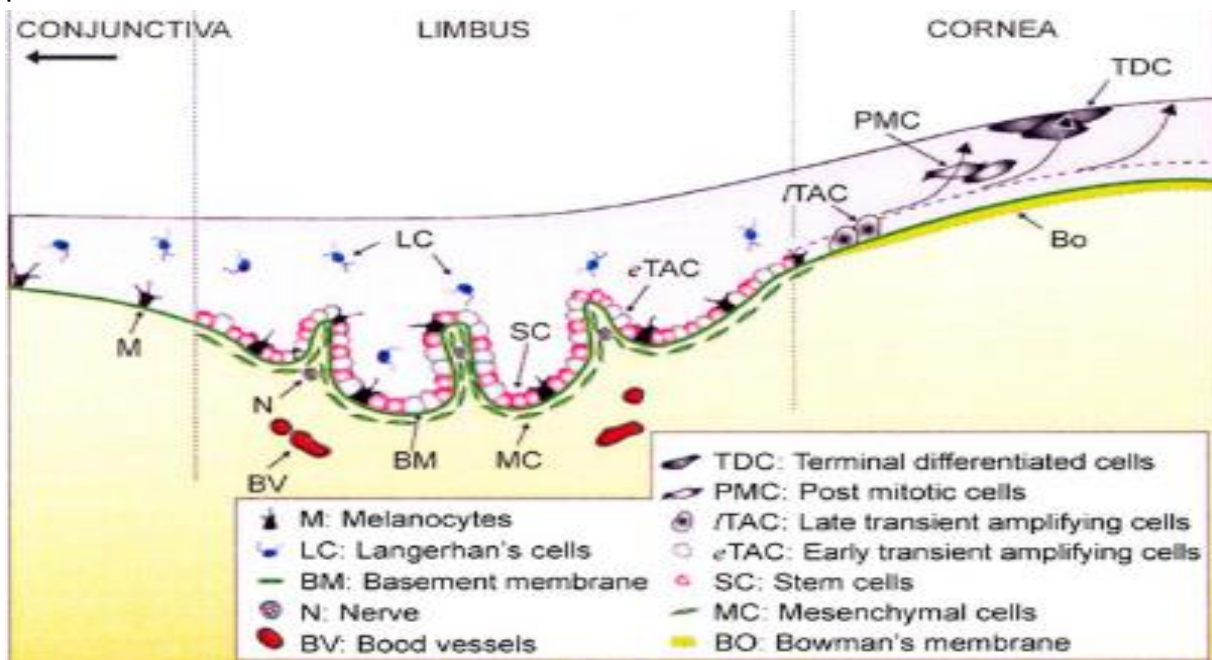


Figura 6. Imagen de la ubicación, organización y desplazamiento de las células troncales límbicas pasando por la membrana basal migrando hacia la parte más superficial del epitelio⁽¹⁾. Iniciando un trayecto radial con la célula madre limbar (CM/SC) proveniente de la membrana basal del limbo y células mesenquimales (CMLs); Derivadas de la célula madre, las células amplificadoras transitorias (CATs/TACs) en el trayecto limbar – precorneal son CATs tempranas y a partir de la córnea son CATs tardías, estas producen células post-mitóticas (CPM/PMC) y éstas al llegar al sitio de recambio se convierten en células diferenciadas terminales (CDT/TDC)⁽⁷⁾.

La renovación del epitelio proviene del epitelio basal del limbo corneal y tiene una migración centrípeta desde el epitelio basal del limbo a posteriormente hacia la superficie para terminar descamándose en la lágrima, esta migración centrípeta es llamada “teoría de movimiento X, Y y Z de Thoft y Friend”: donde menciona que “X” es la proliferación de las células basales, “Y”, la contribución de la masa celular por el movimiento lento centrípeto de células periféricas (ocurre incluso en ausencia de un defecto central agudo) y “Z” la pérdida continua de células epiteliales de la superficie⁽²⁸⁾ (figura 7). La velocidad de migración centrípeta de 123 μm por semana y el ciclo de vida de las células epiteliales ha sido estimado en alrededor de 7 días, esto se ha interpretado como su tiempo de regeneración y recambio celular⁽⁵⁾.

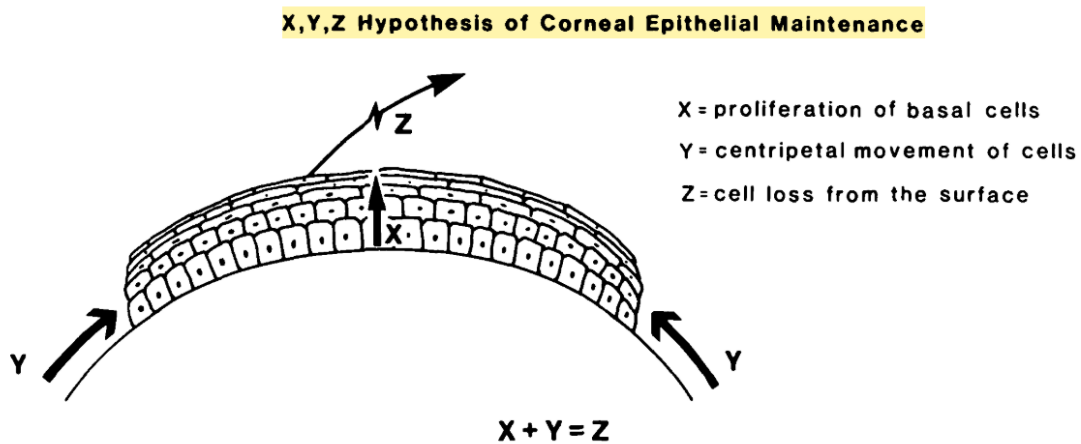


Figura 7. Movimiento de la teoría X, Y y Z⁽²⁹⁾.

La regeneración epitelial no ocurre una capa a la vez, hay un gradiente de células basales y suprabasales en direcciones opuestas que al encontrarse en el centro van formando una emergencia superficial ascendente hasta llegar a la parte más superficial⁽²¹⁾. El entorno circundante para las CMLs es fundamental para este papel de regeneración, mientras que las CATs tienen diferente entorno circundante y es el principal en decidir el destino de las células en cada región⁽⁴⁾.

En cambio, los queratocitos se originan a partir de una población migratoria de la cresta neural y sus propiedades regenerativas podrían atribuirse a sus propiedades similares al tallo retenidas de su célula origen, se produce mitosis de las células adyacentes, que reemplazan a las células y no se produce una respuesta adicional. En casos donde se ha raspado el epitelio exponiendo la membrana basal, los queratocitos que se encuentran debajo de la membrana basal sufren apoptosis para prevenir la aparición de una respuesta inflamatoria que puede comprometer la transparencia de la córnea, lo que protege eficazmente a la córnea de autolesiones⁽²⁹⁾.

2.2. Enfermedades corneales

La enfermedad o lesión corneal es la principal causa de disminución visual y ceguera funcional después de la catarata, afectando a más de 10 millones de pacientes en todo el mundo⁽³⁰⁾. La epidemiología de la enfermedad corneal es multifactorial (congénita, genética y adquirida) ya que se debe a principales y numerosas degeneraciones, distrofias, enfermedades nutricionales e infecto-inflamatorias^(4,31)

El daño de la estructura corneal dependiendo la etiología patológica puede darse en diferentes estratos, esto es definido por el tipo de daño al producir opacificación, ulceración, degradación tisular que en ocasiones conlleva a una perforación. Se muestra en el [cuadro 2](#) algunas patologías ejemplares de la descripción.

Cuadro 2. Patologías corneales que involucran una degradación tisular conduciendo una ceguera funcional.

Enfermedad	Descripción de la enfermedad	Causa etiológica / patogénesis	Tratamiento
Queratopatía bullosa pseudofáquica (QBP)	Caracterizada por un edema estromal posterior con desarrollo de micro bullas epiteliales y sub-epiteliales debido a la pérdida y descompensación endotelial que produce el trauma en córnea inducido por la cirugía de catarata (figura 8). Los pacientes presentan disminución visual, lagrimeo y dolor causado por la estimulación de abundantes terminaciones nerviosas superficiales y de estroma posterior en la modificación estructural corneal y principalmente por la ruptura de las bullas epiteliales. Similar a la distrofia endotelial de Fuchs, ya que en esta no ocurre una cirugía ⁽³²⁻³⁵⁾ .	La principal causa de la QBP es la pérdida endotelial debido al trauma quirúrgico especialmente en la cirugía de catarata en la 6ta década de los pacientes. Cuando la densidad endotelial está por debajo de 700 cels/mm ² y hay ausencia de uniones estrechas, aumenta la entrada de líquido al estroma desarrollando edema. Este proceso se ve facilitado en la parte posterior del estroma al contener gran cantidad de la molécula hidrofílica queratán sulfato. Otros factores en el proceso de facoemulsificación están involucrados, como el aumento de temperatura que puede conducir a un daño térmico; daño endotelial por el flujo turbulento de alta tasa de irrigación y aspiración; y la duración del procedimiento es de suma importancia porque la energía del ultrasonido está asociada a la producción de radicales libres, cuales son especies reactivos de uno o más electrones desapareados en sus órbitas externas que pueden dañar el endotelio corneal por estrés oxidativo ⁽³⁵⁾ .	El tratamiento clínico para el edema corneal debe ser basado en uso de agentes hipertónicos tópicos como cloruro de sodio al 5%, anti-inflamatorios, uso concomitante de L-cisteína sistémica (como un substrato regulador de metaloproteínas que degradan proteínas MEC), anti-glaucomatosos tópicos o sistémicos (porque al aumentar la presión intraocular (PIO) puede comprometer la función endotelial), corticoesteroides, lubricantes y en ocasiones dependiendo del dolor que experimente el paciente, lente de contacto terapéutico para mejorar la sintomatología. Los procedimientos quirúrgicos engloban: el tratamiento “ <i>gold standar</i> ”, el trasplante corneal, ya que la QBP es la segunda causa de trasplante corneal en México; de colgajos conjuntivales, entrecruzamiento o reticulación de colágeno, membrana amniótica y la queratotomía fototerapéutica ^(35,36) .
Queratopatía en banda (QB)	Es una condición degenerativa caracterizada por	La deposición de calcio ocurre en la capa de Bowman y en las lamelas más superficiales de	El objetivo del tratamiento es remover las opacidades de calcio restaurando una

	<p>depósitos de calcio que produce opacidades grisáceas o blanqueas en las capas superficiales de la córnea, frecuentemente en la zona interpalpebral, de exposición (figura 9). Esta acumulación de calcio puede alterar la superficie ocular causando irritación, fotofobia, o recurrentes erosiones corneales: cuando las opacidades se extienden sobre el eje visual, dan como resultado deslumbramiento significativo y una disminución visual⁽³⁷⁾.</p>	<p>estroma dejando claro el resto de la córnea. La deposición de calcio en la M. de Bowman ocurre por dos circunstancias, calcificación distrófica y calcificación metastásica. Esta patología está asociada a una variedad de condiciones oculares, la más común es la inflamación crónica y ojo seco; así como, condiciones sistémicas, entre la más común es la hipercalcemia e inflamaciones crónicas. En las condiciones de ojo seco involucra cambios de pH y osmolaridad de la lágrima, liberación de dióxido de carbono, aumento en la concentración de calcio y fosfato; mientras que en las reacciones inflamatorias se ha notado condiciones crónicas oculares y sistémicas; como es la uveítis crónica o artritis juvenil idiopática, úlceras corneales, quemaduras químicas y físicas después de múltiples cirugías oculares⁽³⁷⁻³⁹⁾.</p>	<p>superficie corneal lisa. Para eso, se emplean varias modalidades de tratamiento, empezando por el más popular, la debridación mecánica; el ácido etilendiamino-tetracético (AET o EDTA por sus siglas en inglés ethylenediamine tetraacetic acid) (figura 9); quelación; y la queratotomía fototerapéutica, entre otros^(37,38).</p>
<p>Ectasia corneal o trastorno ectásico.</p>	<p>Adelgazamiento o aumento en la tasa de cambio del grosor corneal desde la periferia hasta el punto más delgado, alterando la forma corneal. Se presenta de diferentes fenotipos: queratocono, queratogloblo, degeneración marginal pelúcida (DMP) y la ectasia corneal progresiva post-cirugía refractiva. En donde este conjunto recibe nombre de “trastornos de adelgazamiento” o “distrofia ectasia” y lo que distingue cada uno es la “ubicación y patrón de adelgazamiento”. El trastorno más común es el queratocono, el cual, es una deformación del ápice corneal a tipo cono, es lenta y progresiva, no inflamatoria, bilateral de inicio insidioso, asimétrica caracterizada por astigmatismo irregular (figura 10)⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.</p>	<p>De etiología es multifactorial e incluye una amplia variedad de teorías derivadas de causa genética, factores ambientales, factores biomecánicos y bioquímicos estructurales⁽⁴³⁾. Las asociaciones descritas son: síndrome de trisomía XXI (síndrome de Down), monosomía X (síndrome de Turner), alergias oculares, retinosis pigmentaria, colágenosis, atopia, trastornos de tejido conectivo (síndrome de Marfán), síndrome de Ehlers-Danlos, amaurosis congénita de Leber, aniridia, osteogénesis imperfecta, prolapso de válvula mitral, la etnia del paciente, factores mecánicos, como tallarse párpados, síndrome del párpado flácido, deficiencia de magnesio y personalidad tipo A^(40,41).</p>	<p>Parte de la prevención al desarrollo de la ectasia es necesario la orientación verbal al paciente respecto a la importancia del no tallarse los párpados. Como tratamiento no invasivo el uso de anti-alérgicos como lubricantes tópicos por prevención y en caso de una irritación ocular. Lente de contacto rígido gas permeable y sus alternativas, en caso de una visión insatisfactoria con lentes convencionales. En caso de hidrops agudo se debe utilizar la inyección de gas intracameral antes de una queratoplastia. En los manejos quirúrgicos más comunes, se utiliza el entrecruzamiento de colágeno o <i>cross-linking</i>, la queratoplastia lamelar anterior descemética profunda cuando no hay hidrops o en su caso la queratoplastia penetrante^(40,43-45).</p>

<p>Queratopatía ulcerativa periférica (QUP)</p>	<p>Adelgazamiento y destrucción periférica de aprox. 3 mm de largo en la región limbar en estroma corneal, combinado con un defecto epitelial causado por la liberación de mediadores proinflamatorios de una vasculitis limbar, que puede conducir a una queratólisis estromal, esto a una severa pérdida visual y finaliza con endoftalmitis que puede ser causa de una evisceración^(46,47).</p>	<p>Relacionado a la artritis reumatoide (AR) o vasculitis reumatoide sistémica (VRS), Lupus eritematoso (LE) entre otros⁽⁴⁸⁾. La enfermedad se desarrolla por la vascularización periférica corneal donde transitan complejos inmunes circundantes con citocinas en las redes capilares que reaccionan por la expresión el antígeno leucocitario humano DR (HLA-DR) de fibroblastos y macrófagos facilitando la estimulación antigénica directa y o la producción de los mediadores inflamatorios locales en la matriz corneal⁽⁴⁷⁾.</p>	<p>El manejo de una perforación corneal en estos pacientes puede involucrar procedimientos quirúrgicos, involucrando pegamiento corneal, colgajo conjuntival, injerto de membrana amniótica, o trasplante corneal, vendaje con lente de contacto terapéutico y su respectiva terapia médica incluyendo esteroides, inmunosupresores, lubricantes y antibióticos orales y tópicos⁽⁴⁸⁾.</p>
<p>Queratopatía neurotrófica (QN)</p>	<p>Es una enfermedad degenerativa del epitelio corneal resultante de la inervación deteriorada del nervio trigémino corneal. Se acompaña de una reducción en la sensibilidad o completa anestesia corneal que puede conducir a una queratopatía; rompimiento epitelial, ulceración estromal, infección, degradación y perforación secundaria a mala cicatrización. Puede ser leve (cambio epiteliales y en la película lagrimal, moderado (defecto corneal no cicatrizante) o severo (degradación y perforación del estroma) (figura 11)⁽⁴⁹⁾.</p>	<p>Una persistente alteración de la sensación inervada que interfiere en la función de fibras postganglionares que pueden causar pérdida de la función trófica y un consecuente rompimiento epitelial expone al estroma haciendo susceptible una degradación enzimática⁽⁵⁰⁾. Las causas más comunes de la QN son por infecciones corneales por herpes, quemadura química o térmica de superficie ocular, mal uso de lentes de contacto y neurocirugía craneal, inclusive hay una relación con las condiciones sistémicas ya que pueden afectar crónicamente el funcionamiento de los nervios corneales induciendo QN. Muchas teorías han sido propuestas para explicar la patogénesis, incluyendo la disminución de la secreción lagrimal ya que la secreción lagrimal depende del estímulo nervioso⁽⁵¹⁾.</p>	<p>El manejo médico es con agentes lubricantes de lágrimas artificiales de suero autólogo o gotas de plasma, agentes anti-inflamatorios y anti-proteasas que proporcionan un alivio no específico que puede ser temporalmente. Además, lentes de contacto terapéuticos, cierre de la lesión con toxina botulínica e intervenciones quirúrgicas como tarsorrafia, colgajos conjuntivales y membrana amniótica proporcionan mayor éxito, pero frecuentemente a costa de comprometer la visión del paciente, y la cirugía corneal en una superficie ocular seca con sensación reducida tiene un alto riesgo de rechazo el injerto⁽⁴⁹⁾.</p>
<p>Dellen corneal</p>	<p>Se caracteriza por un adelgazamiento corneal con excavación en forma de plato elíptico profundo adyacente a la elevación limbar, frecuentemente mayor visto en la región temporal, limbar (figura 12)^(52,53).</p>	<p>Dellen es el resultado una deshidratación tópica estromal causada por una dispersión o interrupción de la película lagrimal sobre un área focalizada en córnea^(52,54). Dellen corneal se ha reportado por el uso crónico de lentes de contacto como una complicación postoperatoria que produce una distribución irregular de la película lagrimal cómo es: la resección de pterigión, filtración de blebs grande, dermoides, angioma, pinguécula gruesa, lagofthalmos paralítico, escleritis, epiescleritis, cicatrices después de una cirugía</p>	<p>Cuando la causa es por es por sobreuso de lentes de contacto blandos el tratamiento es la suspensión inmediata del uso de lentes de contacto y terapia con lubricante tópico^(52,53). Cuando la causa es ajena a la anterior, es recomendado utilizar un lente de contacto de diámetro amplio (18 mm) para tapar la zona de adelgazamiento del espesor (figura 12), en algunos casos el tratamiento es una queratoplastia penetrante</p>

		muscular extraocular, cirugía de catarata y glaucoma o inclusive una severa quemosis conjuntival ⁽⁵⁵⁾ .	en la zona de adelgazamiento ⁽⁵⁴⁾ .
Erosión y ulceración corneal superficial	Depresión, erosión y ulceración corneal en estratos anteriores a estroma intermedio ^(56,57) . Úlcera corneal superficial se deriva por una ruptura, discontinuidad o pérdida epitelial en la córnea que conduce a una exposición de la subcapa, (estroma corneal) resulta una úlcera corneal. Úlcera estromal es notado como un defecto visible en córnea ⁽⁵⁸⁾ .	Frecuentemente por traumatismo corneal, pero de igual manera otras etiologías tales como: queratoconjuntivitis sicca, deformidades del párpado, cilio ectópicos, distiquiasis, baja producción lagrimal, lagofthalmos, infección viral como virus del herpes, cuerpos extraños, relacionados a un trauma, avitaminosis A y quemaduras químicas (figura 13-a) y en la mayoría de los casos puede acompañarse de uveítis ^(57,58) .	Terapia basada en un amplio espectro de antibióticos (incluidos tetraciclina o una combinación de neomicina, polimixina B y bacitracina), tópicos en ungüentos o solución administrada con continuas aplicaciones para prevenir infecciones oportunistas. Si la pupila está miótica, atropina tópica es recomendada a efecto de dilatación. Corticoesteroides tópicos son contraindicados en casos de úlcera corneal porque ellos decrecen la epitelización y pueden potencializar una infección y queratomalacia por collagenasa y proteasas en la MEC que eliminan restos celulares y extracelulares en tejido dañado ⁽⁵⁶⁾ . Mientras estos casos son extremadamente dolorosos y frecuentemente se presentan como emergencias, estas no son tratadas o consideradas como tratamiento visual ⁽⁵⁸⁾ .
Ulceración corneal profunda complicada o melting corneal.	Úlceras corneales en el estroma profundo interpretado como queratomalacia (derretimiento, en inglés, corneal melting) o úlceras con infiltrado celular. Los infiltrados celulares en córnea aparecen como áreas amarillas que son más opacas que un edema corneal y el riesgo de una perforación corneal es mucho más probable que otro tipo de úlceras en córnea (figura 13-b) ⁽⁵⁷⁾ .	Esto se debe cuando el balance de las proteasas, proteinasas o endopeptidasas corneales e inhibidores de proteasas es interrumpido, genera la degradación patológica de colágena estromal y proteoglucanos por las proteinasas. Las proteasas son secretadas por células inflamatorias y corneales, mientras proteasas exógenas son producidas por organismos infecciosos. Las serina proteinasas y las metaloproteinasas de matriz (MMP) 2 y 9 son de mayor importancia, MMP-2 es importante en el recambio normal de fibras de colágena corneal, mientras que MMP-9 aumenta después de una lesión corneal.	Estas úlceras corneales profundas en la queratomalacia requieren tratamiento agresivo seleccionado después de los resultados de una cultivo bacteriano aerobio (terapia triple con antibióticos tópicos con intervalos de 5 minutos entre ellos), antibióticos sistémicos en caso de profilaxis a endoftalmitis, atropina 1% tópica, antiproteasas e inhibidores de MMP, terapia de inhibidora de anticollagenasa puede ser benéfico en el curso temprano del tratamiento, suero o acetil cisteína 10% (mucomyst) y posiblemente terapia quirúrgica o referencia rápida ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾ .

		<p>La elastasa de neutrófilos es la serina proteasa más abundante y sirve para degradar la colágena, la laminina y la fibronectina. Los inhibidores naturales de la proteinasa de la película lagrimal precorneal y la córnea incluyen la anti-tripsina $\alpha 1$, la macroglobulina $\alpha 2$ y los inhibidores tisulares de MMP1⁽⁵⁸⁾.</p> <p>Es secundaria a un trauma o progreso de infección. Puede ser factor de riesgo etiológico anormalidades en las pestañas, inadecuada producción de lágrimas y por la conformación y función del parpadeo^(56,57).</p>	
Descematocele	<p>El término se usa para describir una úlcera corneal profunda a la profundidad de la membrana de Descemet. Cuando la úlcera ha alcanzado esta profundidad genera una protuberancia de la membrana a través del piso de la úlcera por la presión del humor acuoso detrás de ella. En esta patología queda poco tejido corneal, la cámara anterior puede ser visible, cuál está 3 a 12 μm de espesor y está sujeta a la perforación con o sin prolapsos del iris, es una secuela muy común (figura 13-c)^(57,58).</p>	<p>Puede compartir mismas etiologías como una úlcera superficial o profunda ya que esta patología está asociada al desarrollo o etapa avanzada de las anteriores cuando no ha podido frenar la causa.</p>	<p>Esta condición grave requiere inmediata hospitalización para alivio quirúrgico (colgajo conjuntival, transposición corneoescleral o injerto corneal fresco, congelado o sintético y agresiva terapia médica siguiendo el esquema de tratamiento como el de úlceras complicadas. Sí el descematocele es pequeño puede cerrar con una sutura de poliglactina 910 de 7-0 a 8-0, esto rara vez es posible, ya que la córnea circundante con frecuencia como para sostener suturas y puede provocar una disminución de la visión por el astigmatismo inducido por la sutura⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾.</p>
Traumatismo o laceración corneal	<p>Laceración corneal superficial o en un estrato profundo que suele acompañarse de afectación de otro tejido adyacente a la córnea. La córnea puede ser reparada pero la prognosis de la visión es dependiente si otras estructuras fueron dañadas durante la lesión⁽⁵⁷⁾.</p>	<p>Puede ocurrir por un trauma agudo o contuso en el tejido corneal o adyacente a él⁽⁵⁷⁾.</p>	<p>Cierre quirúrgico por suturas es indicado si la laceración corneal es más grande que la mitad del espesor corneal o si la córnea fue perforada. Tratamiento con antibiótico intravenosos en los casos referidos y los ungüentos oculares no deben usarse si existe una herida corneal patente, ya que la base de vaselina del ungüento puede causar una uveítis anterior severa⁽⁵⁷⁾.</p>

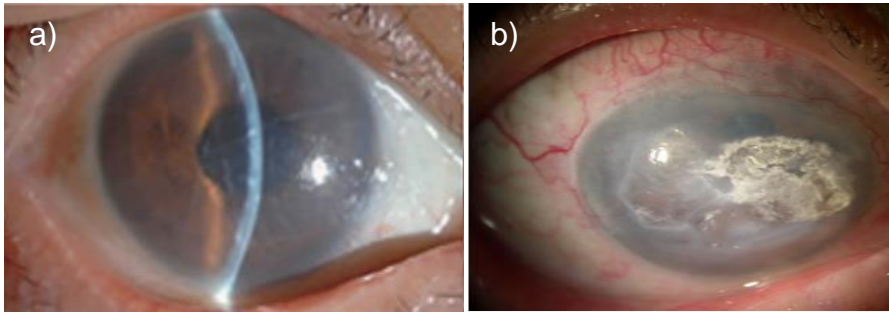


Figura 8. Queratopatía bullosa. Imagen a), muestra una queratopatía bullosa inicial después del procedimiento de facoemulsificación, se puede observar una sección óptica ligeramente difusa por el edema corneal moderado con estrías en la membrana de Descemet. En la imagen b), se muestra una fase avanzada de la queratopatía bullosa con evidencia de una membrana retroquerática fibrosa con completa distrofia endotelial, macro bullas epiteliales y neovascularización periférica^(60,61).

En la imagen b), se muestra una fase avanzada de la queratopatía bullosa con evidencia de una membrana retroquerática fibrosa con completa distrofia endotelial, macro bullas epiteliales y neovascularización periférica^(60,61).

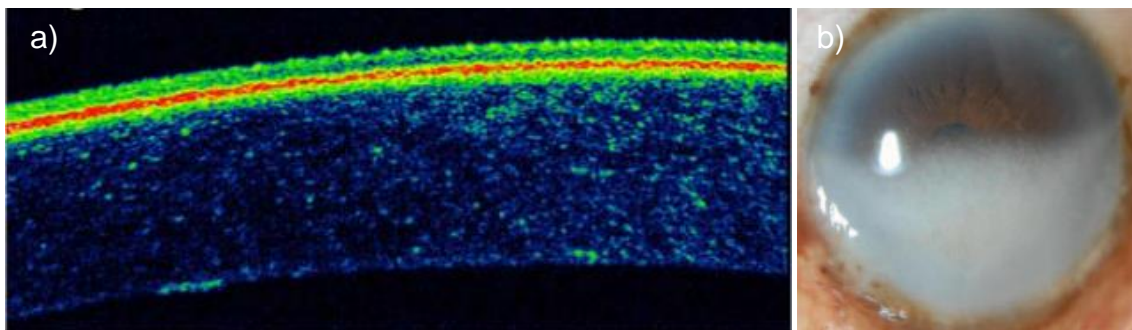


Figura 9. Queratopatía en banda. Imagen a), muestra una tomografía de coherencia óptica anterior con hiperreflectividad por calcificación en la membrana de Bowman, observándose como una línea naranja seguido del epitelio⁽³⁸⁾; y en la imagen b), se observa la córnea con queratopatía en banda en los dos tercios corneales inferiores⁽³⁷⁾.

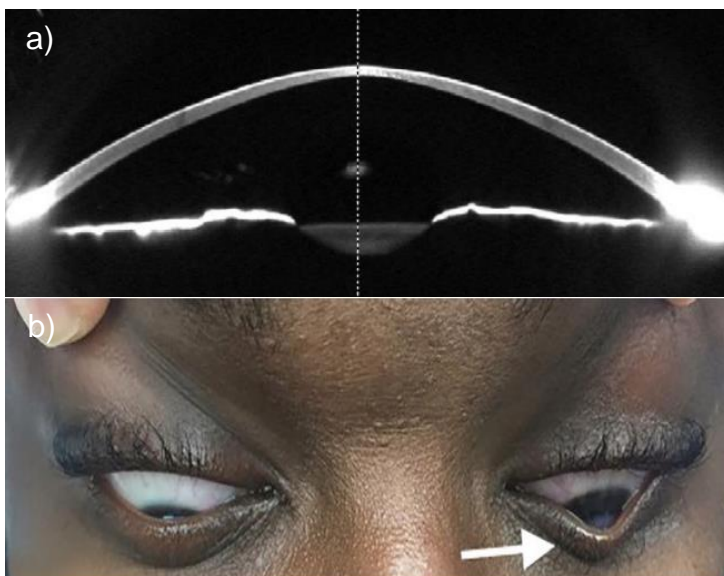


Figura 10. Queratocono. La imagen superior fue tomada por el instrumento Pentacam identificando la severidad y progresión basados en el cambio del volumen corneal y de la cámara anterior. En la imagen a). muestra un adelgazamiento corneal significativamente en el centro de la córnea⁽⁶²⁾. La imagen b), inferior, muestra un signo de Munson positivo. Nótese la protuberancia en V del párpado inferior izquierdo cuando el paciente mira hacia abajo⁽⁶³⁾.

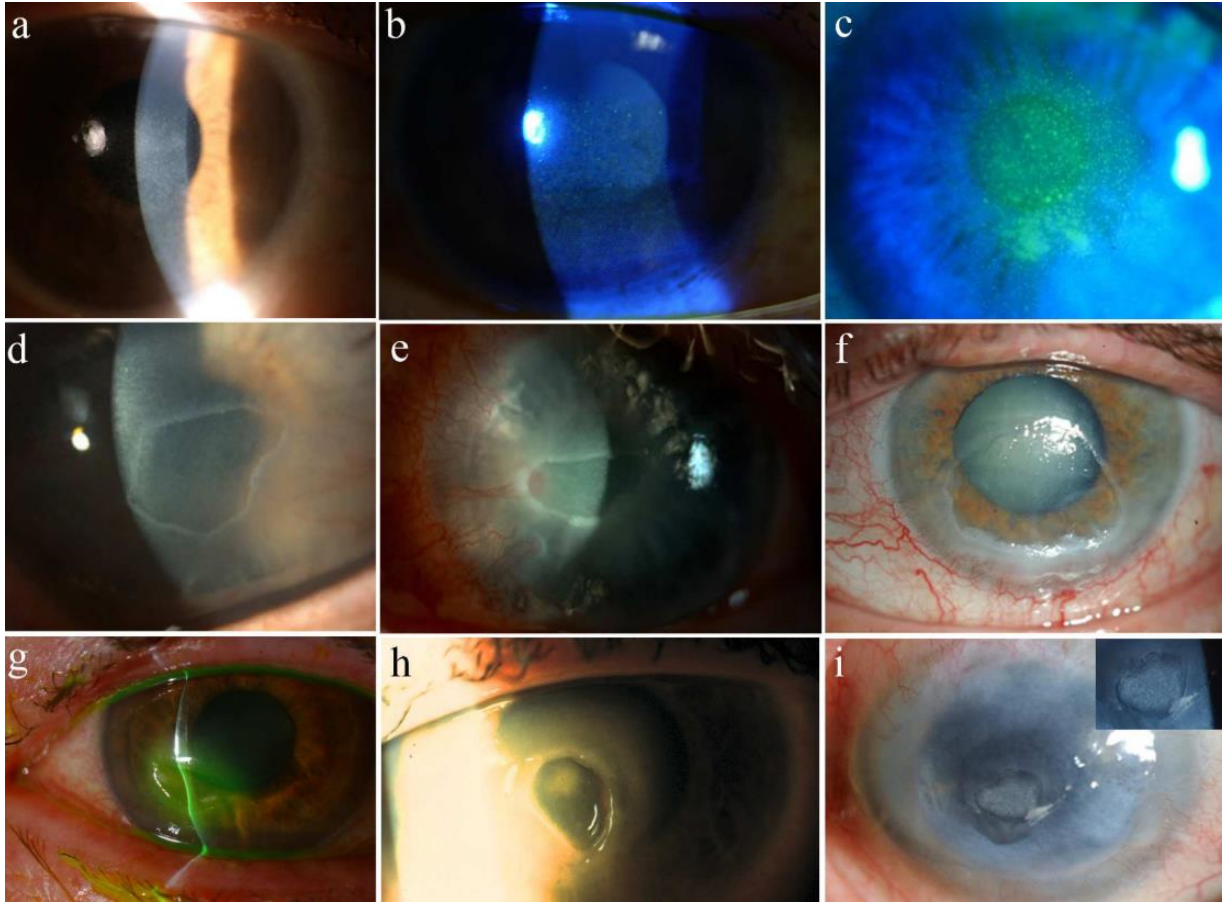


Figura 11. Grados/etapas de queratitis neurotrófica (QN). a) Lámpara de hendidura haz amplio muestra lesiones punteadas confluentes centrales que dan aspecto opaco después de una queratotomía fotorrefractiva (síndrome de la superficie ocular, SSO); b) La misma córnea teñida con fluoresceína muestra que la mayoría de las lesiones toman manchas resaltando la queratopatía; c) SSO después de la queratomileusis in situ con láser. Tinción por fluoresceína en la córnea se muestra gruesa, centralmente localizada, queratitis casi confluyente. a-c) representan el grado 1 de QN. d) el centro corneal muestra un haze difuso (nebulosidad) con un defecto epitelial amplio; e) La córnea central está nublada/opaca con un defecto epitelial con capilares vasculares superficiales y profundos; f) Hay un defecto epitelial amplio con un estroma relativamente claro. d-f) representan grado 2 de QN. Los márgenes blancos y enrollados de los defectos son un signo típico de un defecto epitelial no cicatrizante. g) Hendidura que muestra fusión del estroma con media profundidad en un caso de queratitis por herpes zoster; h) Ulceración en estroma profundo en un niño con anestesia corneal; i) Una úlcera grande en el caso de una queratitis por acanthamoeba tratada que muestra la rugosidad del estroma, sobre el cual el epitelio no migra a la zona de lesión. Se toma en cuenta la ausencia de la vascularización corneal. g-i) representan el grado 3 de QN⁽⁴⁹⁾.

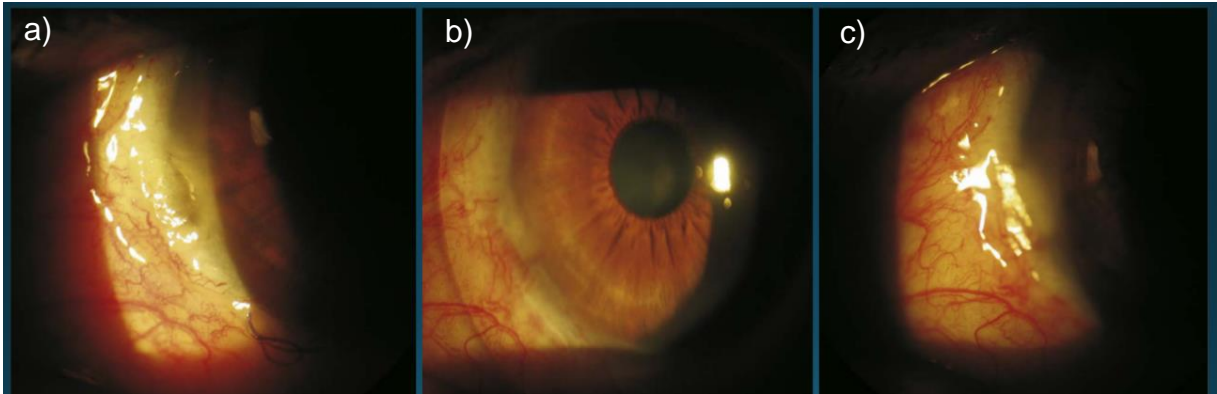


Figura 12. Dellen corneal a) Adelgazamiento corneal nasalizado en el limbo, consecuencia de postquirúrgica de pterigión; b) Dellen corneal después de un día de uso de lente de contacto de diámetro amplio, mostrando significativa mejoría del espesor corneal; c) después de la extracción de lente de contacto que muestra resección del adelgazamiento corneal⁽⁵⁴⁾.

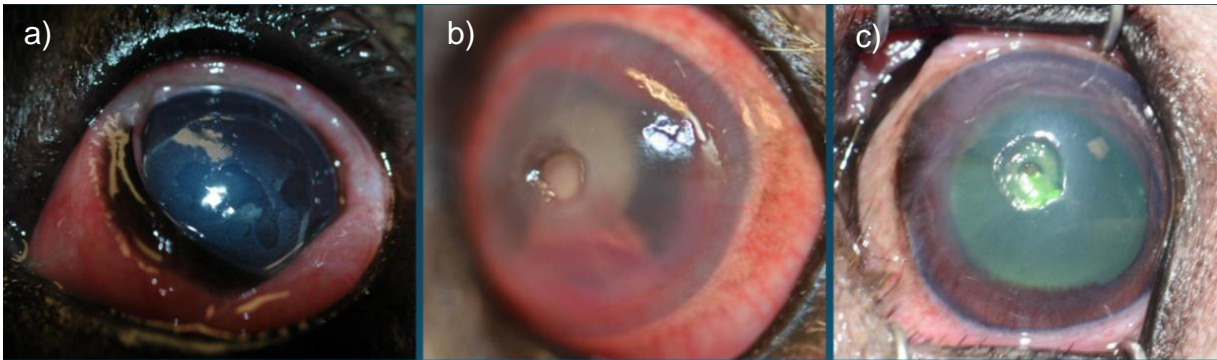


Figura 13. Úlcera corneal. a) Úlcera superficial grande en canino causado por una quemadura química por explosión de una batería; b) Una úlcera estromal profunda, denota una significativa inflamación en la cámara anterior junto con la vascularización de 360° grados de la córnea; c) Descematocele, defecto claro en el centro del área de la úlcera⁽⁵⁸⁾.

La mayoría de las enfermedades o lesiones corneales son el resultado de algunos cambios en la forma, estructura y espesor que disrumpe el ordenamiento de las fibras de colágena causado por una cicatrización o proceso infecto-inflamatorio lo cual es altamente significativo más que en otro tejido porque está directamente asociado con la transparencia del tejido y pueden conducir a opacidades permanentes y estas a la disminución de agudeza visual^(4,64,65).

2.3. Tratamientos de reemplazo

El trasplante corneal es una de las técnicas quirúrgicas más antiguas de la oftalmología y ha sido el principal método para la rehabilitación visual más eficiente cuando una enfermedad ha afectado la claridad corneal. Consiste en la sustitución de una córnea enferma por una sana⁽⁶⁶⁾. La etiología de la enfermedad corneal, la prognosis del injerto después de la cirugía, la edad del paciente, el estado físico del paciente y por la presencia de otro factor médico o comorbilidad ocular, son factores considerados para optar a tratarse con un trasplante con un diferentes tipo⁽⁶⁷⁾.

Trasplante corneal o queratoplastia penetrante (de espesor total) (QP) es un procedimiento que consiste en un reemplazo corneal con 5 capas de espesor completo y ha sido el procedimiento dominante, más común y exitoso mundialmente para tratar la ceguera corneal. Es recomendable para el tratamiento en cicatrices del estroma profundo en ausencia de inflamación (hidrops en queratocono, trauma e infección severa profunda), solamente su uso es limitado cuando el beneficio comparado con la queratoplastia lamelar anterior o queratoplastia endotelial proporciona mejor resultado óptico o terapéutico(figura 14)⁽⁶⁸⁾.

Queratoplastia lamelar selectiva (de espesor parcial) (QLS) es ahora el procedimiento de elección por muchos especialistas ya que puede extraer la capa delantera o la capa intermedia mientras que las capas posteriores se mantienen preservadas, esta incluye:

a) Queratoplastia lamelar anterior (QLA). Con una gran ventaja este tipo de cirugía da como resultado la retención del endotelio sano no afectado reemplazando el epitelio y el estroma corneal variando la cantidad del estroma reemplazado.

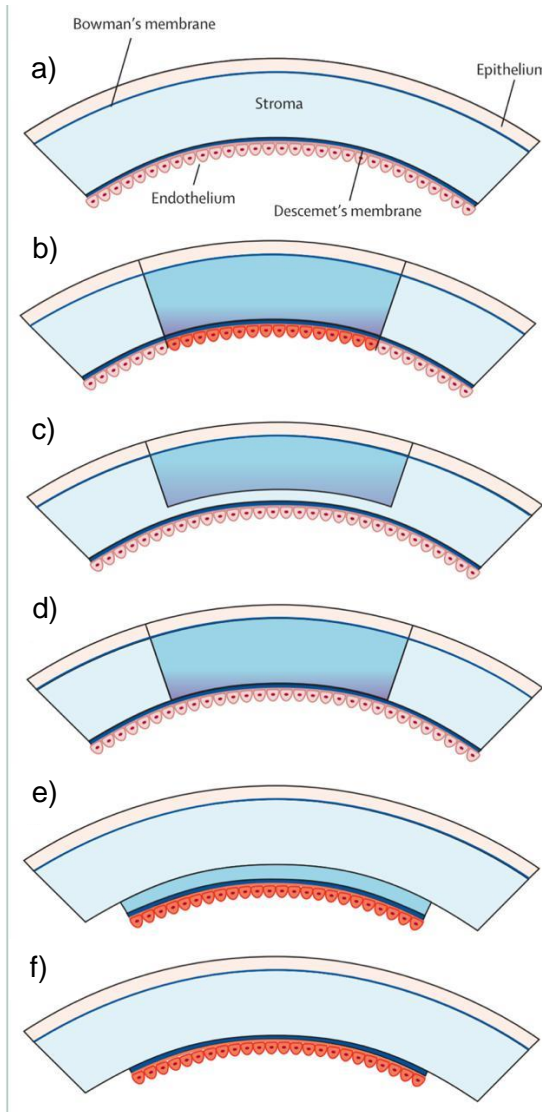
b) Queratoplastia lamelar anterior profunda (QLAP), reemplaza la queratoplastia penetrante por desórdenes que afectan las capas del estroma profundo, remueve casi todo el estroma teniendo un mejor beneficio y un riesgo reducido a un rechazo endotelial comparado con la queratoplastia penetrante.

Trasplante de endotelio o queratoplastia endotelial (QE), es la técnica preferente para tratar las enfermedades endoteliales reemplazando el endotelio corneal. Esta técnica ha reemplazado la QP con modernas técnicas y nuevas variaciones en la queratoplastia endotelial(68,69) :

Queratoplastia endotelial automatizada con pelado de membrana de Descemet (QEAPD /DSAEK o DSEK). Se trasplanta un lentículo de estroma posterior junto con la membrana de Descemet y su endotelio, recibe el nombre de automatizada por que el lentículo se obtiene a través de un corte “cap” (retirando las capas anteriores) sobre la córnea del donante con un microqueratomo específico (ahí mismo el término automatizada).

Queratoplastia endotelial de membrana de Descemet (QEMD / DMEK) se trasplanta exclusivamente la membrana de Descemet con su endotelio y se disecciona de forma manual.

Figura 14. Tratamiento de queratoplastias. a) Córnea de espesor completo; b) QP; c) QLA; d) QLP; e) QEAPD; f) QE⁽⁶⁸⁾.



Mucho del éxito del tipo de queratoplastia es gracias a un fenómeno conocido como privilegio inmune ocular: el material alogénico es tolerado en la cámara anterior del ojo mientras es rechazado en casi toda locación del cuerpo por ser considerado ajeno al mismo. Este privilegio inmune en los trasplantes corneales reduce la incidencia y tiempo en un rechazo comparado a otros trasplantes de órganos⁽⁷⁰⁾.

El privilegio inmune se atribuye a prevenir la inducción y expresión de aloinmunidad por medio de varias condiciones, entre las principales: a) la localización del globo ocular detrás de la barrera hemato-retiniana, b) el bloqueo o supresión humoral de elementos efectores la inducción de la respuesta inmune, y c) la desviación de respuesta inmune asociada a la cámara anterior (por sus siglas en inglés, anterior chamber-associated immune deviation, ACAID, por sus siglas en inglés). Esta respuesta es mantenida por células presentadoras de antígeno y antígeno

específico que migran del ojo e inducen células T reguladoras específicas que suprimen sistemáticamente el rechazo del injerto^(70,71).

Se ha reportado que el rechazo corneal es derivado a un proceso inmune celular directo involucrando linfocitos CD4+ T *helper* y linfocitos CD8+ citotóxicos contra las moléculas expresadas de los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH o *MHC Histocompatibility Major Complex*, por sus siglas en inglés) tipo I no coincidente presente en las células epiteliales, endoteliales y principalmente en los queratocitos del tejido donado. Posteriormente en la vascularización del injerto puede encontrarse infiltrados de una población mezclada de leucocitos incluyendo leucocitos

polimorfonucleares, linfocitos, macrófagos y células de Langerhans migrando centripetamente dentro del injerto⁽⁷²⁾.

Estos rechazos suelen presentar una inflamación crónica y aumentar 1.18°C en su temperatura (36.73°C teniendo una temperatura control de 35.55°C) en comparación a un ojo no operado y puede demostrarse con pruebas con termografía infrarroja (figura 15)⁽⁷³⁾.

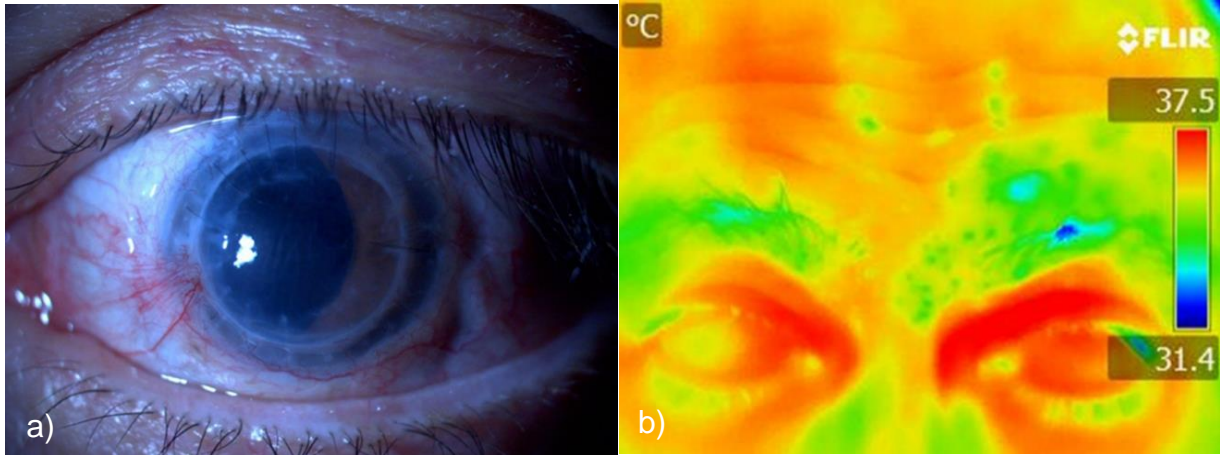


Figura 15. a) se muestra un injerto corneal con áreas de rechazo endotelial por lámpara de hendidura con inicio de vascularización en el limbo del trasplante y opacificación delimitada por el diámetro corneal. b) Demuestra incremento de temperatura en el ojo izquierdo con rechazo de injerto endotelial en el trasplante corneal de ojo izquierdo⁽⁷³⁾.

Previo al trasplante se identifica factores de riesgo de rechazo corneal como edad, vascularización corneal, cirugías oculares etc. Y no todos los trasplantes se realizan con la misma finalidad o indicación de trasplante corneal⁽⁷⁴⁾, como son:

1. Tectónica: basada en causas principales de perforación del globo ocular. Infecciones corneales severas, los traumatismos, las enfermedades reumáticas y el queratocono avanzado.
2. Clínicas: constituyen el grupo más frecuente y en 1994 en EBAA (Eye Association of America) estableció 16 indicaciones para clasificarlas: el edema corneal pseudoafáquico, el edema corneal afáquico, la distrofia corneal estromal, las endoteliopatías corneales primarias, los adelgazamientos/ectasias, las opacidades congénitas, las queratitis virales, las queratitis bacterianas, las queratitis asociadas a espiroquetas, la queratitis ulcerativa no infecciosa, entre otras.
3. Ópticas: con el objetivo de mejorar la agudeza visual abarcan las cirugías refractivas previas y el trasplante previo con alta ametropía.
4. Cosméticas: en donde no hay pronóstico visual tratándose de córneas blancas, con la principal indicación más teórica que práctica.

Por otro lado, Verdiguél y et. al⁽⁷⁴⁾. clasificaron que el trasplante de córnea tiene diferente categoría pronóstica como lo muestra la [figura 16](#), ya que la tasa de éxito del trasplante corneal varía de acuerdo a la enfermedad por la cual se realiza.

Reportes clínicos en hospitales han mostrado una estadística de rechazo corneal y cada uno menciona una tasa de rechazo en pacientes operados por queratoplastia penetrante; en el 2009, el Hospital Juárez obtiene la incidencia de rechazo a trasplante corneal con un 50% de 102 ojos, en el cual algunos pacientes experimentan remitencia del rechazo y recuperan transparencia, obteniendo un valor final del 22.5%⁽⁷⁵⁾, consecutivamente, en el 2012 se reportó en el hospital infantil de México Federico Gómez, 49 queratoplastias penetrantes pacientes pediátricos en el que 22 pacientes tuvieron rechazo al injerto (40%)⁽⁷⁶⁾, por otro lado, se reportó en el hospital de oftalmología del centro médico nacional siglo XXI del IMSS en el 2013, el 35.3% de rechazo en 150 pacientes que fueron sometidos a queratoplastia⁽⁷⁷⁾. En ese mismo año en el hospital general Dr. Miguel Silva de la ciudad de Morelia, incluyó en un estudio estadístico de cohorte histórica 128 pacientes sometidos a cirugía de queratoplastia donde el 28.1% presentó rechazo corneal⁽⁷⁸⁾. Sin embargo, un estudio transversal en 539 pacientes realizado en el centro médico La Raza en 2014 reporta un valor menor a los anteriores de 12% en rechazo corneal⁽⁷⁴⁾.

Grupo	Diagnóstico	Morfología	Pronóstico
1	Queratocono central o paracentral, cicatriz inactiva o granular, distrofia central de Fuchs, rechazo a injerto temprano	Adelgazamiento corneal avascular central, cicatrices, o edema alrededor de un área de tejido sano	Excelente (90 % o mejor)
2	Distrofia de Fuchs avanzada, queratopatía bulosa por pseudofaquia, queratopatía bulosa por afaquia, queratitis por herpes simple inactivo, síndromes endoteliales intersticiales, distrofia, queratitis macular	Lesiones que se extienden totalmente o parcialmente a la periferia con una adecuada superficie y vascularización de media a moderada	Muy bueno (entre 80 y 90 %)
3	Queratitis bacteriana activa, queratitis por herpes simple activo, distrofias congénitas endoteliales hereditarias, queratitis fúngica activa, quemaduras químicas de leves a moderadas, queratitis sicca	Adelgazamiento corneal extremo, perforaciones, descematoceles periféricos, enfermedades activas	Bueno (entre 50 y 80 %)
4	Quemaduras químicas severas, quemaduras oculares por radiación, pénfigo, síndrome de Stevens-Johnson, enfermedad neuoparalítica congénita, glaucoma epitelial, síndromes de clivaje, múltiples fallas ante los injertos	Tejido fibrovascular severo de córnea y conjuntivo por isquemia, obliteración de la cámara anterior	Pobre (entre 0 y 50 %)

Figura 16. Grupos de pronósticos en trasplante de córnea⁽⁷⁴⁾.

Actualmente más de 10 millones de personas tienen ceguera monocular, los bancos de ojos no pueden solventar la demanda mundial ya que el incremento de la necesidad es de 1 a 2 millones de individuos anualmente⁽⁴⁵⁾. Por esa razón, actualmente hay una lista de espera para trasplante corneal de aproximadamente 12.7 millones de personas en la mayoría de los países desarrollados y subdesarrollados⁽⁶²⁾. En México, el centro

nacional de trasplantes (CENATRA) menciona que en el año 2011 al 2017, la tasa de pacientes en espera de una córnea para trasplante es de $7,318 \pm 167$ con una media de 7,301. En el 2018 la córnea ha sido el segundo órgano más solicitado después del riñón, con 6,445 pacientes en espera, donde 4,269 pacientes obtuvieron trasplante de córnea y 2,176 pacientes permanecieron con ceguera corneal y en el año 2019, la solicitud para trasplante permaneció en 5,424 córneas, se trasplantaron 3,766 y permanecen en lista de espera 1,658 pacientes^(36,81-83).

Ante estas dos limitantes, la investigación ha tratado de resolver esta demanda de rechazo y solicitud por un sustituto corneal. Un ejemplo claro es la queratoprótesis que es utilizada cuando en múltiples trasplantes corneales han sido rechazados o en enfermedades de la superficie ocular por el cual el trasplante corneal puede fallar⁽⁶⁸⁾. Está conformada por un polímero de polimetilmetacrilato (Boston tipo 1) para tratar múltiples enfermedades corneales, sin embargo, a largo plazo, la prognosis visual es limitada por diferentes complicaciones como glaucoma post-quirúrgico que pueden desarrollar, membrana retroprotética y endoftalmitis⁽⁸⁴⁾.

Debido a los rechazos corneales de queratoplastia por el reconocimiento de antígenos del CMH tipo 1, las complicaciones de la queratoprótesis y la actual escasez global de córnea, algunos investigadores han considerado tres enfoques que tienen potencial en el mejor de los casos para las enfermedades corneales: femtosecond laser, manipulación de células endoteliales como una alternativa de trasplante y la ingeniería tisular^(68,85). Ante esta situación la ingeniería tisular y medicina regenerativa llega a ser un enfoque de atención pública y mantiene una promesa considerable para solventar la escasez de donadores de injertos mediante el desarrollo de un alternativo y adecuado material de injerto⁽¹²⁾.

Jhon P. Whitcher, Priya M. Mathews y Donald T H Tan remarcan la importancia de la movilización de recursos de salud pública para programas innovadores como iniciativas globales para expandir técnicas actuales y conocimientos de impacto con el apoyo de tecnología instrumental, tratamientos médicos innovadores junto con la bioingeniería tisular para la prevención y tratamiento de la ceguera corneal^(30,67,68).

2.4. Ingeniería Tisular

En algunos casos, también es nombrada como bioingeniería de tejidos. Se define como la aplicación de los principios científicos para el diseño, construcción, modificación y regeneración de un tejido vivo con el conjunto de la práctica de combinar andamios (conducción), células (trasplante) y moléculas señalizadoras biológicamente activas (inducción) (llamada triada de la ingeniería tisular), para recopilar ideas o teorías que restauren, estabilicen, mantengan o mejoren los tejidos dañados y órganos completos^(86–89).

La ingeniería tisular es una alternativa a las limitaciones de los implantes artificiales, así como la escasez de órganos para trasplante, así mismo, han motivado el enfoque en las investigaciones para desarrollar sustitutos biológicos⁽⁹⁰⁾.

Z. Zhang *et. al.*⁽⁹¹⁾ considera que, por medio de la traducción y colaboración biomédica de varios campos como la química, la física, la ciencia de materiales, la biología y la medicina, han creado diversas innovaciones técnicas para proporcionar nuevas estrategias en la ingeniería de tejidos. Otros autores como D. Gabriel *et. al.*⁽⁹²⁾ mencionan que la ingeniería tisular se ha convertido en un enfoque interdisciplinario prometedor para hacer frente a la necesidad del reemplazo de órganos y la regeneración y que está combina los principios de ingeniería, materiales y ciencias para crear sustitutos biológicos que restauren las funciones fisiológicas.

Esta rama de la medicina ha pasado progresivamente por tres etapas: la primera se empleaban biomateriales “inertes” para usarlos como estructuras sustitutivas en algunas partes dañadas del cuerpo, la segunda se inició en aplicaciones de matrices biodegradables o “andamio biológico” para promover en un microambiente apropiado, el crecimiento y propagación *in situ* de las células residentes sanas circundantes con la finalidad de la regeneración hística y la tercera etapa nace con la aparición de la nanotecnología y su aplicación en medicina, nanomedicina⁽⁹³⁾.

2.4.1. Andamios

Los andamios son biomateriales en ingeniería tisular que son diseñados para mimetizar la estructura de la matriz extracelular de un tejido u órgano por lo cual son análogos de la matriz que se desea sustituir, por eso son de suma importancia. Estos deben ser diseñados con un ambiente que proporcione adhesión, proliferación y diferenciación celular ya que pueden afectar la respuesta de célula – MEC en el tejido huésped. Es un componente de la triada de la ingeniería tisular y pueden ser implementados en una variedad de maneras pero tienen que tener la capacidad de soportar adhesión celular (conducción) y en algunos casos proporcionar señales necesarias para el desarrollo espacial y temporal controlado de células (inducción)^(88,94).

A su vez, la mayoría de los biomateriales dependiendo su función deben satisfacer los requisitos de diseño siguientes:

- 1) Biocompatibilidad.
- 2) Conductividad para la fijación y proliferación de células comprometidas o sus progenitores y la producción de una nueva MEC.
- 3) Capacidad para incorporar factores inductivos para dirigir y mejorar el crecimiento de nuevo tejido.
- 4) Apoyo del crecimiento vascular para la oxigenación y el transporte de biomoléculas.
- 5) Integridad mecánica para soportar las cargas en la zona del implante.
- 6) Controlada y predecible velocidad de degradación no tóxica.
- 7) Procesamiento sencillo y rentable en formas irregulares 3D de tamaño suficiente para llenar defectos clínicamente relevantes.

Menciona FJ. Rodríguez *et. al.*⁽⁹⁵⁾ que el andamio ideal es el que facilita el crecimiento, la integración, diferenciación de células madre, síntesis de MEC y promover múltiples interacciones específicas entre células, por lo cual, debe ser biocompatible no solo con la zona de interacción si no con los tejidos circundantes, no tóxico y tener óptimas características físicas incluyendo sus propiedades mecánicas similares al tejido a sustituir.

Existen varios tipos de andamios entre ellos fosfatos, β -FTC, Hidroxiapatita (HA), vidrio bioactivo, polímeros etc., los cuales tienen una clasificación en naturales, sintéticos, híbridos, biodegradables o no biodegradables⁽⁹³⁾.

Centrando los polímeros de origen natural, como las proteínas y polisacáridos, se han utilizado para la regeneración del tejido con la ventaja potencial de reconocimiento biológico que podría apoyar el desarrollo celular. La colágena de origen biológico como uno de los principales componentes de algunas MEC, se ha utilizado para aplicaciones de reparación de tejidos, como vehículos de células que transportan materiales y andamios. A su vez, ofrece la química de superficie adecuado para el crecimiento y la diferenciación celular^(91,93).

2.4.2. Descelularización

Descelularización es el proceso en donde se remueve material nuclear y celular de un tejido dando como resultado un andamio con preservación de la estructura tridimensional acelular y mayormente libre de componentes inmunológicos activos. Esta estructura está compuesta por la matriz extracelular del tejido u órgano que se procesó, por lo tanto, el tejido residual proporciona una biocompatibilidad extrema por mantener proteínas esenciales y estructurales de la matriz extracelular^(85,89,96).

Menciona S. Sasaki, S. Ponce Márquez, S. Amano y M. González-Andrade *et al.*⁽⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾, que “el protocolo ideal de descelularización debe completamente remover el material celular y moléculas antígenas del xenoinjerto para disminuir una reacción inmunológica por el huésped, así, minimizando una alteración en la matriz extracelular general para apoyar el crecimiento de las células huésped y en algunos casos como en la córnea se busca mantener su transparencia”.

Peter M. Crapo⁽¹⁰¹⁾ estipula que todo tejido u órgano descelularizado necesita que el ADN residual sea mínimo para considerarse un tejido con baja o nula inmunogenicidad, para que la MEC sea injertada, esta promueva la regeneración de nuevo tejido y remodelación del andamio a través de la excreción de una matriz extracelular propia de la repoblación celular en la zona de lesión sin producir inflamación o rechazo al injerto⁽⁸⁵⁾.

“La construcción de córnea por ingeniería tisular y el procedimiento de descelularización es una oportunidad prometedora como andamio para regeneración tisular en el tratamiento de la ceguera corneal”, C Zhang *et.al.*⁽¹²⁾.

La eficiencia de la remoción celular depende del origen de un tejido y de los métodos específicos (físicos, químicos y enzimáticos) que son usados. Es importante saber que cada uno de estos tratamientos de descelularización afecta la composición bioquímica, la ultraestructura tisular y el comportamiento mecánico del andamio en su matriz extracelular restante, que a su vez afecta la respuesta del huésped al material y en cada procedimiento descelularizante, se busca minimizar la alteración a la MEC. Sin embargo, la MEC debe ser adecuadamente interrumpida durante el proceso de descelularización para permitir una adecuada exposición de todas las células a los agentes caotrópicos (sustancia que desorganiza la red tridimensional del agua como la desnaturalización de moléculas proteicas, ADN o ARN) y para proporcionar una vía en la que el material celular se elimine del tejido^(96,102).

Para fines de este proyecto se explicará los fundamentos químicos y físicos de algunos métodos de descelularización.

2.4.2.1. Fundamentos físicos

Tratamientos físicos pueden incluir el proceso de agitación, sonicación, masaje mecánico o presión, congelación y descongelación, el cual sirven para liberar y lisar contenidos celulares alterando su membrana celular y facilitar subsecuente enjuague, como remoción de contenido celular de la MEC. Estos tratamientos son generalmente insuficientes para lograr una descélularización completa y debe ser empleado con una combinación química o biológica⁽⁹⁶⁾.

2.4.2.1.1. Agitación

La agitación mecánica ha sido normalmente utilizada simultáneamente con tratamientos químicos y enzimáticos acuosos para generar lisis celular y promover la eliminación del material celular y nuclear, gracias al ingreso a la MEC producto del movimiento u oscilación del tejido tratado facilitando la exposición química. La agitación mecánica como factor físico de la descélularización puede alterar la MEC en cierto nivel. También se considera un paso ampliamente acoplado para incrementar la efectividad del proceso de descélularización, por lo tanto, la velocidad e intensidad óptima, el volumen del reactivo y la longitud de la agitación mecánica es dependiente del espesor, del volumen, densidad y de la composición del tejido^(96,101).

En la mayoría de los casos para procedimientos de descélularización la agitación mecánica se realiza con la ayuda de un agitador orbital u oscilador y su valor se define en ciclos por minuto (c.p.m.)^(98,100).

2.4.2.1.2. Tiempo

La efectividad de descélularización y las alteraciones de la MEC varían dependientemente a la fuente del tejido, la composición del tejido, a la densidad del tejido y otros factores⁽⁹⁶⁾. La córnea es un órgano estratificado con alta complejidad estructural siendo una cualidad importante a considerar, por lo tanto, se busca que después de cada procedimiento la matriz extracelular tenga mínimas alteraciones. El tiempo adecuado en protocolos de descélularización de córnea puede variar según los métodos utilizados. Un tiempo óptimo de descélularización para córnea ha sido en 24 horas con excedentes de pre y post-preparación del tejido.

2.4.2.1.3. Temperatura

Uno de los principales efectos de la temperatura al ser utilizada como parte de método de descélularización es evitar una respuesta inmune con las células que quedan dentro del tejido extraído y procesado. También inactiva las proteasas de matriz evitando una pérdida o degradación de las proteínas de la MEC del tejido⁽¹⁰¹⁾. Una temperatura adecuada para preservar la MEC es a 4°C.

Se sabe que las bajas temperaturas en los procedimientos de descelularización precipitan a algunos detergentes y este efecto es observado en los residuos de sales de potasio, por lo tanto, es un indicador para realizar lavados post-descelularización en biomaterial antes de ser caracterizado o antes de realizar la valoración de una respuesta celular⁽¹⁰³⁾.

2.4.2.2. Fundamentos químicos

Hay una gran gama de tratamientos químicos con la que se puede cumplir la parte de remoción celular en el procedimiento de descelularización. Muchas de las técnicas utilizan agentes químicos como ácidos y bases, soluciones hipertónicas e hipotónicas, detergentes iónicos y no iónicos entre otros como alcohol, acetona etcétera⁽¹⁰²⁾.

2.4.2.2.1. Detergentes

Dentro de los métodos químicos de descelularización existen detergentes que tienen diferente mecanismo de acción: Los detergentes iónicos son efectivos para la solubilización de la membrana citoplasmática y nuclear pero tienen un cierto grado de desnaturalización proteica por la disrupción en las interacción proteína - proteína⁽¹⁰⁴⁾; los detergentes del mecanismo no iónico disrumen los enlaces lípido-lípido y lípido-proteína, pero dejan las interacciones proteína - proteína intactas; detergentes zwitteriónicos exhiben las propiedades de los detergentes iónicos y no iónicos y tienen una mayor tendencia a desnaturalizar las proteínas que los detergentes no iónicos; tri (n-butyl) fosfato es un solvente orgánico que es usado para inactivar virus en sangre sin el compromiso de la actividad del factor de coagulación pero también se ha utilizado como agente caotrópico para procedimientos de descelularización; los tratamientos hipotónicos e hipertónicos son utilizados en choques osmóticos con soluciones hipotónicas e hipertónicas como agua desionizada o solución de baja fuerza iónica para lisar células; y agentes quelantes son un complejo molecular en forma de anillo que se une firmemente y aísla un ion metálico central. En ellos se ha demostrado que los cationes divalentes, como Ca^{2+} y Mg^{2+} , son necesarios para la unión celular a la colágena y la fibronectina en el receptor Arg-Gly-Asp. Al unir los cationes divalentes que están presentes en las adherencias celulares a la MEC, estos agentes facilitan la eliminación del material celular del tejido^(96,104-106).

Dodecil Sulfato Sódico

La molécula Dodecil Sulfato Sódico (DSS o SDS por sus siglas en inglés "Sodium Dodecyl Sulfate"), se considera un detergente iónico y es un compuesto orgánico que tienen una cadena hidrofóbica de un alcohol hidrocarbonado lineal y un grupo hidrofílico con un grupo terminal cargado en un extremo, el cual puede ser un anión. Cuando se disuelve en agua a una determinada temperatura, pH adecuado y concentración, las moléculas de detergente forman micelas con su posición hidrofóbica

en el interior de la micela y el grupo cargado en el exterior. El núcleo hidrofóbico de la micela se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana, formando una micela de gran tamaño hasta saturarse (figura 17), de esta manera la célula drena su contenido generando muerte celular⁽¹⁰⁷⁾. A su vez el mecanismo de acción al romper las interacciones no covalentes intra e inter proteicas resulta la pérdida de su conformación nativa y de su función, por lo tanto, solubiliza células y membranas nucleares con tendencia a desnaturalizar proteínas⁽¹⁰³⁾.

El número de moléculas en el detergente que forman una micela se denomina número de agregación que es de 62, un parámetro importante utilizado para evaluar la solubilidad de proteínas de membrana. La concentración de detergente mínima a la cual se forman micelas a una temperatura máxima de 25°C es llamada concentración micelar crítica (CMC) siendo de 7-10 micelas formadas⁽¹⁰⁷⁾.

Los efectos en la MEC al utilizar el surfactante son muy notorios, ya que el detergente remueve efectivamente los restos nucleares y proteínas citoplasmáticas de los tejidos densos, así mismo, en concentraciones altas tiende a alterar la ultraestructura, elimina los factores de crecimiento y GAGs⁽¹⁰¹⁾.

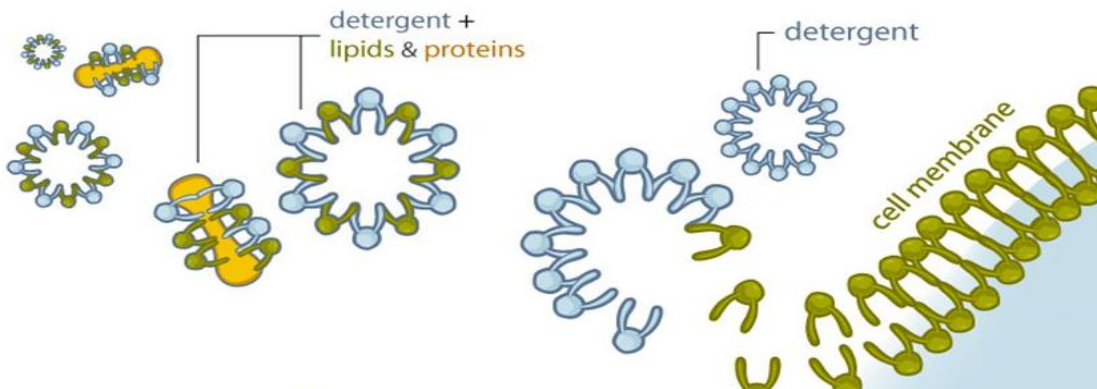


Figura 17. Mecanismo de acción micelar del detergente SDS en membrana celular, genera una interacción iónica hidrofóbica en los fosfolípidos de membrana celular uniéndose a las micelas de detergente hasta saturarse⁽¹⁰¹⁾.

2.5. Técnicas de caracterización para biomaterial, fundamentos teóricos

Se refiere al proceso general y amplio de la ciencia de los materiales por la que las estructuras como sus propiedades son evaluadas y medidas con base a la finalidad y uso del biomaterial. La caracterización se considera fundamental en el campo de la bioingeniería de tejidos porque se busca obtener el mayor mimetismo de un órgano o tejido.

En este trabajo de tesis el andamio fue juzgado por varias pruebas en comparación a la córnea nativa por diferentes técnicas de caracterización, tales son: a) evaluación de

la descelularización y material nucleico residual (histología por hematoxilina y eosina), b) evaluación de la posible inmunoreactividad o rechazo por detección de material nuclear en el andamio (inmunofluorescencia por 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) y cuantificación de ADN residual); c) Evaluación de la microtopografía y estructura del andamio; d) análisis bioquímico estructural; e) análisis térmico; f) obtención de las propiedades ópticas del andamio. Por lo que se describe su funcionamiento como el principio de cada prueba.

2.5.1. Tinción histológica

La histología es una técnica utilizada para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos al ser observados bajo un microscopio óptico o electrónico. La tinción de rutina se realiza en un corte de tejido donde normalmente tiene un espesor de 5 μm y la tinción se basa en 2 componentes: el primero, una tinción nuclear por un colorante básico (hematoxilina); y el segundo componente por una tinción citoplasmática por un colorante xantenico ácido (eosina). La hematoxilina en combinación con sales de aluminio, hierro o cromo, forma un colorante activo, la hemateína, formada por oxidación de la hematoxilina. Este se usa como colorante nuclear, tiñendo los núcleos de color azul, morado, violeta o negro y aportando un buen detalle de los mismos. Por este motivo, se suele usar junto con un colorante citoplasmático, generalmente la eosina, que aporta una tonificación entre el rosa, y el rojo a las estructuras y matrices celulares de carácter catiónico (a las que la hematoxilina no tiñe o muy poco) para realizar contraste entre ellos. La molécula colorante tiene normalmente dos componentes importantes: uno que aporta el color, denominado cromógeno, y otro denominado auxocromo. El cromóforo es la organización molecular dentro del cromógeno responsable de la absorción de un espectro determinado de longitud de onda. El auxocromo que se une al cromógeno puede influir en su coloración^(108,109).

La tinción histológica clásica con Hematoxilina y Eosina (HyE) puede servir como la primera línea de inspección para determinar la eficacia del método de eliminación celular que se puede observar en un tejido⁽⁹⁶⁾.

2.5.2. Tinción fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol

Las pruebas de inmunofluorescencia de marcación pueden ser utilizadas para indicar proteínas intracelulares específicas en un corte histológico de un tejido. La inspección de la presencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) puede ser analizada por la tinción 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), cual es una molécula fluorescente que finalmente logra penetrar la membrana celular enlazándose a los grupos en el surco menor de la doble cadena de ADN, en las zonas de timina y adenina tiñendo el núcleo de células normales y apoptóticas, este marcador tiene un máximo de absorción a una longitud de onda de 358 nm (ultravioleta) y su máximo de emisión es a 461 nm (azul) (figura 18). Por lo tanto en microscopía de fluorescencia DAPI este marcador es excitado con luz azul ultravioleta para después ser detectado a través de un filtro azul/cian revelando el material nucleico del tejido^(96,110,111).

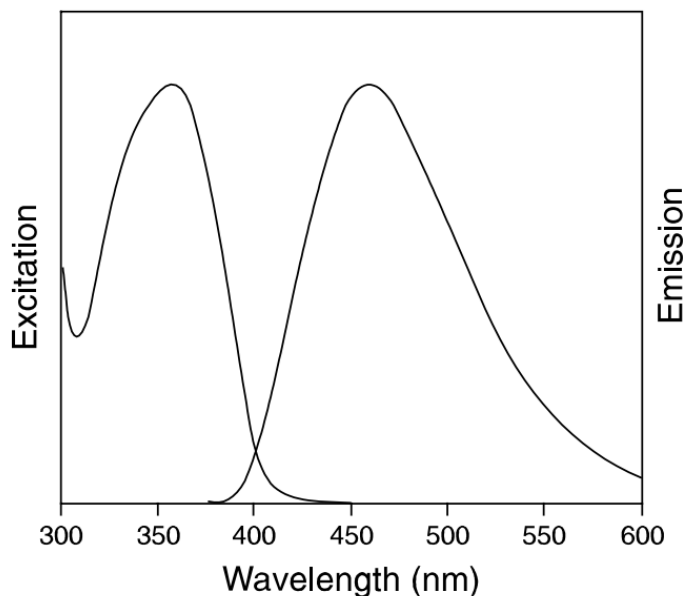


Figura 18. Perfiles de excitación y emisión de fluorescencia DAPI unidos a la doble cadena de ADN⁽¹¹²⁾.

2.5.3. Cuantificación de ADN por fluorimetría

Las técnicas de cuantificación de ácido desoxirribonucleico (ADN) se han utilizado para medir si el ADN está presente en el tejido descelularizado estimando el ADN residual, así como para rectificar que después de la implantación del andamio o al evaluar la respuesta celular, este andamio tenga baja reactividad o inmunogenicidad evitando el rechazo del injerto *in vivo*^(89,96). Algunos autores han utilizado técnicas como son del kit PicoGreen, Qubit o reacción en cadena polimerasa (“*Polymerase Chain Reaction*”, por sus siglas en inglés PCR)^(96,101).

El kit Qubit sd DNA BR Assay (Thermo Fisher, Scientific) es un método de fluorimetría que es altamente selectivo para el ADN bicatenario o de doble cadena (ds, *double strand*, por sus siglas en inglés). Este kit proporciona un reactivo de ensayo

concentrado, tampón de dilución y patrones de ADN pre-diluidos. Simplemente se diluye el reactivo usando una solución tamponada provista donde se agregará volumen entre 1 – 20 µL. cual es leída la concentración usando el fluorómetro Qubit.

El Kit utiliza tinciones de marcación selectiva que emiten fluorescencia cuando se une al ADN o ARN. Las mediciones de fluorescencia también son mucho más sensibles que la absorbancia UV. Y el fluorómetro incluido de 260 nm de longitud de onda (*Fluorometer Qubit 2.0*) mide con precisión las muestras diluidas con mucho menos ruido detectando su intensidad y la distribución de longitudes de onda del espectro de emisión después de la excitación por un cierto espectro de luz, ya que estos parámetros se utilizan para identificar la presencia y cantidad de ciertas moléculas específicas en un medio, en este caso ADN^(113,114).

2.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (MEB) es una prueba fundamental en la caracterización de los materiales y constituye una de las técnicas más utilizadas en el análisis de superficies, debido a que provee una imagen de gran amplificación y definición⁽¹¹⁵⁾. Esta es utilizada para evaluar la ultraestructura de la MEC y la topografía de las fibras de colágena residuales del andamio⁽⁹⁸⁾.

El equipo de microscopía electrónica de barrido consiste en una columna que alberga un filamento (una fuente de electrones), objetivo o lente electromagnética y unas bobinas de exploración ([figura 19](#)). En la base de la columna, está la cámara de detección que contiene a los detectores y la plataforma donde se deposita la muestra. Dependiendo del objetivo en particular del estudio, se puede operar el equipo en diferentes maneras, por ejemplo: bajo voltaje, superficie sensible, alta resolución etc.

En la MEB los electrones emitidos por un cañón de electrones (electrones primarios) se centran por medio de unos cilindros Wehnelt y por lentes electromagnéticas sobre la superficie de la muestra, escanea punto por punto de la muestra. De esta forma se adquieren datos de la muestra de un punto en un momento. En cada lugar donde un haz de electrones primarios impacta en la muestra, un flujo de electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X y otros tipos de señales son emitidas de la muestra ([figura 20](#)).

Los electrones secundarios retrodispersados emitidos por la muestra son capturados por detectores y presentados en forma de modulaciones de brillo en un monitor. Los electrones secundarios provienen de una capa superficial de hasta 10 nm de espesor, mientras que los electrones retrodispersados se originan en capas más profundas.

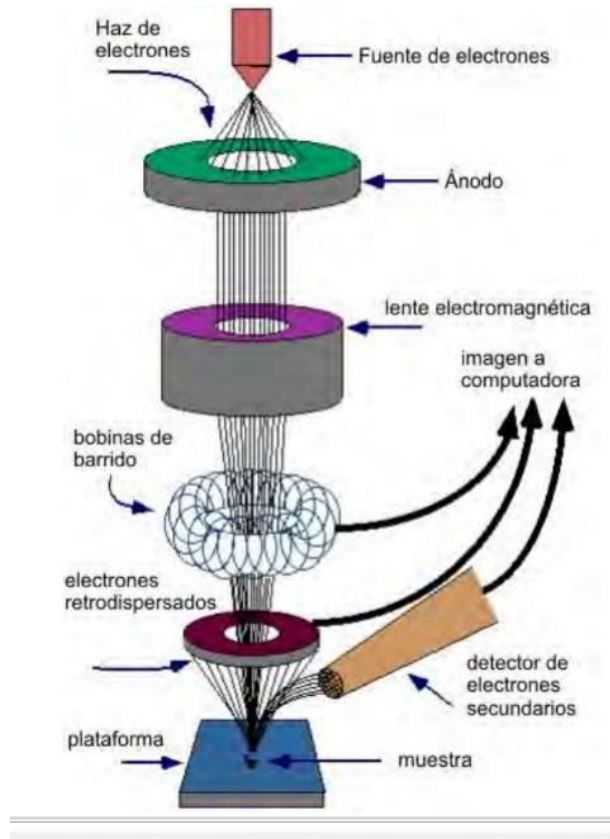


Figura 19. Esquema de los componentes de un microscopio electrónico de barrido (MEB)⁽¹¹⁵⁾.

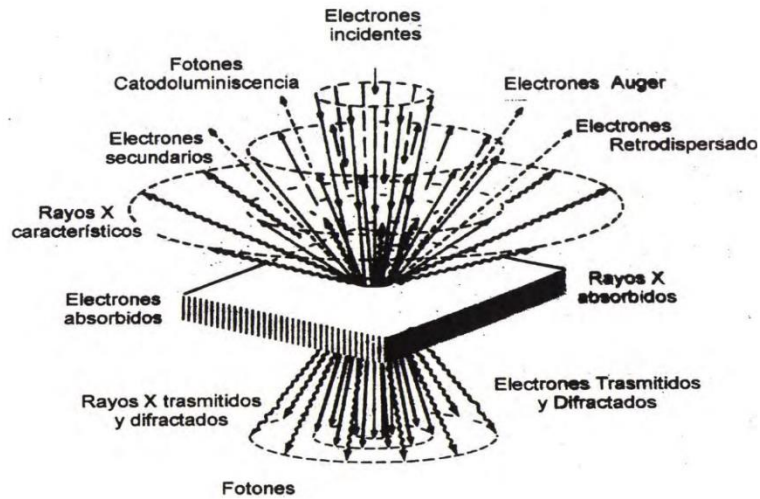


Figura 20. Señales emitidas durante el escaneo de la muestra por MEB⁽¹¹⁵⁾.

Una porción de cada señal emitida viaja en tal dirección que entra en el detector y este mide la intensidad de electrones emitidos en cada punto sobre la muestra, y convierte este valor de intensidad en una escala de grises. Entonces valores digitalizados son

desplegados en un monitor. La imagen que se obtiene en el monitor está sincronizada con el movimiento y posición del haz de electrones sobre la muestra. De este proceso de formación de la imagen se aplica a todas las señales colectadas y permite la imagen de cada señal para ser recogidas simultáneamente. El resultado es una imagen topográfica muy ampliada de la muestra. Por último y antes de este proceso, la muestra que se observará en MEB debe ser conductora, en el caso de los materiales poliméricos como la colágena, deben ser recubiertos con una película metálica (en este caso oro)⁽¹¹⁵⁾.

2.5.5. Espectroscopia Raman

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica óptica de alta resolución como de alta sensibilidad, no destructiva, ni invasiva, de escasa preparación de muestra y alta resolución espacial en el sistema. Esta técnica proporciona información bioquímica estructural de casi cualquier material orgánico e inorgánico en cualquier estado (líquido, sólido y gaseoso), gracias a la interacción de la radiación con la materia son detectadas las vibraciones moleculares de cualquier sistema molecular de estado electrónico estable⁽¹¹⁶⁾. Esta espectroscopia es ampliamente utilizada para estudios cualitativos y cuantitativos en diferentes campos de investigación.

Su principio óptico es el esparcimiento de la luz, aunque algunos autores también lo llaman “dispersión” haciendo referencia al proceso de esparcimiento de luz en un material al incidir sobre él un haz de luz monocromática, más no al proceso de separación de longitud de ondas de la luz blanca. La mayor parte de la luz dispersada/esparcida de la muestra presenta la misma frecuencia que la luz incidente ($\nu_o = \nu_r$, donde ν_o es frecuencia inicial y ν_r es la frecuencia resultante o final) y esta no aporta ninguna información sobre la muestra analizada (dispersión Rayleigh), pero una pequeña fracción dispersada presenta un cambio frecuencial distinto a la incidente ($\nu_o \pm \nu_r =$ dispersión Raman), resultado de interacción de la luz con la materia y esta pequeña porción de luz dispersada inelásticamente experimenta ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente a la luz incidente (figura 21)⁽¹¹⁷⁾.

Los iones y átomos están enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas que están sometidas a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estos movimientos se realizan en frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces químicos existentes entre ellos (figura 22). Cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula corresponderá un valor determinado de la energía molecular⁽¹¹⁷⁾.

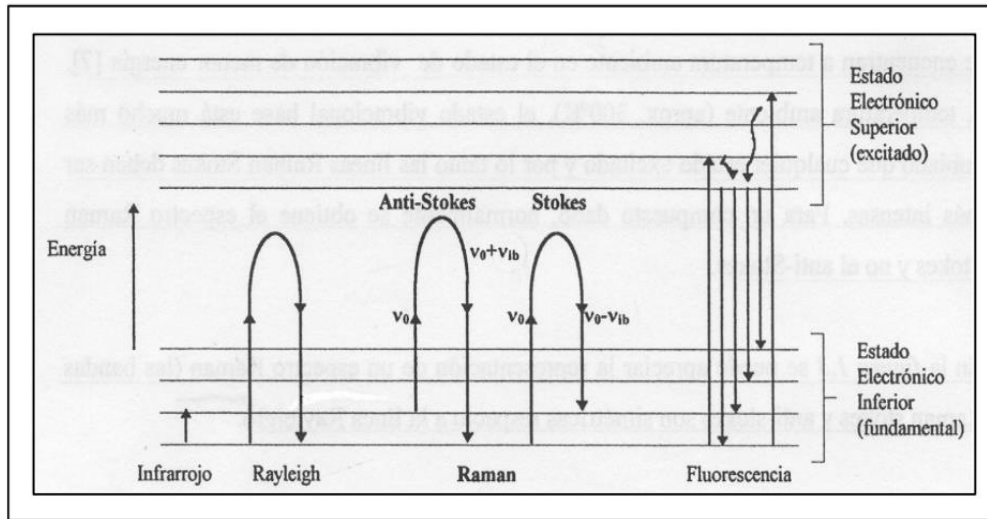


Figura 21. Diagrama energético en el que las líneas horizontales representan distintos estados vibracionales y en el que se muestran las transiciones entre estados energéticos para diferentes interacciones de luz-materia. Se muestra choques elásticos (efecto Rayleigh) y los choques inelásticos (efecto Raman) en su modalidad Stokes (resulta en un estado mayor al incidente) y anti-Stokes (resulta en un estado menor al incidente)⁽¹¹⁷⁾.

El fotón incidente en la muestra excita a la molécula transitoria y la lleva a un nivel de energía vibracional o rotacional superior no permitido, el cual abandonará rápidamente para regresar a un nivel energético permitido, emitiendo un fotón; la frecuencia a la cual es liberado este fotón dependerá del salto energético realizado por la molécula.

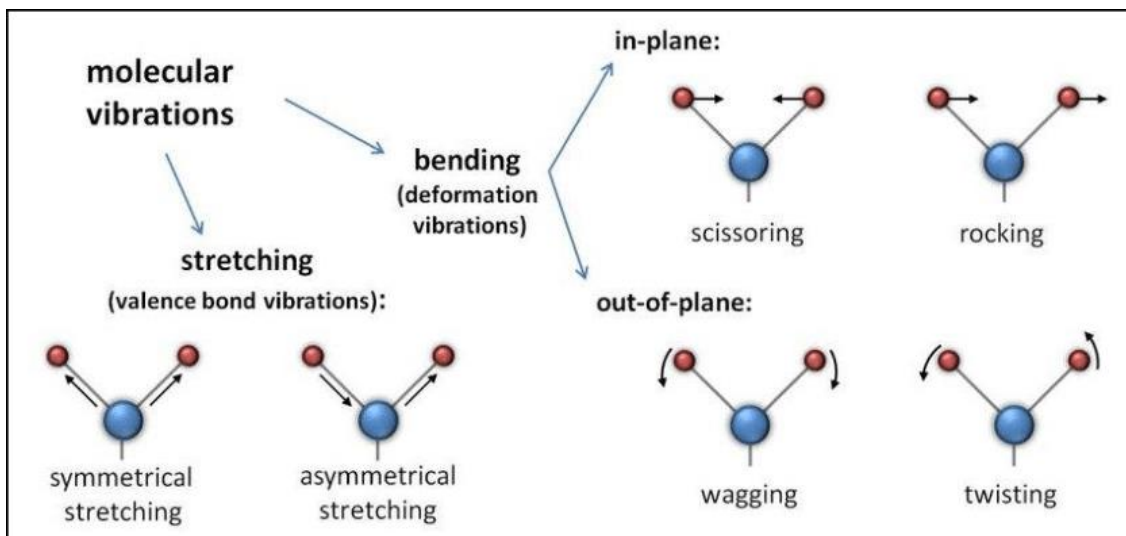


Figura 22. Tipo de comportamiento dinámico, característica de la naturaleza poliatómica de los enlaces químico - moleculares (movimiento vibracional)⁽¹¹⁷⁾.

Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a la misma frecuencia que el fotón incidente, el choque es elástico, el fotón ni la molécula sufren variaciones en su estado energético; la molécula vuelve al mismo nivel de energía que tenía antes del choque y el fotón dispersado tiene la misma frecuencia que el incidente ($v_r = v_o$), da lugar a la dispersión Rayleigh (figura 18).

Si el resultado de la interacción fotón-molécula es un fotón dispersado a una frecuencia distinta del incidente ($v_r \pm v_o$), el choque es inelástico (existe transferencia de energía entre la molécula y el fotón), ocurren dos casos:

1. El fotón es dispersado y tiene una frecuencia menor al incidente, se produce una transferencia de energía del fotón a la molécula que después de saltar al estado de energía no permitido, vuelve a uno permitido mayor al que tenía inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $v_o - v_r$ y se produce la dispersión Raman Stokes.
2. El fotón dispersado tiene una frecuencia mayor a la del incidente, se produce una transferencia de energía de la molécula al fotón; esto significa que la molécula antes del choque no se encontraba en su estado vibracional fundamental sino en uno de mayor energía y después del choque pasa a uno menor permitido al que se encontraba inicialmente; el fotón es dispersado con frecuencia $v_o + v_r$ y se produce la dispersión Raman anti-Stokes.

Finalmente, el espectro Raman recoge estos fenómenos representando la intensidad óptica dispersada en función del número de onda normalizado al que se produce. El número de onda normalizado es una magnitud proporcional a la frecuencia e inversamente proporcional a la longitud de onda y se expresa en cm^{-1} . Y en la gráfica debe tomarse como abscisa para representar los espectros Raman en el desplazamiento (figura 23)⁽¹¹⁷⁾.

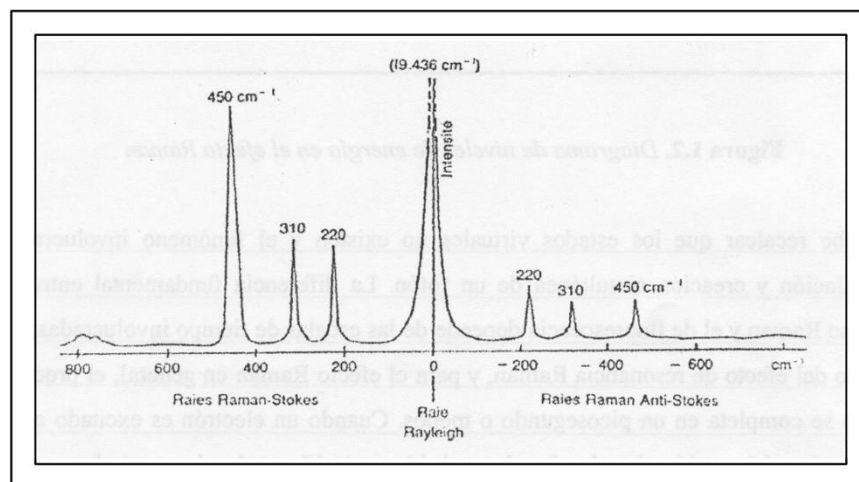


Figura 23. Gráfica de espectro Raman representando bandas de la dispersión Rayleigh, Raman Stokes y anti-Stokes de una muestra ejemplo observándose sus números de onda en cm^{-1} ⁽¹¹⁷⁾.

El equipo utilizado consta de dos fuentes de luz monocromática intercambiables (láser de Helio-Neón y láser de Argón), láser de He-Ne de 632.8 nm correspondiente a la luz roja visible en espectro electromagnético y el láser de Ar es de 514.5 nm correspondiente a la luz verde, estos están conectados a una fibra óptica de excitación que guía la luz hasta el cabezal óptico y este tiene como objetivo focalizar sobre la muestra como maximizar la recolección de la luz dispersada por la muestra guiándola en el trayecto de regreso a un monocromador (figura 24-a) que la separa espacial y espectralmente, y gracias a un filtro paso-banda basado en una rejilla dispersiva, separa la frecuencia de manera similar como un prisma. Esta luz es colimada mediante un espejo cóncavo hacia una ranura delgada de difracción que dispersan los diferentes componentes de longitud de onda angularmente, donde a cada frecuencia le corresponde un ángulo de salida. Un segundo espejo focaliza los componentes dispersados hacia la ranura de salida que selecciona una banda estrecha de las longitudes de onda de detección (figura 24-b).

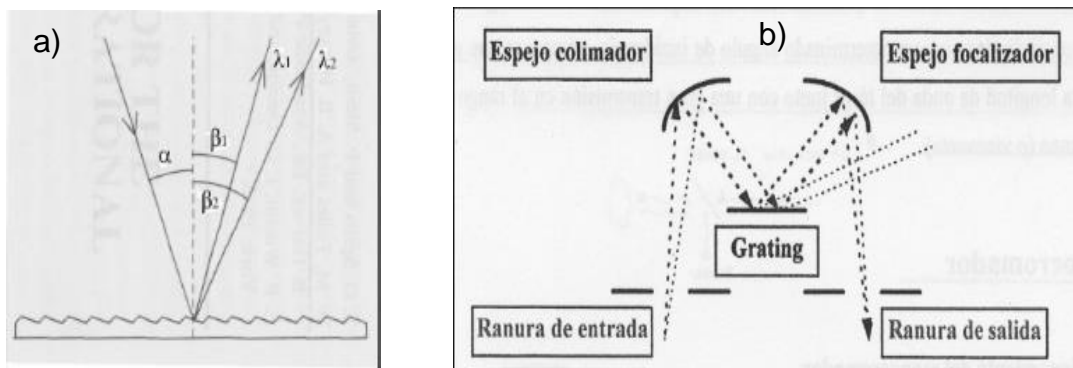


Figura 24. a) Ángulo de salida provenientes de la ranura de difracción; b) Esquema del monocromador⁽¹¹⁷⁾.

Por último, el dispositivo de carga acoplada (CCD) transforma los fotones de la luz dispersada en señal eléctrica digital y el espectro es remitido al ordenador, mismo que sirve para controlar de todos los elementos en el análisis (figura 25).

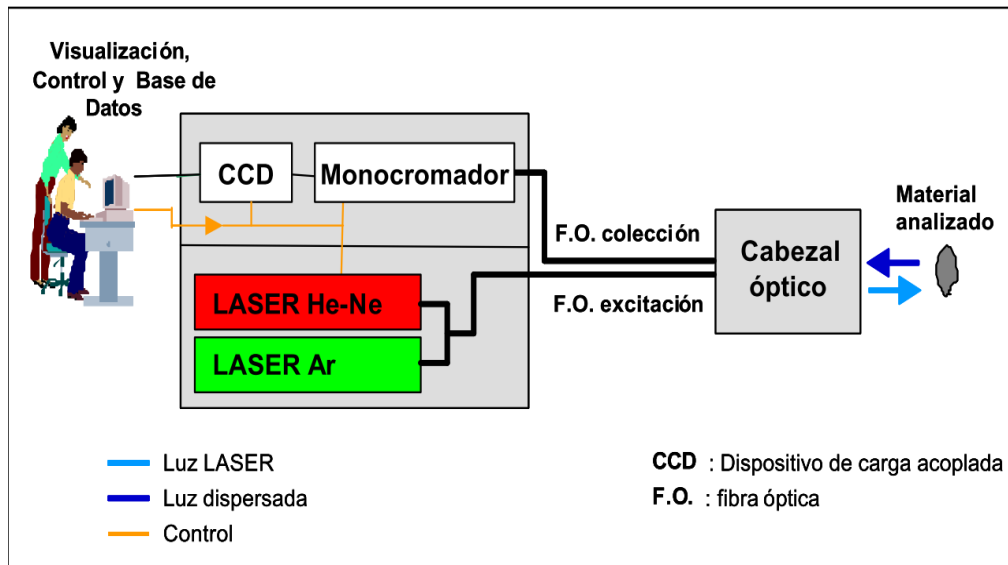


Figura 25. Diagrama del equipo y funcionamiento del espectrómetro Raman⁽¹¹⁷⁾.

La espectroscopía Raman ha sido considerada parte de la caracterización del biomaterial porque proporciona datos esenciales en la caracterización estructural de colágena del tejido nativo, como también, permite observar las modificaciones en la estructura bioquímica residual de colágena a causa del proceso de descelularización^(118,119).

2.5.6. Análisis térmico

2.5.6.1. Calorimetría Diferencial de Barrido

La Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB o DSC por sus siglas en inglés “*Differential Scanning Calorimetry*”), mide el cambio de flujo de calor hacia y desde el material en función del tiempo o la temperatura.

El instrumento DSC está conformado por dos cámaras donde cada una contiene un crisol, este puede ser fabricado de diferentes materiales, el más utilizado es de aluminio que resiste una temperatura máxima de hasta 600°C, y después de esa temperatura se utilizan materiales como oro, carbono, platino y acero inoxidable (la selección del material es para evitar la interacción con la muestra). En uno de los crisoles se coloca la muestra a analizar mientras que el otro crisol sirve de referencia.

En el calentamiento de la muestra, se mide el flujo del calorífico, manteniendo un equilibrio térmico entre la referencia y la muestra, modificando la corriente que pasa a través de los calentadores de ambas cámaras; la referencia y la muestra a evaluar se calienta a una velocidad determinada hasta que la muestra empieza a consumir o emitir calor, en donde sí resulta un proceso endotérmico, la temperatura de la muestra será menor que la referencia.

Los circuitos están programados para proporcionar temperatura constante a los compartimientos de la muestra y la referencia, suministrando por lo tanto una corriente adicional al compartimiento de la muestra para elevar la temperatura hasta la referencia. De esta manera se registra la corriente necesaria para mantener la temperatura constante entre la muestra y referencia. Al término de la corrida se obtiene un termograma en donde aparecen varios picos que reflejan las transiciones ocurridas durante el experimento y donde el área bajo la curva resultante es una medida directa de la transición calorífica. Si indica que la dirección de los picos son hacia abajo, denotan procesos endotérmicos (absorben calor) y por lo contrario, si los picos son hacia arriba se refieren a procesos exotérmicos (liberan calor)^(115,120).

La calorimetría diferencial de barrido y en específico de alta sensibilidad es posible obtener información de los parámetros termodinámicos y cinéticos, uno de los parámetros importantes en el caso de las proteínas a determinar con esta técnica es la capacidad calorífica (C_p), que no es la misma antes y después de la desnaturalización (figura 26). Esta se define como la suma de las contribuciones en términos energéticos de todos los estados presentes durante la transición térmica; T_m es el valor de la temperatura media a la que se alcanza el valor máximo de C_p , y ΔH es la entalpía de transición de fase y se determina integrando el área bajo el pico de transición^(115,120).

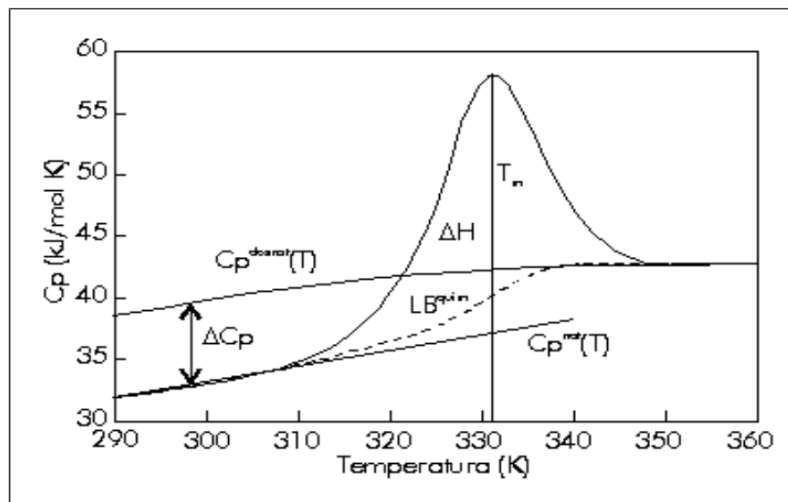


Figura 26. Curva de capacidad calorífica vs temperatura. Consiste en tres regiones: la primera región es el estado nativo correspondiente al poblado en condiciones fisiológicas, la segunda región es el punto máximo de la curva representativa a una transición de la primera orden y la tercera región es la posterior al punto máximo y consiste en el estado desnaturalizado. Debido a que T_m ya no solo tiene una única contribución por parte del estado nativo^(115,120).

Hay algunas variables que pueden determinarse a partir de esta técnica y son: Temperatura de fusión, temperatura de ebullición, temperatura de cristalización, calor específico, pureza de la muestra, temperatura de transición vítrea, capacidad calorífica y entalpía de fusión.

Es importante dentro del análisis térmico que se aplique una reversibilidad de la transición de desnaturalización, que esta se comprueba con el recalentamiento de la muestra inmediatamente después de enfriar la celda que se calentó en el primer barrido y con ello se demuestra que el sistema vuelve al estado inicial (nativo), aunque es posible que no se llegue al equilibrio, ya que el sistema está controlado cinéticamente y esto se relaciona directamente con la velocidad del calentamiento. De lo anterior surge un enérgico estudio para entender el proceso de desnaturalización de las proteínas y que se encuentran con dos caminos, uno donde el proceso está dado por el equilibrio (reacción reversible) y el segundo denotado por un proceso que no está en equilibrio (reacción irreversible)^(115,120).

2.5.6.2. Análisis Termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (AT o TGA por sus siglas en inglés “*Termogravimetric Analysis*”) es una forma de evaluación térmica que complementa a la CDB y registra continuamente la pérdida la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra (normalmente de forma lineal con el tiempo). Como en la medición del flujo calorífico en CDB, la representación del cambio del porcentaje de masa en función del tiempo se denomina termograma y/o curva de descompensación térmica en AT⁽¹²¹⁾.

En los instrumentos empleados en termogravimetría constan de: (1) una balanza analítica sensible, (2) un horno, (3) un sistema de gas de purga para proporcionar una atmósfera inerte controlada (o algunas veces reactiva) y (4) un microprocesador / microordenador para el control del instrumento y la adquisición y visualización de datos. Además, existe la opción de añadir un sistema para cambiar el gas de purga en las aplicaciones en la que este gas debe cambiarse durante el experimento⁽¹²¹⁾.

Las termobalanzas son capaces de proporcionar información cuantitativa sobre muestras cuyas masas van desde 1 mg hasta 100 g, sin embargo, el tipo de balanza más común tiene tan solo un intervalo entre 5 y 20 mg. Si bien el soporte de la muestra debe estar alojado en el horno, el resto de la balanza debe estar aislado térmicamente del horno. Cuando se lleva a cabo el procedimiento un cambio de masa de la muestra provoca una desviación en el brazo de la termobalanza como se aprecia en la [figura 27](#), que cierra el paso de la luz entre la lámpara y una de los fotodiodos. El desequilibrio resultante en la corriente fotodiódica se amplifica y alimenta la bobina E, que está situada entre los polos del imán permanente F, así el campo magnético generado por la corriente en la bobina devuelve al brazo a su posición original. La corriente amplificada del fotodiodo se recoge y se transforma en información sobre la masa o pérdida de masa en el sistema de adquisición de datos⁽¹²¹⁾.

El intervalo de temperatura para la mayoría de los hornos para termogravimetría va desde la temperatura ambiente hasta 1,500°C. y es dependiente a cada muestra que se desee analizar. A menudo se pueden variar las velocidades de calentamiento o enfriamiento del horno desde aproximadamente cero hasta valores tan elevados como 200°C/min. Para evitar la transferencia de calor a la balanza es necesario aislar y refrigerar el exterior del horno. Normalmente se utiliza nitrógeno o argón para purgar el horno y evitar la oxidación de la muestra⁽¹²¹⁾.

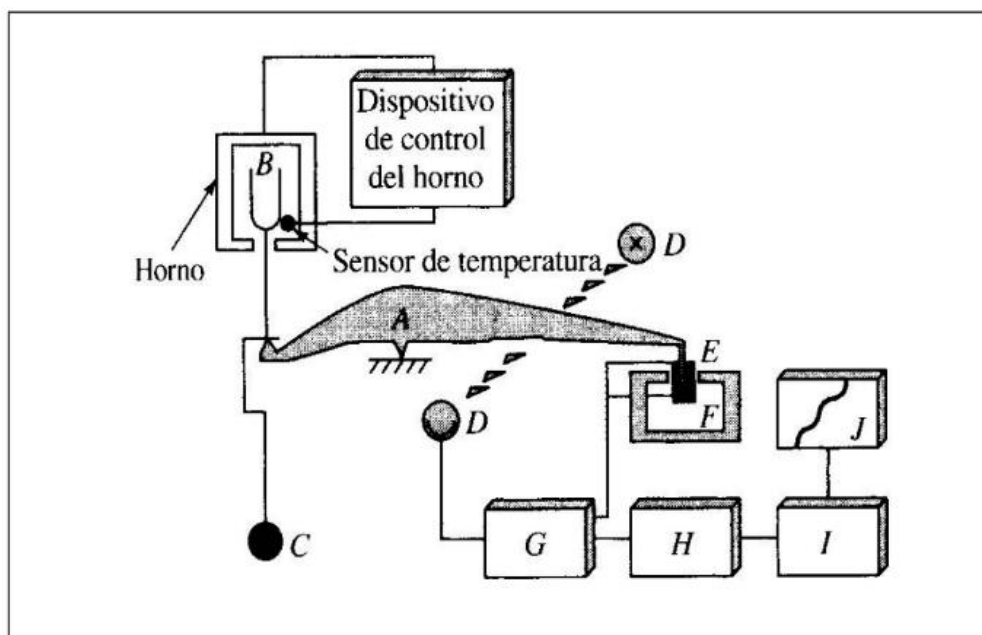


Figura 27. Componentes de una termobalanza: a) brazo; b) copa y soporte de la muestra; c) contrapeso; d) lámpara y fotodiodos; e) bobina; f) imán; g) control del amplificador; h) calculador de la tara; i) amplificador; y j) registro⁽¹²¹⁾.

Las termobalanzas modernas utilizan normalmente un ordenador para el control de rutina de la temperatura, que compara automáticamente la tensión de salida del termopar con una tabla que se almacena en la memoria ROM y que relaciona las tensiones con las temperaturas. El microordenador utiliza la diferencia entre la temperatura del termopar y la temperatura especificada en la memoria ROM para ajustar la tensión del calentador. Utilizando este método es posible alcanzar una concordancia excelente entre el programa de temperaturas y la temperatura de la muestra. La reproducibilidad típica de un programa concreto es de $\pm 2^\circ\text{C}$ en todo el intervalo de operación del instrumento.

La información que proporciona el TGA, es más limitada que la que se obtiene con otros métodos como el DSC o DTA (Análisis Térmico Diferencial), ya que en este método una variación de temperatura tiene que causar un cambio en la masa del analito. Por tanto, el TGA está limitado en su mayor parte a las reacciones de descomposición y de oxidación a procesos tales como la vaporización, la sublimación

y la desorción. Las aplicaciones más importantes de los métodos termogravimétricos se encuentran en el estudio de polímeros. Los termogramas proporcionan información sobre los mecanismos de descomposición de diversas preparaciones poliméricas. Además, los patrones de descomposición son característicos de cada tipo de polímero y en algunos casos pueden ser utilizados con finalidades de identificación^(120,121).

2.5.7. Refractometría por Reflexión

La técnica óptica que se utilizó para análisis del biomaterial es la Refractometría por Reflexión (RR), que es una técnica analítica e instrumental basada en la medición del ángulo de crítico de un haz de luz al cambiar de medio en función de la reflexión interna total para obtener el índice de refracción del biomaterial a analizar⁽¹²²⁾. Además, con el objetivo de investigar su composición y pureza del andamio óptico, sirve para conocer cómo se comporta la transmisión de luz a través y entre una interfaz de un medio homogéneo y el andamio descelularizado, como para la obtención de las propiedades ópticas del andamio en el mismo trayecto, ya que el proceso de descelularización por el que pasa la córnea puede producir cierto cambio en la dirección de la luz por la alteración de la matriz extracelular.

Cuando un haz de luz incide sobre la interfaz entre dos medios con índices de refracción diferentes, en general ocurren dos procesos: una parte de la luz se refleja de regreso al primer medio y otra se transmite o refracta al segundo medio (figura 28). En este trayecto también ocurren otros principios ópticos más complejos como la absorción y/o esparcimiento que se relacionan con pérdidas de energía.

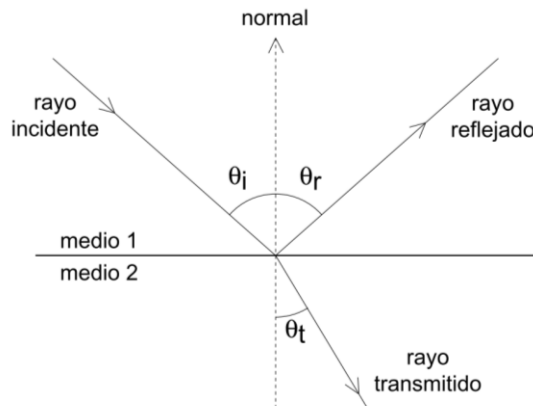


Figura 28. Esquema de reflexión y refracción en la incidencia de un rayo de luz entre dos medios⁽¹²³⁾.

La refracción o transmisión como su nombre lo indica esta prueba, representa la desviación que experimentan los rayos luminosos al pasar de un medio transparente de densidad determinada a otro cuya densidad es distinta de la del anterior. La refracción es fundamental para la explicación de los procesos que experimenta la luz. La luz se propaga con velocidades diferentes dependiendo de la densidad del medio por el que lo hace (cuanto mayor sea la densidad del medio, más lenta es la

propagación de la luz), la intensidad de refracción depende del grado de variación en la velocidad de propagación (cuando mayor la propagación, mayor es la refracción que experimenta el rayo y en consecuencia es mayor el poder de refracción del medio)⁽¹²²⁾.

La transmisión de luz a través de un medio homogéneo es un proceso continuo y repetitivo de dispersión y redispersión. De este mismo deriva el índice de refracción (n), que es una medida del grado de desviación que sufre un rayo al transmitirse de un medio a otro medio, principal constante óptica que caracteriza un medio óptico y es de fundamental importancia para un correcto conocimiento de la óptica de un material. El índice de refracción está en función de la longitud de onda, pues mientras más alta sea la frecuencia y más corta la longitud de onda, mayor será el índice de refracción. Y surge cuando el proceso de absorción y emisión adelanta o retrasa las fases de los fotones dispersados, aun cuando ellos se propagan a una velocidad constante^(123,124).

El esparcimiento o difusión se produce cuando la luz se encuentra con inhomogeneidades en su trayecto, y dependerá del índice de refracción de dichas heterogeneidades, por su tamaño, forma y distribución. Se produce este fenómeno cuando la radiación electromagnética cruza con moléculas que carecen de resonancias en el visible (nitrógeno, oxígeno etc.), comportándose como un pequeño oscilador cuya nube de electrones es impulsada a una vibración en el estado fundamental por un fotón que incide. Justo en el momento en que se inicia esta vibración, la molécula inicia la reemisión de la luz. El fotón es absorbido e inmediatamente después, se emite otro fotón de la misma frecuencia y longitud de onda; la luz se esparce elásticamente o inelásticamente (ya mencionado en la espectroscopia Raman)⁽¹²³⁾. Las moléculas están orientadas al azar y ópticamente los fotones se esparcen en todas direcciones, incluso cuando la luz es tenue, el número de fotones es inmenso, y parece como si las moléculas estuvieran esparciendo pequeñas ondas esféricas clásicas (figura 29).

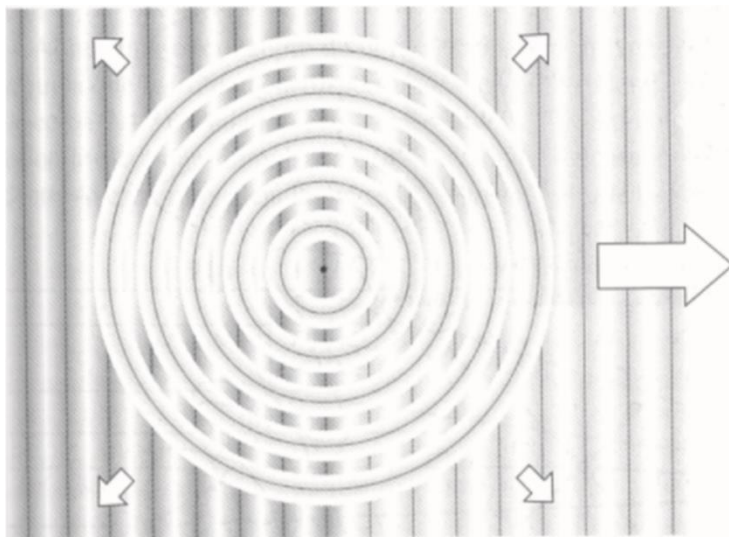


Figura 29. Onda plana incidente por la izquierda, atraviesa un átomo esparciendo así trenes de onda esféricas. El proceso es continuo y centenas de millones de fotones fluyen cada segundo del átomo de esparcimiento en todas las direcciones⁽¹²³⁾.

Lord Rayleigh analizó el esparcimiento de luz tomando como referencia los osciladores moleculares. Utilizando un argumento simple en el análisis dimensional, llegó a la conclusión de que la intensidad

de la luz esparcida era proporcional a $1/\lambda^4$, aumentando por lo tanto con v^4 , (v = velocidad). M Smoluchowski y A. Einstein mencionaron que el esparcimiento o

dispersión se produce cuando la luz recorre una distancia en dirección diferente al incidente y la densidad de un medio no es homogénea⁽¹²³⁾.

Otro de fenómeno que podría ocurrir en análisis óptico es la absorción. Esta es una propiedad que tienen los materiales ópticos en donde incide la radiación electromagnética (generalmente en la región visible de una determinada longitud de onda) que es absorbida por la sustancia, típicamente, son electrones unidos en átomos, este proceso toma la energía de un fotón y es transformada a energía electromagnética interna o energía térmica del material. De esta manera puede notarse un efecto de en la reducción de la intensidad de longitud onda (atenuación). Este efecto es considerado en algunos contextos como “extinción” siendo la pérdida gradual del flujo de intensidad luminosa a través de un medio^(125,126).

Paralelo al proceso de refracción, la reflexión se explica cuando un haz de luz compuesto de una serie de frentes de onda planos incide con un determinado ángulo sobre la superficie, suave y plana de un medio ópticamente denso (vidrio) y esta regresa en un mismo ángulo. En la trayectoria de un frente de onda a medida que éste va adentrándose entre las moléculas de la superficie, desciende, activa y reactiva dispersor por dispersor, cada uno de los cuales irradia un flujo fotónico que podemos considerar como un tren de ondas hemisféricas en el medio incidente (figura 30). Debido a que la longitud de onda es mucho mayor que la separación entre las moléculas, los trenes de ondas que son radiados hacia detrás al medio incidente avanzan juntos y se añaden constructivamente entre una única dirección, con los que sólo hay un haz reflejado bien definido. La dirección del haz reflejado viene determinada por diferencia constante de fase entre los dispersores atómicos, dirección dada por el ángulo que dibuja la onda incidente con la superficie, denominado ángulo de incidencia. El ángulo de incidencia (θ_i) es de igual valor al ángulo de reflexión o reflejado (θ_r) se dice que un rayo de luz es incidente normalmente cuando $\theta_i = 0^\circ$, en cuyo caso $\theta_r = 0^\circ$ y en un espejo, el rayo se refleja de nuevo en sí mismo. Del mismo modo, la incidencia restante corresponde a $\theta_i \approx 90^\circ$ y, forzosamente, $\theta_r \approx 90^\circ$ (figura 28)⁽¹²³⁾.

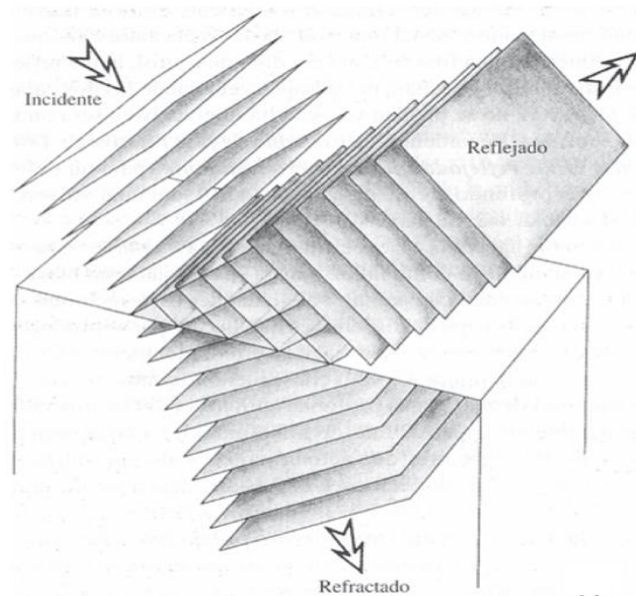


Figura 30. Un haz de ondas planas incidente en una distribución de moléculas que forman un trozo de vidrio o plástico claros. Parte de la onda se refleja y parte se refracta⁽¹²³⁾.

La reflexión externa e interna se puede ejemplificar cuando se tiene un bloque cortado por la mitad en sentido perpendicular al rayo de luz. Se separa ambos segmentos mostrando las superficies planas, tal como aparece en la figura 31. Cada molécula del medio esparce luz hacia atrás y, en principio, todas y cada una de las moléculas contribuyen a la onda reflejada.



Figura 31. Reflexión interna por dos interfaces. a) Un haz luminoso que se propaga a través de un medio homogéneo denso como el vidrio. b) Al partir y separar el bloque de vidrio, la luz se refleja hacia atrás en las dos nuevas interfaces. El haz I se refleja externamente y el haz II internamente. Idealmente, al volver a juntar los dos pedazos, los dos haces reflejados se anulan recíprocamente⁽¹²³⁾.

El haz-I se refleja desde el bloque de la derecha, dado que la luz al principio se transmitía de un medio de menor densidad óptica a uno de mayor densidad óptica, se le conoce como reflexión externa. Dicho de otro modo, el índice del medio incidente (n_i) es menor que el índice del medio transmisor (n_t) ($n_i < n_t$). Esto mismo sucede a la capa desparejada de la sección que se transmitió hacia la izquierda, por lo que ésta también refleja la luz hacia atrás. Con el haz incidente perpendicularmente en el vidrio sobre el aire, un 4% será reflejado, esta vez como haz II. A este proceso se le conoce como reflexión interna, porque el índice de refracción del medio de incidencia es mayor al medio de transmisión ($n_i > n_t$)⁽¹²³⁾.

La segunda parte de la ley de reflexión establece que el rayo incidente, perpendicular a la superficie y el rayo reflejado se encuentran todos en un mismo plano que se denomina: plano de incidencia, un fenómeno tridimensional. En dicho caso, la luz reemitida por millones de átomos se combina para formar un único haz bien definido en un proceso denominado reflexión especular. Siempre que las irregularidades de las

superficies sean pequeñas comparadas con λ , los trenes de ondas dispersados seguirán llegando más o menos en fase cuando $\theta_i = \theta_r$. Por otro lado, cuando la superficie es rugosa comparada con λ , pese a que el ángulo de incidencia será igual al ángulo de reflexión para cada rayo, el conjunto de todos ellos aparecerá por doquier, constituyendo lo que se denomina reflexión difusa⁽¹²³⁾.

Integración de principios ópticos en el arreglo experimental óptico

Ya mencionado, que cuando los rayos de luz viajan de un medio de alto índice de refracción hacia medios de menor índice de refracción, ocurre el fenómeno de reflexión interna total, que, a partir de cierto ángulo de iluminación del material a evaluar, toda la luz que incide se refleja en su totalidad. Este fenómeno sólo se produce para ángulos de incidencia superiores a un valor crítico θ_c , a este ángulo se le denomina, ángulo crítico. Y este fenómeno óptico puede utilizarse como técnica de determinación de índice de refracción de materiales, resultando ser bastante precisa.

Dicha técnica consiste en medir la luz reflejada especularmente variando el ángulo de incidencia, y al estar en una configuración de reflexión interna, observaremos un ángulo crítico, y cerca de este la curva de reflectancia cual tiene una sensibilidad muy alta. De esta manera se puede obtener el índice de refracción del material evaluado al emplear y despejar una ecuación de mezclado partiendo de la fórmula $\theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$.

En lo siguiente se describe el arreglo experimental utilizado, basándonos en la técnica de reflexión descrita.

El principal fundamento óptico del arreglo experimental en la refractometría es la reflexión. Esta prueba consiste en colocar un cilindro de vidrio homogéneo, que estará cortado a la mitad de igual manera en sentido perpendicular al rayo de luz. Estará consecuente por una película de un espesor en particular pensado para el uso trascendental del biomaterial (10 micras). La reflexión que nos interesa detectar es la proveniente de la cara plana/interior del prisma que está en contacto con el biomaterial, formando una configuración de reflexión interna.

El andamio va depositado sobre un cubreobjetos para facilitar su manipulación. Se utiliza un aceite de inmersión de índice de refracción muy similar al del vidrio (1.5) para adherir a la cara posterior del prisma la cara trasera del cubreobjetos con la muestra quedando en la parte más posterior del sistema óptico, garantizando que no exista una reflexión indeseada entre estos dos medios (técnica de “index matching”).

El arreglo experimental utilizado para la refractometría por reflexión consiste en 5 partes principales (figura 32). 1. Láser con longitud de onda de 515 nm (luz verde) incidente en las interfaces a analizar; 2. Platina rotatoria, marca Thorlabs, modelo CR1/M Z7, donde se deposita la mitad de un cilindro de vidrio (BK7) cuyo índice de refracción es 1.52; 3. Detector de silicio montado en un brazo rotacional automatizado para medir la luz reflejada como función del ángulo de incidencia, el cual transmite la

señal a un medidor de potencia; 4. Medidor de potencia, marca Thorlabs, modelo PM300; 5. Ordenador, controlador del sistema óptico. En este proceso se captará la reflexión de la luz emitida por las interfaces involucradas en el sistema prisma muestra y sus similitudes con variación de sustancia-material, así como su índice de refracción.

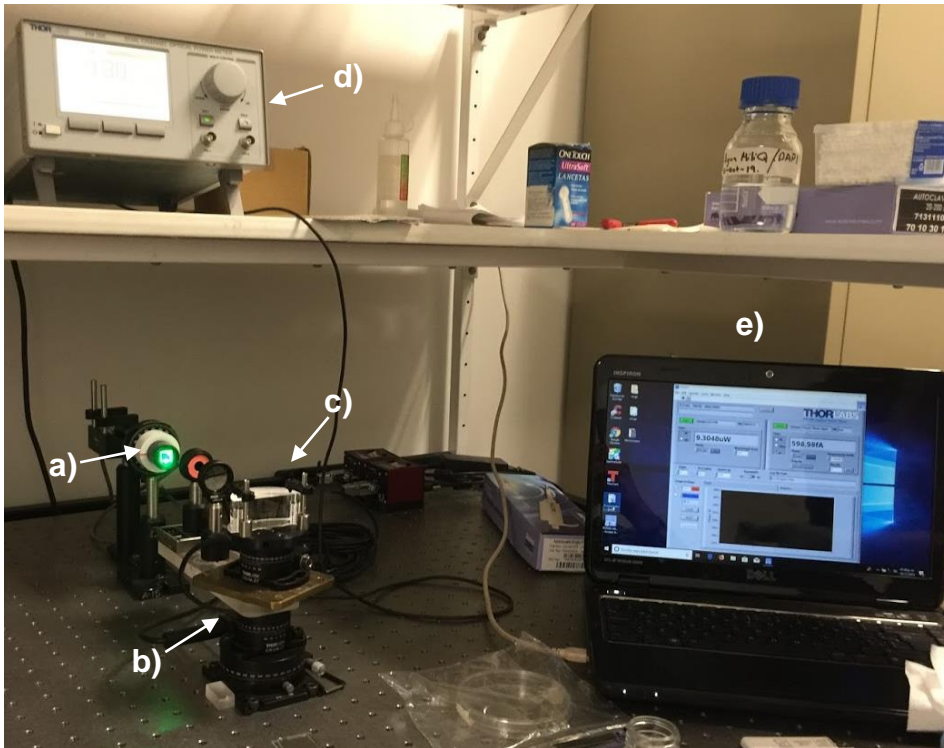


Figura 32. Instrumentación de refractometría por reflexión; a) Láser de luz verde; b) Platina rotatoria donde se deposita la mitad de un cilindro de vidrio; c) Detector de silicio montado en un brazo rotacional automatizado el cual transmite la señal a un medidor de potencia; d) Medidor de potencia; e) ordenador de manipulación de las condiciones experimentales.

3. Antecedentes

La idea de tratar la ceguera corneal con queratoprótesis y derivados de queratoplastia orilló a utilizar diferentes biomateriales poliméricos como sustitutos con biomimetismo y citocompatibilidad de matriz corneal. En el área de ingeniería tisular se ha incluido el uso de algunos biopolímeros como la colágena tipo I, III y entrecruzamientos, ya que es un polímero natural que puede promover la adhesión celular y proliferación mejor que un polímero sintético. Los biopolímeros como la gelatina, gel de sílice y fibrina usados para la formación de gel, ha demostrado una respuesta de adhesión y migración en células epiteliales, y el mismo gel con mezclas de otros polímeros (fibrina-agarosa) confirma buena funcionalidad. Por otro lado, la quitina y quitosano son polisacáridos lineales utilizado en numerosos tejidos y en modelos de liberación de fármacos por tener características no tóxicas, no estimulantes, no antigénicos y con una biodegradación adecuada.

Polímeros sintéticos como: alcohol polivinílico, polihidroxietilmetacrilato, polietilenos, glicol diacrilato etc., se han propuestos como andamios, sin embargo, el principal obstáculo para que estos materiales sigan utilizándose ha sido su desventaja en cuanto a permitir desarrollar un andamio con composición estructural bioquímica y biomecánica similar a la córnea nativa que proporcione transparencia restaurando la visión⁽¹²⁷⁻¹³⁰⁾.

Menciona Z. Chen *et. al.*, que para emplear un sustituto corneal en ingeniería de tejidos un biomaterial debe replicar los requerimientos estructurales y funcionales de una córnea nativa: soporte celular, rigidez mecánica, biocompatibilidad, transparencia, biodegradabilidad apropiada (en algunos casos) y compatibilidad clínica⁽¹³⁰⁾.

Otros investigadores consideran que la técnica de descelularización es una fuente de obtención de andamios corneales y preservación de la MEC. Una variedad de córneas porcinas y humanas han sido exitosamente descelularizadas por diferentes métodos incluyendo, el uso de factores químicos como los detergentes, tratamientos de ácidos y bases, combinación con alcoholes, agentes quelantes, soluciones hipo e hipertónicas; agentes biológicos enzimáticos y sueros humanos; y entre ellos factores físicos como la presurización o alta presión hidrostática congelación y descongelación, liofilización, gas nitrógeno, la agitación mecánica e intervalos de tiempos y temperaturas⁽⁸⁵⁾.

En investigaciones actuales, S. Sasaki, *et al.*, 2009, utilizó para el tratamiento de descelularización de córnea un método físico “ultra alta presurización hidrostática” (UHP por sus siglas en inglés “*ultrahigh hydrostatic pressure*”) que fue comparado con métodos químicos, SDS y Tritón X-100. Previo al inicio de descelularización, en todas las córneas utilizaron lavados con solución tamponada de fosfatos (STF o PBS por sus siglas en inglés phosphate buffered saline) con 100 unidades de penicilina y estreptomina y donde se almacenaron en PBS a 4°C con dextrano 3.5%. La inmersión en solución química fue en 1% de Tritón X-100 y SDS en 37°C por 24 horas

y lavadas de nuevo con la solución inicial. Para el caso de la técnica UHP las córneas fueron presurizadas en 10,000 atmósferas (atm) por 10 minutos. Como resultado histológico la córnea mostró en las concentraciones de los surfactantes residuos celulares inclusive permanencia de la capa epitelial y algunos queratocitos del estroma, mientras que la córnea descelularizada por el método UHP y tritón X-100 fueron los métodos que preservaron acelularidad, mientras que el contenido de ADN de la córnea nativa fue de $3.46 \pm 0.18 \mu\text{g}/\text{mg}$, en tritón X-100 $2.32 \pm 0.28 \mu\text{g}/\text{mg}$, SDS $1.16 \pm 0.21 \mu\text{g}/\text{mg}$ y UHP/10°C $0.12 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{mg}$, además el estudio menciona que los detergentes causaron edema corneal y una turbidez irreversible a comparación de la procesada por UHP, esto fue comprobado al sumergir los andamios procesados por los surfactantes en glicerol, así como un decremento en el contenido de GAGs indicó la disrupción de la supraestructura de colágena sugiriendo una fuerte desnaturalización⁽⁹⁷⁾.

En ese mismo año Ponce Márquez *et. al.*⁽⁹⁸⁾ desarrolla un material para la cicatrización de heridas y para la construcción de tejido corneal comparando y evaluando diferentes métodos que han sido utilizados para emplear descelularización. El primero deriva de un protocolo de descelularización vena umbilical humana con el surfactante SDS en una concentración de 1% donde la muestra es sumergida y se mantiene en agitación orbital por 12 horas, una vez pasado este tiempo, se realizan lavados de 3 a 5 tiempos en PBS por dos horas, posteriormente utilizan etanol al 75% en un lavado de 12 horas repitiendo el lavado; el segundo es un protocolo adaptado de un estudio en arterias de carótidas, donde las córneas son colocadas en tubos de 50 mL con etanol al 75% y estas incubadas a 20°C aproximadamente en un agitador orbital por un total de 72 horas, recambiando el solvente en tiempos de 1, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 horas, para posteriormente realizar lavados de 12 horas en agua destilada y por último fueron incubadas en un cuarto de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) por 96 horas en una solución estéril de tripsina-ácido etilendiaminotetraacético en 0.05% 1x; el tercer método fue adaptado de la descelularización que utilizó Badylak *et. al.* y Dejardin *et. al.*⁽⁹⁸⁾ para submucosa de intestino y tejido de vejiga urinaria en el cual varias formulaciones de ácido paracético (0.1-0.15% v/v) y etanol (4-20% v/v) fueron usadas en agua destilada en agitación por 2 horas en un agitador orbital y después fueron lavadas 3 veces por periodos de 15 min. en PBS seguido de una repetición de lavados ahora con agua destilada. En los 3 métodos de descelularización concluye que mantienen la MEC y resultan compatibles con el tejido corneal, así para probar la validación de estas técnicas, células fueron sembradas en la superficie de los tejidos tratados y mostraron buena biocompatibilidad además de evaluar por microscopía electrónica de barrido la organización remanente como también las propiedades biomecánicas donde no se encontró diferencia significativa entre los 3 métodos de descelularización.

En la universidad de Shandong, China, K. Pang *et. al.* en 2010 en busca de obtener un método mixto para descelularizar, emplearon una técnica con factores químicos y físicos para obtener una matriz corneal acelular sobre córneas porcino que fueron tratadas con una concentración de 0.5% de SDS (p/v) en agitación por 24 horas en

conservación en un cuarto de temperatura a 4°C. Después del método de descelularización el andamio estaba opaco y la transparencia fue restaurada tras ser sumergido en glicerol estéril al 100% por 30 minutos. Se confirmó una completa remoción de células por medio de la técnica de histológica HyE y tinción DAPI, las propiedades mecánicas fueron estuvieron bien preservadas. Por medio del ensayo MTT se determinó que los extractos no tuvieron citotoxicidad con células epiteliales, endoteliales y queratocitos, de esta manera no había signo de reacción inmune alrededor del diámetro del trasplante dentro de un periodo de monitoreo de 6 meses de la implantación. Estos resultados concluyen que el desarrollo de una matriz acelular de córnea porcina usando SDS podría ser un adecuado andamio corneal para la ingeniería tisular⁽¹³¹⁾.

En la universidad de Granada, España, M. Alaminos, realizó una comparación entre 2 métodos de descelularización (NaCl 1.5 M y SDS 0.1%). Previo a los procesos de descelularización para remover el epitelio y endotelio utilizaron 4 mg/mL de dipasa II por 45 min. a 37°C. Con una relación de masa-solución de 20:1 fueron lavadas con 10% de antibiótico-antimicótico en PBS por 10 minutos con una agitación de 200 c.p.m. Basándose en evaluaciones histológicas, bioquímicas y de niveles ópticos, resultó que el método de NaCl fue capaz de generar una córnea acelular con adecuadas propiedades ópticas e histológicas, por lo que el método de SDS resultó una desorganización fibrilar y un comportamiento óptico pobre entre las córneas, así, menciona que la estandarización por NaCl 1.5 M representa un método exitoso para ser desarrollado en la bioingeniería de córneas humanas con un potencial terapéutico⁽¹⁰⁰⁾.

Cinco años más tarde un grupo de investigadores definen el término de descelularización como el proceso por el cual son eliminadas las células de un tejido u órgano, pero todas las claves esenciales para la preservación celular y homeostasis son mantenidas en la estructura tridimensional de la matriz extracelular⁽¹⁰²⁾.

Ellos mismos analizaron modelos de descelularización y recelularización enfocándose en las características residuales de la MEC después de la descelularización, contemplando que el objetivo es minimizar cualquier influencia adversa en la composición, actividad biológica e incorrupción mecánica de la MEC remanente después de remover el material celular y nuclear de la córnea. Así mismo, hacen hincapié de que cualquier proceso que remueva células producirá una alteración en la arquitectura y tridimensionalidad de la MEC.

También, en el año 2015, Y. Hashimoto *et. al.* obtuvieron una matriz corneal por la metodología de descelularización alta presión hidrostática (High hydrostatic pressure, por sus siglas en inglés HHP), donde córneas porcinas fueron presurizadas hidrostáticamente en 980 MPa at 10°C por 10 min. para destruir células seguido de un lavado con medio EGM-2 para remover restos celulares. Utilizaron histología por HyE y demostraron la eficiencia de ese método, sin embargo, cuando la MEC fue

trasplantada en una queratoplastia lamelar anterior se observó un grado de opacidad que se recuperó después de 4 meses⁽¹³²⁾.

Por otro lado, M. González-Andrades, M. Alaminos, et al., analizaron la eficiencia de 4 protocolos de descclularización en córneas porcinas basados en cloruro de benzalconio, Igepal, SDS y tritón X-100 en concentraciones de 0.01, 0.05 y 0.1% a diferente tiempo (12, 24 y 48 horas), donde estipula que el procedimiento más eficiente fue el SDS en una concentración de 0.1% por 48 horas. Así mismo demostraron que este método permite preservar la integridad de la membrana de Bowman y Descemet, aunque la estructura de colágena fue parcialmente alterada. Y en todos los grupos se mostró una alta preservación del contenido de colágena en la MEC con un respeto en la orientación dada principalmente por el SDS⁽¹²⁷⁾.

Otros trabajos de investigación se enfocaron en utilizar un método descclularizante que involucra el factor biológico, químico y físico en la córnea porcina completa con digestión enzimática con dipasa II por 45 min a 37°C y posteriormente 1.5 M de NaCl en agitación continua de 200 c.p.m. por 12 horas en un cuarto de temperatura con sus respectivos lavados finales de PBS por 30 min cada uno. Al botón corneal residual se realizaron cortes de 20 µm de espesor obteniendo hojas de estroma corneal acelular. Estas fueron utilizadas en un modelo de regeneración estromal en una queratoplastia lamelar injertando 5 laminillas del andamio con previa siembra de queratocitos. Después de 6 meses de ser implantadas, la transparencia se recuperó confirmándose con una examinación por tomografía óptica coherente y de transmitancia, de igual forma el análisis de las propiedades biomecánicas demostraron una similitud a una córnea normal. En el grupo experimental un análisis histológico mostró una distribución adecuada de queratocitos bien orientados en la capa del estroma gracias al modelo de siembra “sándwich”, donde se creó que los queratocitos juegan un papel esencial y potencialmente exitoso para la regeneración estromal⁽¹³³⁾.

Las investigaciones con córnea porcina son prometedoras porque comparte una similitud anatómica con la córnea humana, esto lo confirma un estudio de descclularización donde generaron un andamio y cultivaron células epiteliales y fibroblastos humanos sobre el biomaterial acelular para reemplazo lamelar anterior derivado de porcino. El andamio fue preparado con 0.5% de SDS (p/v) a 4°C sobre agitación por 24 horas, obteniendo un estado opaco post-descclularizado en el cual al sumergirlo por 5 min. en glicerol estéril al 100% la transparencia fue restaurada. Como resultados se obtuvo de una completa remoción de células confirmadas por la tinción HyE y ausencia de material nucleico por DAPI, posteriormente cultivaron fibroblastos y células epiteliales siendo evaluadas por el ensayo MTT. En este mismo andamio se injertaron fibroblastos y fueron cultivados por 3 días, posteriormente, se injertaron células epiteliales en la superficie del andamio por otros 10 días. El reemplazo lamelar anterior fue evaluado por HyE e inmunohistofluorescencia detectando la expresión de citoqueratina 12 en epitelio y vimentina en estroma⁽¹³⁴⁾.

Con estos antecedentes, investigadores del Instituto de Oftalmología en Shaanxi, provincia de China, fueron motivados a estandarizar métodos de descelularización donde predominó la metodología química-biológica y consideraron cambiar el modelo animal de porcino a avestruz con el mismo objetivo de obtener de un andamio para reconstruir un daño corneal. Ellos utilizaron córnea de avestruz en una solución salina hipertónica de NaCl al 20% por 48 horas a 37°C combinado con un método de digestión enzimática de tripsina al 0.13%, fueron lavadas durante 48 horas y al finalizar se realizaron lavados con agua ultra pura en recambio de 3 tiempos por 30 minutos cada uno. Para almacenarse se utilizó cloruro de calcio en un cuarto de temperatura hasta 2 días de conservación. Al evaluar la microestructura y propiedades biomecánicas de este andamio se observó una buena preservación y no tuvo efectos inhibidores de proliferación en células epiteliales, endoteliales y en queratocitos. Después de ser implantada mostró mejor transparencia a comparación de una córnea porcina⁽¹³⁵⁾.

En una revisión del 2017, mencionan diferentes métodos de obtención de sustitutos corneales, entre ellos catalogan a la descelularización como un método de conservación de propiedades mecánicas y ópticas similares a córnea nativa con baja inmunogenicidad, uso como sustrato para regeneración y suministro epitelial corneal como para endotelio. Catalogado por la biocompatibilidad eficiente, transparencia óptima, una dureza y biodegradabilidad adecuada, baja permeabilidad con estatus clínico para desarrollo en animales⁽¹³⁰⁾.

Muchos investigadores han estandarizado técnicas de descelularización, así mismo corroboraron la acelularidad de las membranas descelularizadas, sin embargo, algunos experimentos no incluyen la parte de la caracterización bioquímica estructural detallada de la matriz corneal residual que es importante para demostrar que la matriz residual puede ser funcional al ser implantada.

4. Justificación

La ingeniería tisular y la medicina regenerativa puede ser una solución alternativa para resolver la ceguera corneal en situaciones de escasez de córnea y rechazos a los injertos corneales.

5. Hipótesis

Los andamios de córneas bioartificiales procesados por técnicas de descelularización se comportan como un sustituto corneal.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Diseñar un sustituto corneal bioartificial que imite las características anatómicas, físico-bioquímicas y ópticas de la córnea humana.

6.2. Objetivos específicos

1. Extraer botones corneales porcinos.
2. Probar un método de descelularización con uso de SDS.
3. Evaluar por tinción histológica la presencia de células en el tejido corneal descelularizado.
4. Identificar el material nucleico residual post-descelularizado del andamio por medio de un marcador fluorescente.
5. Cuantificar la presencia de ADN en el andamio después del proceso de descelularización por fluorometría.
6. Caracterizar las propiedades estructurales, físico-bioquímicas y ópticas del andamio.
 - 6.1. Evaluar la topografía superficial y estructural del andamio por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB).
 - 6.2. Identificar la composición bioquímica elemental del andamio por medio de espectrometría Raman.
 - 6.3. Evaluar el perfil termodinámico del andamio por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC).
 - 6.4. Determinar el punto de degradación y destrucción térmica del andamio por medio de análisis termogravimétrico (TGA).
 - 6.5. Evaluar las propiedades ópticas del andamio (transparencia, índice de refracción y comportamiento del andamio en un medio acuoso) por refractometría por reflexión (RR).

7. Materiales y métodos

7.1. Procuración corneal

En un rastro certificado para consumo humano provenientes de una granja “Promotora de cerdos, S.A. de C.V.” Jalisco, avalada por la Secretaría de Desarrollo Rural de Jalisco (SEDER) y regulada por el Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA) quién otorga certificación, se obtuvieron globos oculares de porcino masculino de 8 meses a 1 año de edad, a 4 horas *post-mortem* y fueron transportados al laboratorio en solución de transporte, conformada por 30 mL de solución salina con 0.1% antibióticos (penicilina/estreptomicina) dentro de tubos Falcón por ojo procurado dentro de un contenedor térmico conservando una temperatura de 4°C.

Dentro de un campo estéril, cada botón corneal se aisló utilizando hojas de bisturí del No. 15 y pinzas de curación realizando una incisión siguiendo el diámetro limbar. Posteriormente cada córnea de un peso promedio de 268.62 mg (dato por triplicado) y de un diámetro de 12 a 14 mm se colocó en un tubo Falcón con 10 mL de PBS $pH = 7.4$, con 0.1% de antibióticos y se realizándose 3 lavados en agitación a 50 c.p.m. con recambio de solución fresca de 15 min. cada uno.

7.2. Descelularización

Una vez terminado el lavado post-extracción, se retiró el medio de lavado de las córneas y se agregaron 10 mL de 0.5% SDS incubándose en agitación constante a 20 c.p.m en un oscilador a 4°C dentro en un cuarto de refrigeración por 24 horas.

Posteriormente a este proceso de incubación, el detergente fue retirado de los contenedores y las córneas fueron embebidas con 10 mL de PBS, realizando 4 lavados con 10 mL de PBS y 2 últimos adicionando 0.1% de antibióticos (penicilina y estreptomicina), agitación constante de 40 c.p.m. con intercambio de solución nueva cada 15 minutos.

Finalmente, para su almacenamiento los andamios descelularizados fueron sumergidos en 10 mL de PBS hasta el uso experimental.

7.3. Evaluación de descelularización

7.3.1. Evaluación histológica por hematoxilina y eosina.

Córneas nativas a 4 horas *post-mortem* y córneas descelularizadas se sumergieron en formalina amortiguada al 10% en una proporción en volumen de 10/1, donde el tiempo de fijación fue de 12 a 24 horas dependiendo el tamaño. Transcurridas las 24 horas se lavaron en agua corriente para eliminar la solución fijadora y se llevó el paso de deshidratación.

Una vez completado el tiempo de fijación los tejidos se extrajeron de la formalina y se colocaron en un tren de deshidratación conformado por alcoholes ascendentes y xiloles, todos por una hora de permanencia: alcohol etílico al 60%, 70%, 80%, 96% I, 96% II, alcohol absoluto I, absoluto II, alcohol – xilol y alcohol absoluto en partes iguales, xilol I, y xilol II.

A continuación, el paso de la orientación e inclusión en parafina se llevó dentro de un molde de inclusión de platina dentro del Histokinette a 56°C en el orden de parafina I y II. Una vez obtenida la muestra dentro del cubo/bloque se montaron en un micrótomos donde se realizó un corte de 5 µm. Estos cortes del tejido pasan a extenderse en una tina de flotación con agua para extenderlos en un portaobjetos. Una vez que se sujetan los cortes en un portaobjetos se dejan secar a temperatura ambiente, posteriormente se colocan en una plancha con una temperatura de 58 a 60°C para que se adhiera el corte al portaobjetos, mínimo por 15 min.

Una vez adherido el corte al portaobjetos se llevó al tren de tinción de rutina: xilol I por 10 min., xilol II por 10 min., (posteriormente cada sustancia siguiente permaneció de 10 a 15 baños por 1 min. más o menos) xilol – alcohol absoluto I, alcohol absoluto II, alcohol de 96% I, alcohol de 96% II. Se hidrataron en agua corriente de 3 a 5 min., se sumergieron en hematoxilina de Gill por 10 min., se lavaron en agua corriente por 5 min. para eliminar el exceso de hematoxilina, se viró (cambió el tono de la hematoxilina) en solución de Scott por 1 min., igualmente se lavó en agua corriente para eliminar el exceso del virador, contrastando con eosina por 1 min. aproximadamente.

Después se deshidrata por alcoholes ascendentes, en todos se realiza de 10 a 15 baños de 1 minuto aproximadamente: alcohol de 96% I, 96% II, 100% I y 100% II y se aclara en alcohol – xilol, xilol I y xilol II, estos últimos por 2 min.

Para montar o poner el cubreobjetos se utiliza una resina sintética utilizando un medio de montaje, se deja secar las laminillas y llevan al microscopio óptico para ser observadas a diferentes magnificaciones óptimas (10x y 20x) con la finalidad de presenciar células presentes en los tejidos procesados (muestra nativa – descelularizada).

7.3.2. Tinción fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol

Se obtienen laminillas de cortes histológicos sin tinción, e inicia la fase de desparafinación, se colocan en una plancha térmica con el tejido en la parte superior (boca arriba), donde la temperatura sube progresivamente de 0 a 62°C demorando un lapso de 25 min. aproximadamente y adicionalmente se espera 15 min. más a que la parafina desaparezca.

Las laminillas se colocan en una rejilla e inicia el tren desparafinación donde se sumergieron 3 veces en diferente xilol al 100% por 10 min. para que tenga mayor pérdida de cera consecutivamente (de manera progresiva porque el tercero es solvente más fuerte, ya que el primero y segundo tiene mayor contenido de cera).

En la fase de hidratación, las laminillas dentro de la rejilla, pasan por un tren de hidratación que primeramente se sumergen dos veces en diferente solución de etanol al 100% por 3 minutos con 20 baños previos, repitiendo este paso con etanol al 96%, 70% y 60% con su respectivo cambio. Posteriormente, las laminillas se colocan en un vaso coplin y se hidratan agregando agua miliQ hasta que el agua cubra la parte superior del tejido adherido en la laminilla durante 5 min.

Después de la hidratación del tejido, las laminillas se colocan en unos racks con el tejido en la cara interna de manera hermética y estos racks se colocan en un porta racks donde se llevará la permeabilización por inmersión en detergente. Se agrega 4 gotas de PBS inmuno/washer/DNA (PBS + Tween 20) por 5 min. repitiendo este paso 3 veces.

Una vez transcurrido este paso se coloca a cada laminilla 200 μ L de PBS diluyente (PBS + Tween 20 + albúmina al 2%) por 20 min. Después de transcurrir los 15 min. por cada laminilla se agregará a cada rack 200 μ L de PBS diluyente con el marcador DAPI en relación 1:1000 y posteriormente se cubre el porta racks con papel aluminio por la fotoactividad del marcador DAPI con luz solar.

Por último, se realizan lavados con 4 gotas de PBS inmuno/washer/DNA a cada compartimiento del porta rack. Después de transcurrir 15 min. se retiran los racks desprendiendo las laminillas de una manera muy sutil para no despegar el tejido y en cada laminilla en la cara donde se encuentra el tejido se coloca con ayuda de un palillo una gota de glicerol, consecutivamente, se coloca un cubreobjetos y se sellan los bordes con barniz transparente dejando secar 2 min. aproximadamente.

Las laminillas son observadas en un microscopio óptico AmScope modelo FL-LED con filtro UV (λ excitación 359 nm), sin utilizar la fuente de luz para observar la fluorescencia (emisión 461 nm) con el programa "AmScope".

7.3.3. Cuantificación de ADN por fluorimetría

La cuantificación de ADN fue obtenida por la utilización de Kit Qubit y el fluorómetro (Qubit 2.0) siguiendo el protocolo indicado, como también se estandarizó un método de cuantificación por triplicado con su respectiva curva de calibración donde posteriormente se aplicó una estadística.

Fragmentos de 200 mg de peso húmedo de córnea nativa y del andamio acelular fueron triturados mecánicamente y agregados un tubo eppendorf de 2 mL con 500 μ L de buffer para lisis celular (Gibco R2) por 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 13,000 c.p.m. durante 5 min. obteniendo un pellet/sobrenadante en la parte inferior del tubo eppendorf y después pasó por agitación en un vortex por 10 segundo para homogenizar la solución.

En la preparación de los reactivos, la calibración y estándares control se prepararon de la siguiente forma: el primer, estándar 1 (0ng/ μ L) confirmado por 190 μ L + 10 μ L de Qubit dsDNA BR Standar 1, y el segundo, estándar 2 (100ng/ μ L) 190 μ L + 10 μ L de Qubit dsDNA BR Standar 2, ambos colocados en un tubo eppendorf para ser leídos por el fluorómetro Qubit 2.0 y registrarse como estándares.

Posteriormente, para cada muestra por triplicado se calculó el total de solución utilizada siguiendo el procedimiento: Se obtuvo una solución de trabajo donde se utilizaron 199 μ L de Qubit dsDNA BR PBS más 1 μ L de Qubit ds DNA BR Reagent por cada muestra a cuantificar (cantidad total 200 μ L). La solución total de todas las muestras se vertió en un tubo de 10 mL para recolección de muestras.

Para su respectiva curva de calibración se decidió utilizar 20, 15 y 10 μ L del buffer de lisis con el material nucleico homogeneizado, por lo tanto, se aisló cantidades de 180, 185 y 190 μ L de la solución total de trabajo para su respectiva calibración, dando un total de 200 μ L en un tubo eppendorf.

Finalmente, cada muestra calibrada fue leída por el fluorómetro Qubit 2.0. seleccionando el tipo de ensayo ds DNA (*double strand*) y ss DNA (*single strand*) para cada muestra. La estandarización consistió en realizar la curva de calibración para corroborar una equivalencia en las concentraciones de 20, 15 y 10 μ L y esperar un lapso de 4 min. después de ingresar las muestras en el fluorómetro para evitar la sobre excitación luminosa del exterior asegurando una lectura certera. Después de cada lectura se dejó un lapso 20 segundos en el cambio de ds DNA a ss DNA y se realizó este procedimiento por triplicado. Posteriormente al obtener los valores de cada curva de calibración de las muestras por triplicado se obtuvo un promedio de cada una y se aplicó un análisis estadístico con el programa que se analizó "PAST 4.01". La normalización se realizó con la prueba de *Shapiro Wilk* (n=4) con una significancia de 0.05, la cual, mostró que los datos no seguían una distribución normal, por lo que se optó por realizar el análisis no paramétrico "*U de Mann-Whitney*".

7.4. Caracterización del andamio

7.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido

El tejido corneal nativo y descelularizado se cortaron perpendicularmente a la superficie convexa del botón corneal y pasaron a ser deshidratados sin alterar la estructura por medio de la técnica de secado de punto crítico (SPC). Fueron fijados en glutaraldehído al 2.5% en PBS por 1 hora y al finalizar se lavó con PBS cada muestra 3 veces por 5 minutos. Se repitió el procedimiento con una post-fijación con tetraóxido de osmio al 1% en PBS por 1 hora y de nuevo se realizaron 3 lavados en PBS, en cada muestra por 5 minutos. Ya concluida esta parte, los tejidos se deshidrataron sumergiendo las muestras en alcoholes ascendentes iniciando con alcohol al 30%, realizando un recambio con incremento de 10% cada 10 minutos hasta llegar a 90%, después se sumergieron en etanol absoluto 3 veces por 10 min cada uno y se ingresaron en una secadora de punto crítico de marca *Electron Microscopy Sciens* (EMS) y se montaron en un portamuestras de aluminio para recubrirse en oro y observarse por un microscopio electrónico de barrido JEOL Modelo JSM-6380 LV a un voltaje de aceleración de 15 *Kvolts*.

7.4.2. Espectroscopía Raman

Previo a la caracterización por espectroscopia Raman, la córnea nativa y andamio descelularizado se liofilizaron. Se ingresaron en un matraz para liofilizar con filtro y fondo redondo, este se puso por 24 horas en un congelador a -47.0°C . Posteriormente al transcurrir este tiempo, los matraces sellados se conectaron a la cámara de sublimación del equipo liofilizador Muestra abriendo la llave del vacío y una vez encendido el equipo, a una presión regulada de 0.045 mBar a -45°C de temperatura, las muestras permanecieron por 24 horas. Finalizando las 24 horas, se apagó el funcionamiento del equipo, se cerró el vacío y se abrió la llave para liberación y disminución de presión de tal forma que también subió la temperatura gradualmente hasta llegar a temperatura ambiente. Se retiraron los matraces recubriéndose con parafilm de la parte superior hasta su uso.

Las muestras liofilizadas se colocaron en un portaobjetos y fueron escaneadas por un microscopio confocal Raman Witec modelo *alpha300* con una línea de láser verde de 532 nm de excitación, utilizando una potencia de 3.4 mW en la córnea nativa en la cara anterior y posterior y en el andamio liofilizado con una potencia de 14.4 nW, ambos con un tiempo de integración de 3 segundos y 20 acumulaciones con un intervalo espectral de $100\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$, utilizando un objetivo de 50x, se tomaron espectros puntuales.

7.4.3. Análisis térmico

7.4.3.1. Calorimetría Diferencial de Barrido

Previo al análisis DSC las muestras hidratadas de córnea nativa y córnea descelularizada fueron ponderadas en una balanza analítica modelo BXX31, BOECO, Alemania. A pesos similares de 1.90 mg en cada muestra.

Las muestras ponderadas se encapsularon con el instrumento *Tzero Press* para sellar las cápsulas conteniendo las muestras y ser analizadas en el instrumento en DSC Q200 en una secuencia de aumento de temperatura ambiente a 200°C con una rampa de 5°C por minuto en ciclo completo (calentamiento y enfriamiento) tomando como referencia una cápsula vacía en un ambiente inerte de nitrógeno. Esta prueba se corrió por triplicado.

7.4.3.2. Análisis Termogravimétrico

Previo al análisis TGA las muestras hidratadas de córnea nativa y córnea descelularizada fueron ponderadas en una balanza analítica modelo BXX31, BOECO, Alemania. A pesos similares de 1.90 mg en cada muestra.

Las muestras ponderadas de un diámetro ≤ 0.5 mm se colocaron dentro de una bandeja de platina parte del instrumento TGA Q500 con una velocidad térmica de 5°C por min. hasta 250°C de ciclo completo con un ambiente inerte de nitrógeno. Esta prueba se corrió por triplicado.

7.4.4. Refractometría por Reflexión

Posteriormente al proceso de descelularización, la córnea descelularizada fue fijada en formaldehído al 10% por 24 horas y se realizó el proceso de parafinación (descrito en la técnica de tinción fluorescente DAPI). Una vez obtenido el bloque de parafina con la muestra, se realizó con el micrótopo cortes de 10 μm y estos fueron colocados en un cubreobjetos de 150 μm de espesor de manera distribuida y por triplicado.

Las cortes de las muestras pasaron por un el tren de desparafinación con lavados de xilol hasta el alcohol 100% (ya descrito en la inmunohistofluorescencia DAPI) manteniendo un estado deshidratado y libre de parafina.

Las películas del andamio colocadas en cubreobjetos con un diámetro de 5 mm fueron adheridas en su parte posterior a la parte plana del cilindro centralmente con la técnica "index matching".

La lectura óptica de reflectancia se realizó en condiciones de oscuridad utilizando un láser de 530 nm incidiendo en la parte central de la muestra realizando un recorrido de 10-80°.

Primeramente, se realizó midiendo la curva de referencia correspondiente al prisma sin muestra (interfaz vidrio/aire) que se utiliza para normalizar las mediciones subsecuentes. Posteriormente se midieron dos variaciones de sustancia-material: película hidratada con agua desionizada (miliQ) y glicerol al 100%, agregando 10 μL de las sustancias encima de la biopelícula. Consecutivamente en la cuarta lectura se volvió a leer la biopelícula hidratada con agua miliQ, pero se tapó con un segundo cubreobjetos la misma muestra para borrar la respuesta óptica de la superficie rugosa.

8. Resultados

Los resultados que se muestra en esta sección se refieren a la evaluación y la caracterización del andamio obtenido una vez concluido el proceso de descelularización. Primeramente, se mostrarán los resultados del estado acelular por la evaluación de la descelularización realizada, posteriormente, el resultado de la evaluación de la microtopografía y estructura residual del biomaterial, después se mostrarán las características fisicoquímicas del andamio en particular la identificación de las proteínas residuales después de llevar a la descelularización, el análisis de la caracterización térmica y finalmente la interpretación de la evaluación de las propiedades ópticas del andamio corneal pensadas en el uso trascendental que puede tener. Lo que plasmará la base para un análisis integral de la estructura obtenida por el método descelularizante.

8.1. Procuración corneal

Se extrajeron globos oculares a las 4 horas *post-mortem* y fueron transportados al laboratorio en solución de preservación a 4°C dentro de un contenedor térmico. En un campo estéril y con material quirúrgico, el botón corneal fue aislado exitosamente siguiendo el trayecto del anillo esclerocorneal. Se obtuvo córneas transparentes con un diámetro total de 15 mm horizontal y 14 mm vertical (figura 33). Botones corneales fueron lavados en PBS con antibióticos 3 veces por 15 min en agitación de 20 c.p.m.

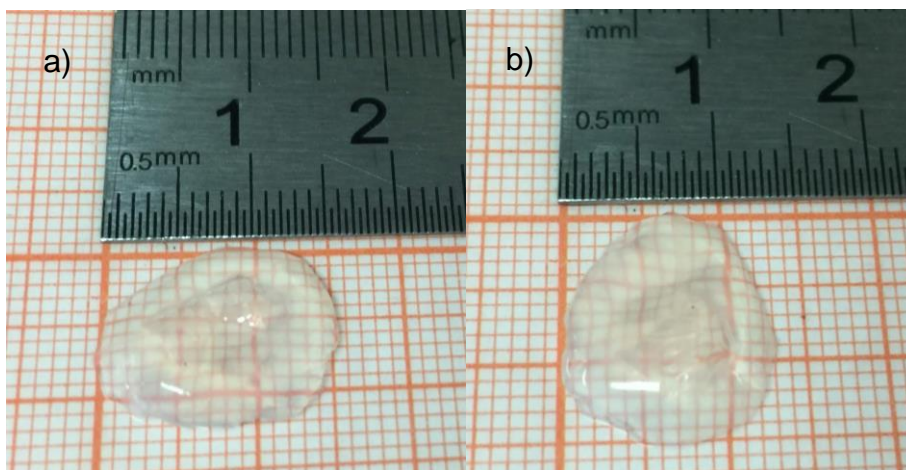


Figura 33. Botón corneal porcino transparente. a) diámetro horizontal de 15 mm; b) diámetro vertical de 14 mm.

8.2. Descelularización

Se realizó el procedimiento de descelularización en botones corneales empleando la metodología químico-física (SDS a 0.5%, agitación, temperatura y tiempo), y al término de la descelularización se lograron observar córneas edematizadas por el tiempo de permanencia en un medio acuoso, por lo que se notó un aumento del espesor corneal considerablemente, sin embargo, el diámetro horizontal se mantuvo conservado, mientras que la edematización que denota fue en la altura (Figura 34).

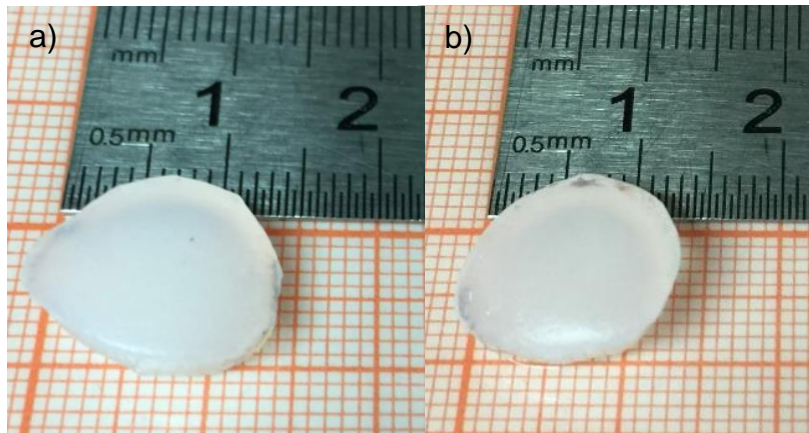


Figura 34. Botón corneal descelularizado. a) diámetro de 15 mm horizontal; b) 14 mm vertical. Se observa un grado de turbidez significativo a consecuencia de la ausencia de células como de las uniones entre ellas, esencial para la homeostasis y osmosis por líquido dentro de la matriz extracelular.

8.3. Evaluación histológica por hematoxilina y eosina

Una vez empleada la tinción por HyE, en los cortes de las muestras de 5 μm de espesor se observó por microscopía óptica con una magnificación de 10x los 5 estratos corneales de la muestra control (epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio) (figura 35 a, c y e).

En el epitelio, se observa la configuración de células desde membrana basal (borde inferior de la capa epitelial que inicia con células cúbicas al término del borde inferior limitante del epitelio). La migración sigue el trayecto hacia la superficie, iniciando por la membrana basal, células cilíndricas, aladas y planas.

Se logra observar la membrana de Bowman. Esta es el trayecto libre de células después de la membrana basal a la primera visualización lineal de los queratocitos del estroma. Posteriormente en el estroma, hay una distribución equidistante de los queratocitos. Por otro lado, en el estroma anterior se logra observar espacios blancos libre de matriz extracelular y células que son atribuidos al trayecto de los nervios sensitivos corneales derivados de los nervios ciliares largos y cortos de la rama oftálmica del nervio trigémino (V par craneal).

En el estroma central y posterior la compactación entre las fibras de colágena es más estrecha hasta llegar la membrana de Descemet (espacio o transición libre de células que conecta con endotelio). Un estado intacto es atribuido a la monocapa endotelial con organización celular paralela.

A diferencia de la córnea control, el biomaterial corneal se caracteriza por un estado acelular donde se visualiza completa eliminación celular sin evidencia de núcleos teñidos y dispersos en ningún estrato corneal (figura 35 b, d y f).

En el análisis histológico mostró que el procedimiento de descelularización fue capaz de preservar la integridad de las membranas de Bowman y Descemet como el estroma corneal. La membrana de Bowman es continua y sigue el trayecto superficial.

En el estrato corneal se logra observar un estado libre de células con un patrón espacial adicional al trayecto de los nervios corneales; estos espacios son atribuibles a la ausencia de queratocitos, pérdida de uniones célula-MEC y GAGs, con una apariencia de ampliación o estiramiento del espacio celular posiblemente por el método de agitación en el que fueron procesados los botones corneales. Cabe mencionar que las lamelas de colágena estromal preservan un paralelismo horizontal entre ellas respetando la ortogonalidad corneal. De esta manera las lamelas de colágena muestran discreta organización en su trayecto con mayor organización en el estroma anterior y parcial desorganización en el estroma posterior hasta membrana de Descemet.

La membrana de Descemet es la capa con mayor desestructuración ya que a consecuencia de la pérdida de la monocapa endotelial, así como la epitelial, encargadas del metabolismo corneal propician un desequilibrio osmótico dentro de la MEC y durante el proceso de descelularización ocurre una edematización general, razón por la que el andamio corneal aumenta su espesor significativamente.

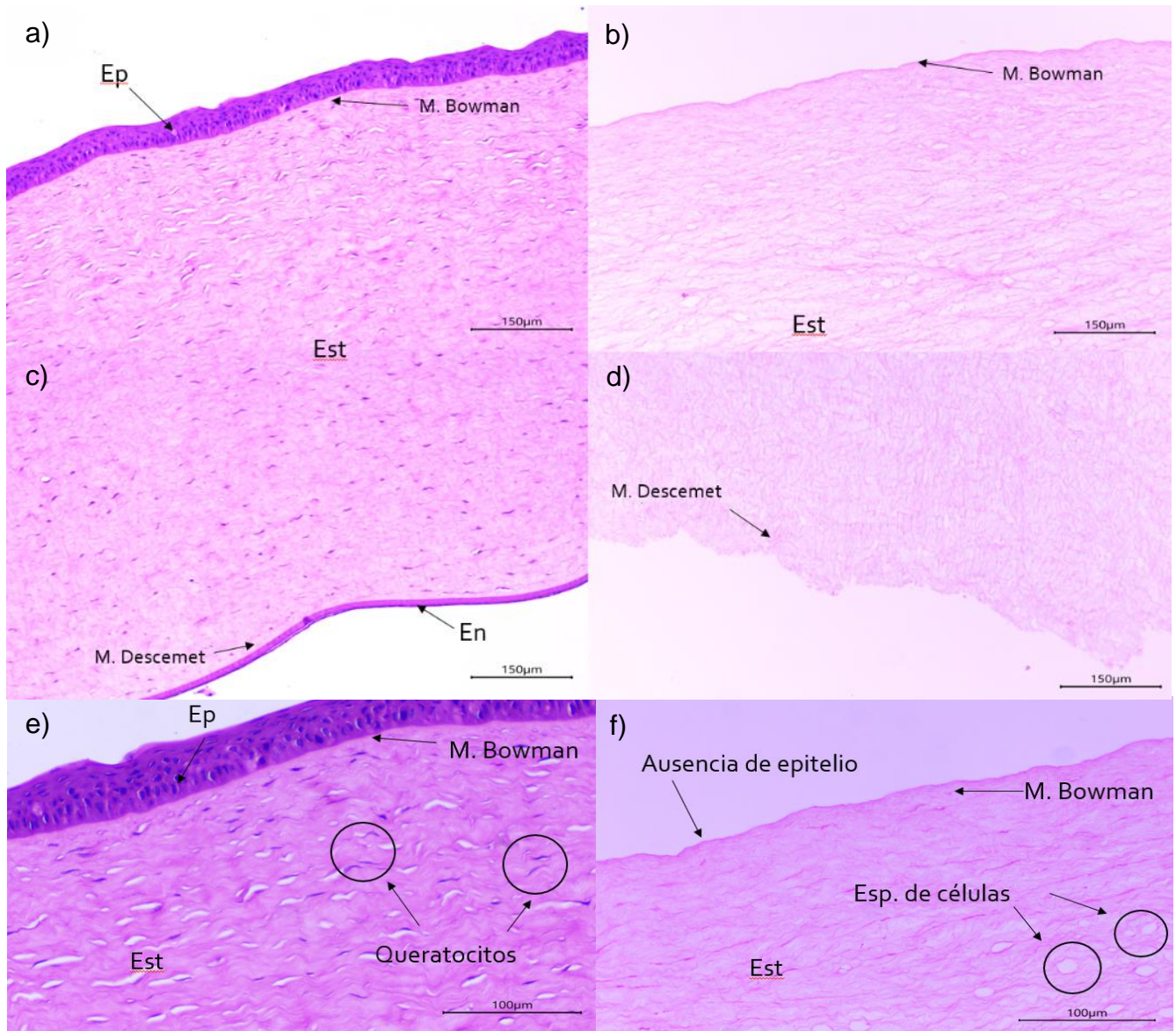
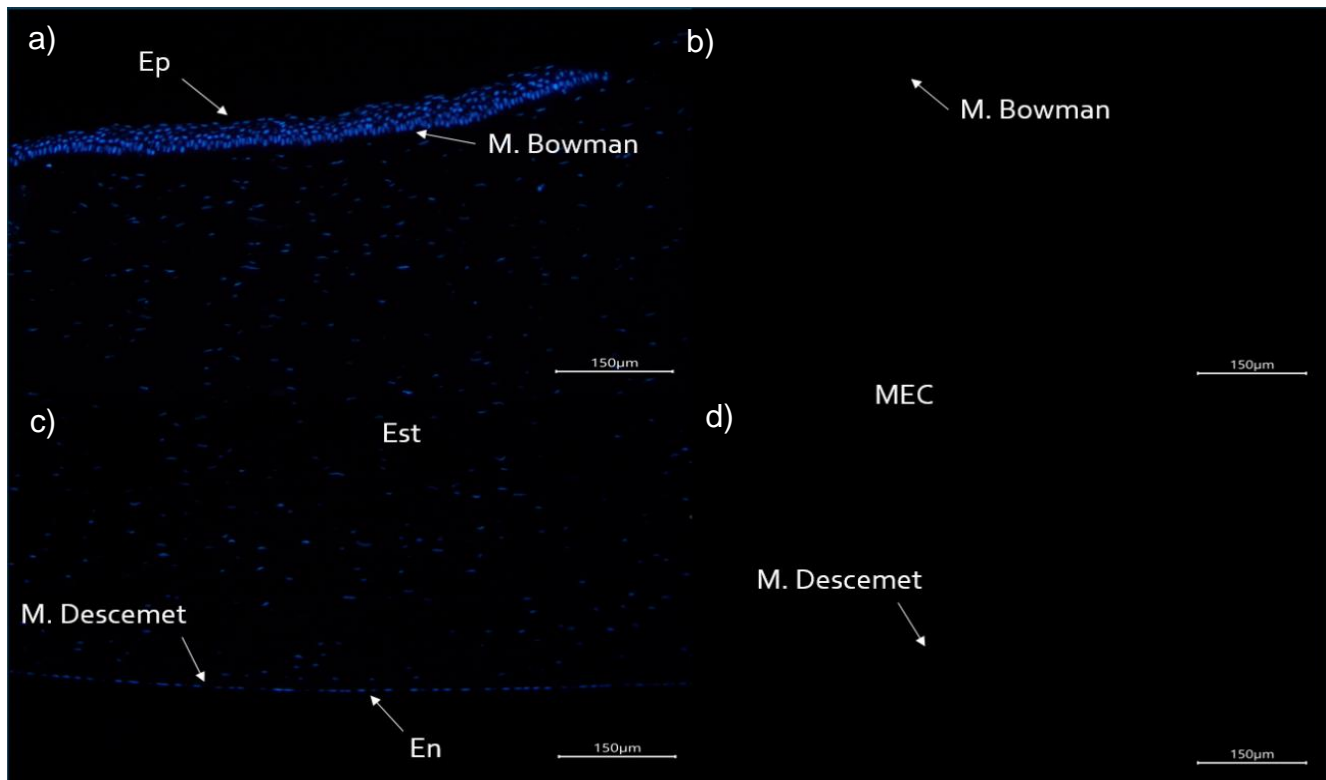


Figura 35. Reconstrucción de cortes histológicos observados a una magnificación de 10x y 20x de córnea nativa (a, c, e) y córnea descelularizada (b, d y f), las imágenes forman espesor completo de la córnea control y un espesor parcial debido a la edematización de la córnea descelularizada. a y c) 10x, se puede observar en córnea nativa el epitelio (Ep) en la parte superior, membrana de Bowman (M. Bowman), estroma (Est) con sus divisiones anterior, medial y posterior, consecuentemente la membrana de Descemet (M. Descemet) y endotelio (En) en la parte inferior. Remarca la presencia celular en todos sus estratos localizada por la tinción nuclear; b y d) 10x de la córnea experimental muestra la preservación en la integridad de la M. Bowman, la matriz estromal y la M. Descemet sin tinción o presencia celular con una conservación de la integridad de las fibras de colágena siguiendo un trayecto paralelo; e) 20x, córnea control, muestra la conformación de células epiteliales y distribución de los queratocitos en estroma; f) 20x, andamio, ausencia de células epiteliales y queratocitos de estroma, evidenciando espacios intraestromales (Esp. de células) y lamelas de colágena paralelas.

8.4. Tinción fluorescente 4',6-diamino-2-fenilindol

La identificación nuclear de células en la córnea control por fluorescencia DAPI fue positiva, ya que la expresión del marcador DAPI se adhirió a las regiones de adenina y timina en la doble cadena de ADN en las células de cada estrato observadas a una magnificación de 10x y 20x (figura 36). Esta ubicación celular hace referencia a la descripción anatómica mencionada en la tinción por HyE. En la córnea experimental a una magnificación de 10x y 20x no se detecta fluorescencia de núcleos celulares en ninguno de los estratos corneales, imágenes oscuras por la ausencia de células sus núcleos, solamente se logra evidenciar discretamente escasos restos nucleares dispersos, por lo que compete una fluorescencia negativa (figura 33). Esta observación puede entenderse como una completa eliminación de células y una eficiencia del método de descelularización que fue capaz también de remover el material nuclear del andamio, confirmando una completa descelularización de córnea.

Esta prueba fue de utilidad para corroborar y evidenciar por condiciones diferentes a la convencional, si restos nucleares estaban presentes y no fueron detectados por histología con HyE.



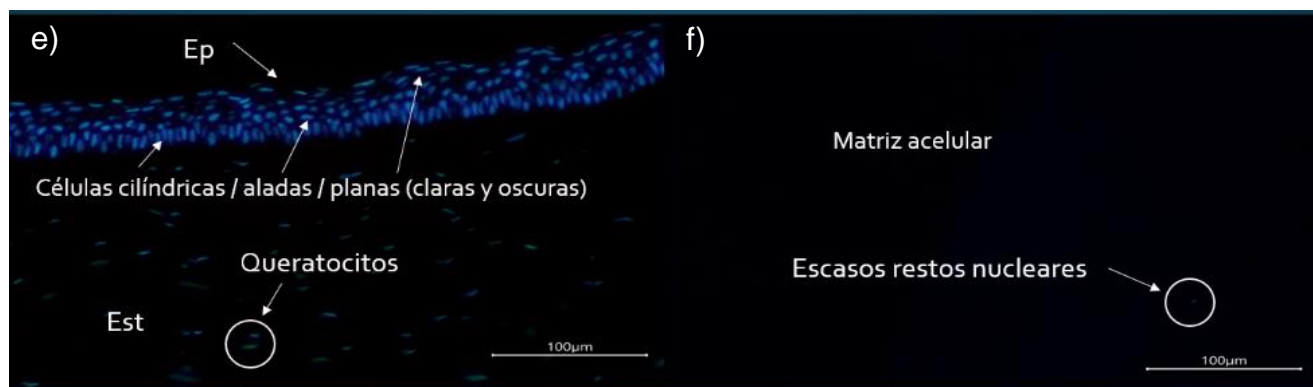


Figura 36. Reconstrucción de córnea con fluorescencia DAPI. a y c) imagen de córnea control 10x, se observa estratos corneales con su organización celular anatómica, epitelio (Ep), membrana de Bowman (M. Bowman), estroma (Est), membrana de Descemet (M. Descemet) y endotelio (En); b y d) imagen de córnea experimental 10x, se observa ausencia de fluorescencia de núcleos celulares; e) magnificación a 20x de córnea control, muestra una distribución normal de células epiteliales y queratocitos en estroma; f) magnificación de 20x de córnea experimental, mostrando ausencia de células dejando la matriz extracelular con escasos restos nucleares.

8.5. Cuantificación de ADN por fluorimetría

La cuantificación de ADN de doble y simple cadena se realizó bajo la estandarización mencionada anteriormente con lectura por fluorimetría en muestras control como experimentales, con una curva de calibración de 20, 15 y 10 μL de la muestra en solución de trabajo.

Primeramente, se obtuvo un promedio del peso de las córneas nativas de 268.62 mg y de córneas descelerizadas hidratadas de 589.95 mg. Donde se tomaron 200 mg para iniciar el proceso de cuantificación con su respectiva curva de calibración. Los promedios de la cuantificación de ADN por triplicado en ambos grupos se muestran en la [tabla 1](#).

Tabla 1. Promedio de las lecturas por triplicado de la cuantificación de ADN de cadena doble (ds) $\mu\text{g/mL}$ y cadena simple (ss) ng/mL de 2 grupos aplicando la respectiva diferencia de fluorescencia control (24.3 ng/mL) en ss DNA, en esta tabla los resultados se convierten a ng/mL : córnea nativa (CN 1-4) y andamio descelerizado (AD 1-4). Cada grupo mostrando su respectiva concentración de calibración (20, 15 y 10 μL).

<Grupos	Tipos	dsDNA20	dsDNA15	dsDNA10	ssDNA20	ssDNA15	ssDNA10
CN1	1	188.66	152.66	142.66	153.70	122.30	115.03
CN2	1	149	128	115.33	119.70	102.36	91.03
CN3	1	156.33	122.33	122	125.70	97.03	96.70
CN4	1	145.33	119.66	117.33	116.7	94.36	92.7
AD1	2	108.33	83.30	99.23	85.70	63.83	77.70
AD2	2	113.66	108.66	101.00	89.70	85.03	79.70
AD3	2	107.33	102.33	101.33	83.36	79.36	78.36
AD4	2	129.33	114.66	107.33	103.36	90.36	84.70

Se analizaron los datos obtenidos con el programa *PAST* 4.01. y se realizó la prueba *Shapiro Wilk* para analizar la normalización de datos, resultando con que no tuvo normalidad entre los datos, por lo que se optó por realizar la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney* para comparar los grupos controles contra los grupos experimentales en todas las condiciones. Se utilizó un valor de $\alpha < 0.05$. Para corregir los datos, se utilizó una permutación de *Monte Carlo* con la cual se pudo calcular una permutación exacta para obtener un valor preciso de P (Figura 37 a y b).

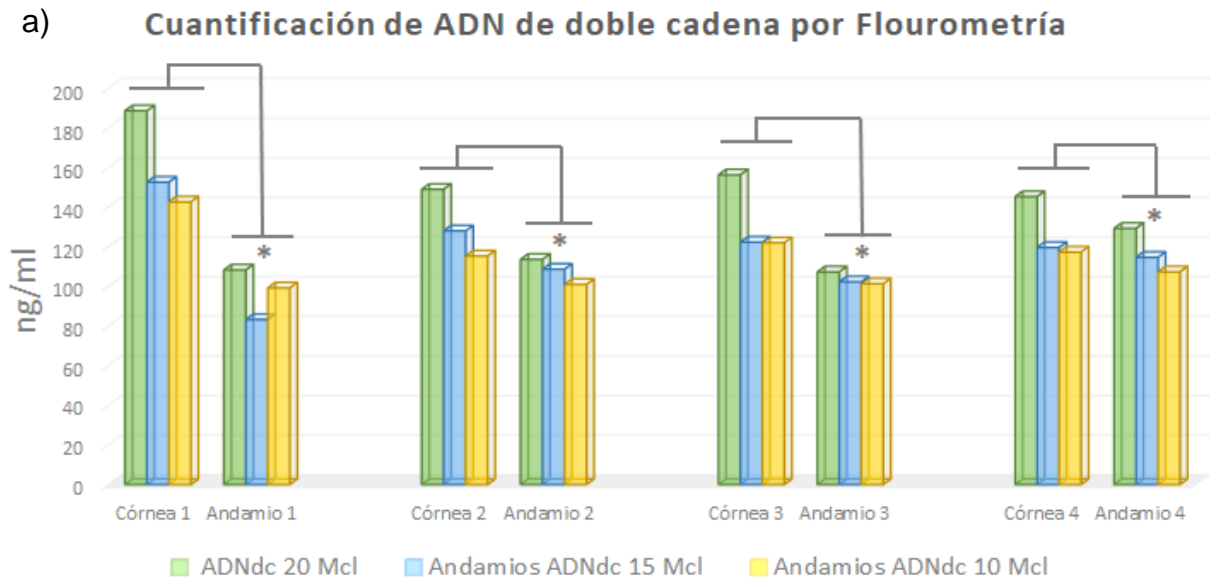


Figura 37-a. Cuantificación de ADN de cadena doble por fluorimetría. La gráfica muestra en la parte izquierda de las barras los valores de la cantidad de ADN de la córnea nativa (1-4) y en la parte derecha de las barras los valores de ADN residual del andamio descelularizado (1-4) en su respectiva curva de calibración de 20, 15 y 10 μ L (n=4); $P < 0.05^*$. *Test U de Mann-Whitney* $P=0.03$. Permutación de Monte Carlo $P=0.029$. Permutación exacta $P=0.028$.

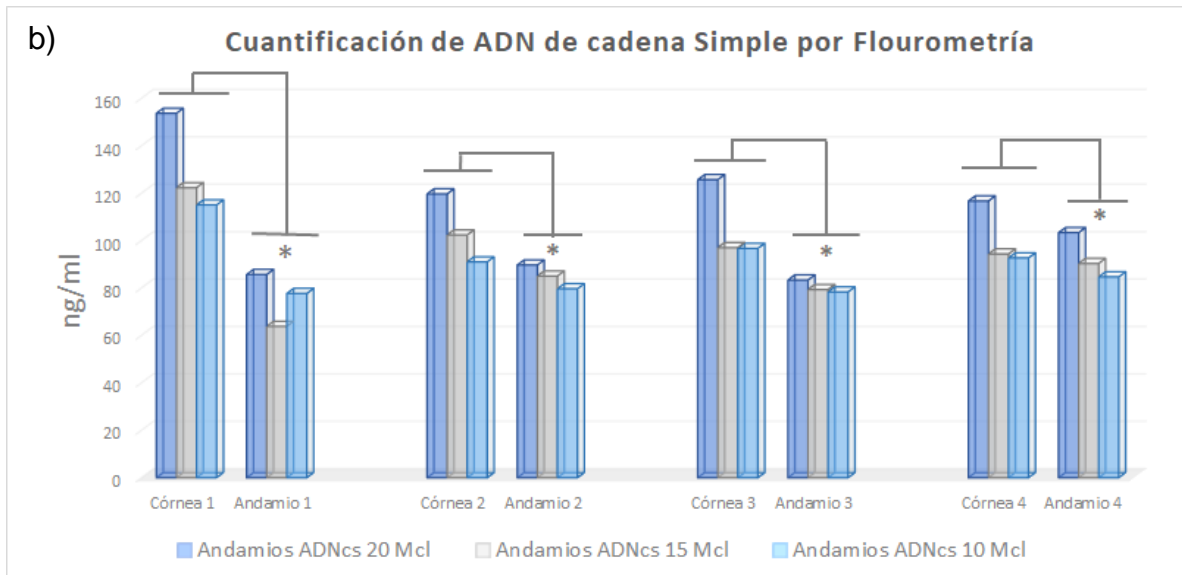


Figura 37-b. Cuantificación de ADN de cadena doble por fluorimetría. Se encontró una cantidad de ADN de cada simple significativamente baja en los andamios de córnea descelularizados respecto a las córneas nativas control utilizando las tres concentraciones diferentes de solución de trabajo.

Por último, se puede observar el promedio general de ADN de la córnea nativa de 124 ng/mL y el promedio general del andamio descelularizado de 98.47 ng/mL. Este análisis confirma que el procedimiento de descelularización influye la disminución de la cantidad de ADN.

8.6. Microscopía Electrónica de Barrido

En la MEB se obtuvieron imágenes de alta resolución a un aumento de 150x, 200x 12,000x y 15,000x de superficie corneal y fibras de colágena del estroma en muestra control y en andamio descelularizado.

Con un acercamiento de 150x ([figura 38-a](#)) en la córnea nativa se pudo observar un área de la superficie rugosa con divisiones semi-cuadrículas evidenciando un cúmulo de células correspondientes a las células planas del epitelio corneal unidas entre sí. Mientras que, en el andamio, a un aumento de 200x ([figura 38-b](#)) se logró observar una superficie regular discretamente rugosa conservando su curvatura convexa. Se aprecia una superficie libre de células a diferencia de la imagen anterior, espacios que marcan un trayecto de la macro-estructura superficial con discreto paralelaje superficial. Esta descripción hace referencia a la membrana de Bowman ya que la capa epitelial y membrana basal están ausentes

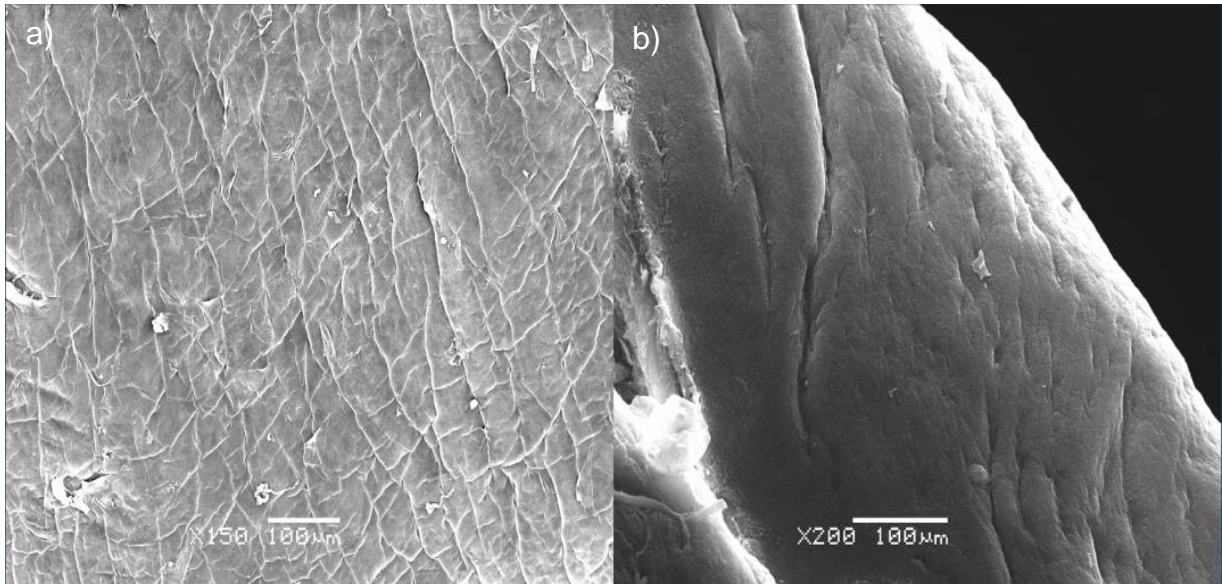


Figura 38. Microtopografía por MEB de córnea nativa 150x (a) y andamio descelularizado 200x (b).

A una magnificación mayor de 15,000x en la zona del estrato estromal, perpendicular a la superficie de la muestra control, en la [figura 39-a](#), se observan fibras de la MEC con un recubrimiento de proteínas estructurales (GAGs, glicoproteínas, proteínas de recubrimiento lamelar o metaloproteasas etc.). Esta visualización en primer plano también muestra un patrón de fibras de colágena curvadas conformando un paquete lamelar separado por un espacio oscuro a la derecha.

Con la misma magnificación en una zona similar en estroma de la córnea descelularizada, en la [figura 39-b](#) muestra fibras de colágena más delgadas, lisas y con escaso recubrimiento en su trayecto, con una disposición de las fibras similar a la córnea control. También se observa espacios más pronunciados entre los paquetes de colágena evidenciando lamelas.

En una imagen adicional de córnea descelularizada, con un aumento menor a la anterior (12,000x) ([figura 39-c](#)), se muestra una zona del estroma, la distribución de lamelas paralelas de colágena entre ellas con una organización regular hacia un mismo sentido. Estas lamelas tienen un ancho máximo de 560 nm, mínimo de 254.41 nm, ancho promedio de 379.58 nm.

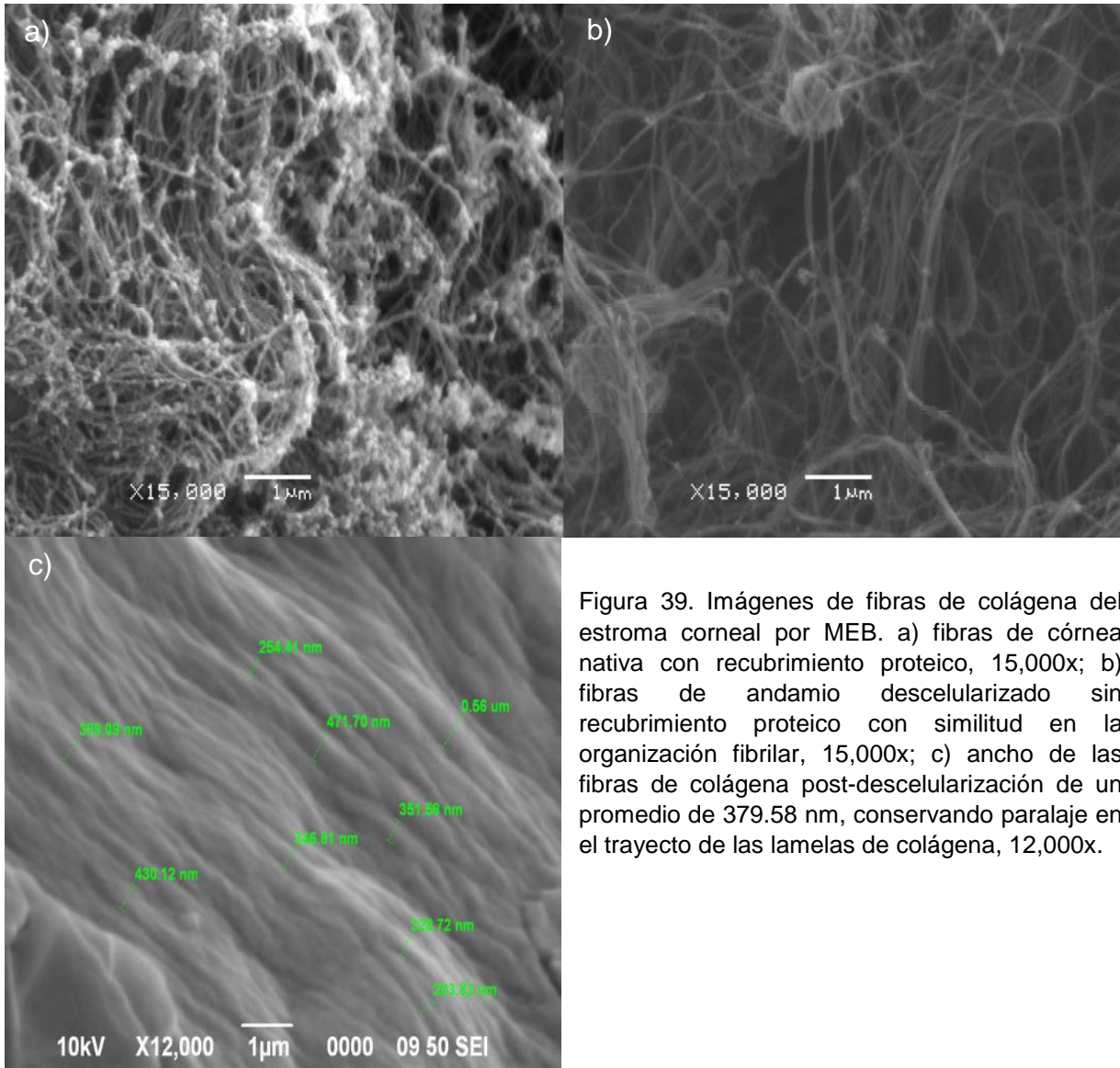


Figura 39. Imágenes de fibras de colágena del estroma corneal por MEB. a) fibras de córnea nativa con recubrimiento proteico, 15,000x; b) fibras de andamio descelularizado sin recubrimiento proteico con similitud en la organización fibrilar, 15,000x; c) ancho de las fibras de colágena post-descelularización de un promedio de 379.58 nm, conservando paralaje en el trayecto de las lamelas de colágena, 12,000x.

8.7. Espectroscopía Raman

El análisis que se realizó en la córnea porcina nativa fue en cara anterior y posterior con la finalidad de detectar si había cambios en el espectro asociados a los proteoglicanos del estrato anterior y posterior con fines de caracterización de córnea nativa, mientras que en la evaluación del biomaterial solo se analizó en la zona medial del estroma pensando en fines de uso del andamio (figura 40).

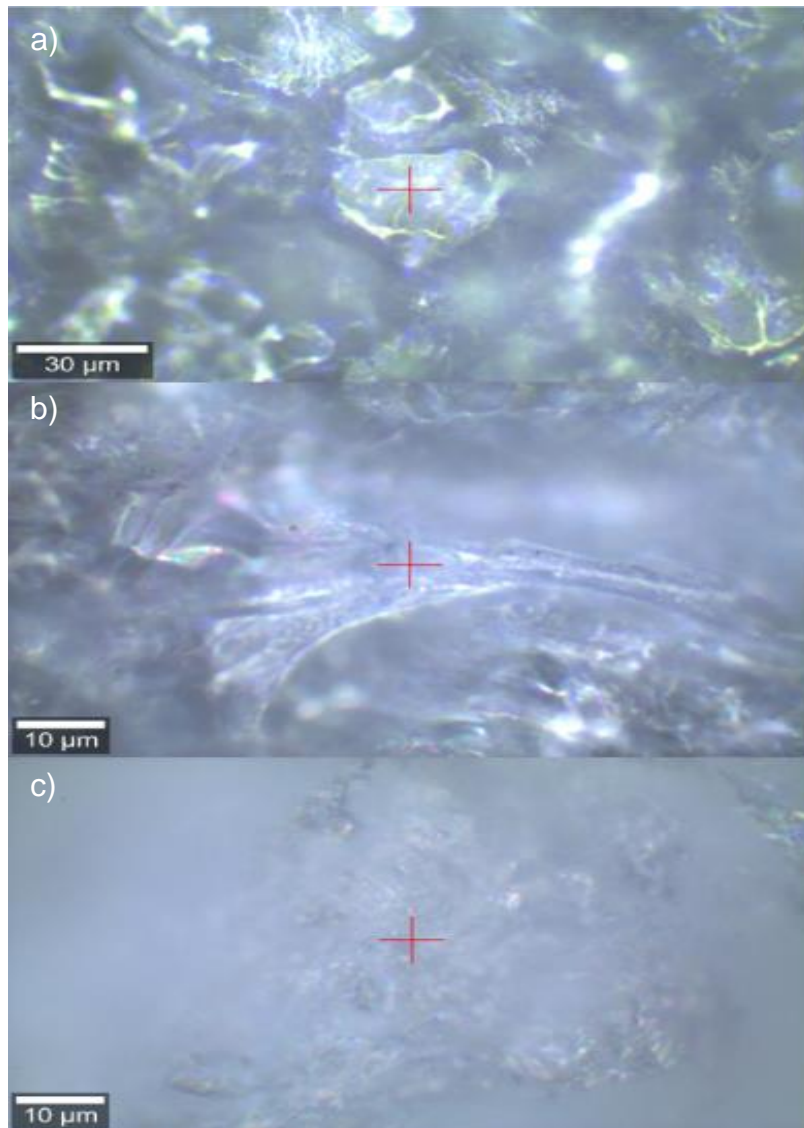


Figura 40. Zona de incidencia del haz luminoso: estroma anterior (a) y estroma posterior de córnea nativa liofilizada (b); estroma intermedio de andamio liofilizado (c).

Los resultados muestran una conservación y similitud de bandas en zona de huella digital (fingerprint) como en la zona de los grupos funcionales de los 3 espectros, sin embargo, entre los tres espectros se detecta un cambio en intensidad que puede atribuirse a la fluorescencia que pudo emitir la zona de córnea (anterior, medial y

posterior) donde se hizo incidir el rayo láser. Esta fluorescencia fue mayor en la cara posterior que en superficie y con una menor intensidad en el biomaterial debido a ausencia de células como a los elementos presentes en el recubrimiento de la MEC.

En los espectros Raman de las muestras nativas y experimentales se detectaron números de onda similares entre sí, mostrando un amplio rango de detección desde 860 – 3335 cm^{-1} . Con base en la bibliografía reportada, en la identificación en córnea nativa y el biomaterial, en la primera región que se observa de 860 – 1100 cm^{-1} es correspondiente a las bandas minerales, mientras que la región de 1100 – 1800 cm^{-1} es asignada a las bandas de proteínas⁽¹³⁶⁾, se pueden observar en la [figura 41](#).

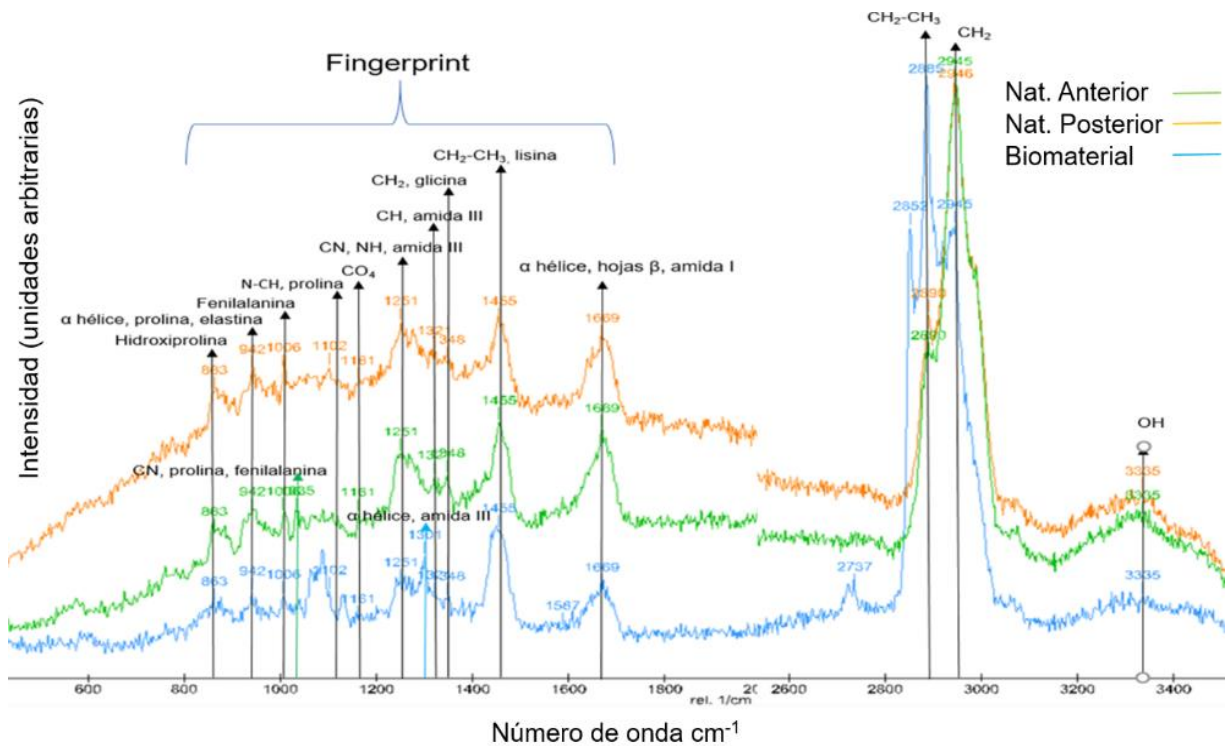


Figura 41. Espectros Raman de córnea liofilizada nativa de cara anterior, posterior y biomaterial. Se puede notar que los tres espectros comparten similitud en los números de onda detectados y estos confirman la preservación de la MEC post-descelularización como parte de la caracterización corneal.

Las siguientes bandas están presentes en los 3 espectros y con base a la bibliografía reportada también se obtuvo la caracterización de la matriz corneal. La identificación de números de onda total de los tres espectros se muestra en el [cuadro 3](#).

Una de las identificaciones más resaltantes de las muestras evaluadas fue la presencia de hidroxiprolina (860 cm^{-1}), prolina (942 cm^{-1}) y glicina (1341 cm^{-1}), que son esenciales para que proporcione estabilidad estructural y permanencia del ensamblaje en la triple hélice de colágena que contiene el tejido corneal.

Por otro lado, la revelación de α hélice de la prolina comparte asignación con elastina en los tres espectros. A demás, de detectar α hélice de prolina (945 cm^{-1}), se identificó

hojas β de amida III generada por una vibración y estiramiento de los enlaces de C-N con flexión en deformación del enlace N-H ($1246 - 1252 \text{ cm}^{-1}$), estiramiento de enlace C=O correspondiente a α hélice y a las hojas β de amida I (1669 cm^{-1}), enlaces $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ (2893 cm^{-1}) y CH_2 (2949 cm^{-1}) en tejido corneal nativo y en el biomaterial. Estas identificaciones claves de los espectros confirman la preservación de la estructura bioquímica fibrilar de colágena del andamio como la caracterización de la matriz corneal nativa.

Las bandas detectadas en la córnea nativa son similares a las que se detectaron en el andamio acelular respetando el rango de la asignación de $860 - 3335 \text{ cm}^{-1}$. Es la excepción los números de onda diferentes entre sí de cada muestra a evaluar, donde el número de onda 1034 cm^{-1} revela que es específico para la cara anterior de la córnea nativa en el enlace de N-CH de prolina y fenilalanina, 1102 cm^{-1} de la cara posterior de la córnea nativa y descelularizada correspondiente a N-CH de prolina, y 1303 cm^{-1} correspondiente a α hélice y hojas β de amida III que se revela en el biomaterial.

Mientras que en 1160 cm^{-1} , es un identificador del enlace CO_4 , que es mayormente pronunciado en la cara anterior de córnea nativa, pero visible en los otros dos espectros. En 1320 cm^{-1} , es correspondiente el enlace CH de amida III únicamente detectado en el tejido nativo de ambas caras. Y el número de onda de 2731 cm^{-1} en el biomaterial con correspondencia desconocida.

En última comparación, el área debajo de la curva en $3332 - 3335 \text{ cm}^{-1}$ es indicativo aún con el proceso de liofilización, de la permanencia del agua en la córnea nativa a comparación de la mínima del biomaterial, esto se puede atribuir a que el proceso de descelularización puede afectar el proceso de retención de agua posiblemente por la pérdida de glicosaminoglicanos y células dentro de la matriz extracelular.

Cuadro 3. Asignaciones moleculares, números de onda reportados con su respectiva identificación de bandas detectadas de córnea nativa anterior (NA), nativa posterior (NP) y del biomaterial (D).

Banda detectada	Números de onda reportados	Características
(NA/NP/D) 860 cm^{-1} , 866 cm^{-1}	856 cm^{-1} ; 859 cm^{-1}	Banda fuerte con extensión de anillo de prolina; asignación de hidroxiprolina ⁽¹³⁶⁻¹³⁸⁾ .
(NA) 940 cm^{-1} , (D) 941 cm^{-1} , (NP) 944 cm^{-1}	936 cm^{-1} ; 940 cm^{-1} ; 941 cm^{-1}	Tensión asimétrica de C-C de α hélice, extensión de C-C esqueleto de prolina; Vibración fuerte de C-C esqueleto de prolina, vibración en estiramiento de (vC-C) de esqueleto formado por la secuencia Gly-X-Y ^(136,138-140) .

(NA/D) 1008 cm ⁻¹ , (NP) 1009 cm ⁻¹	1004 cm ⁻¹ ; 1006 – 1007 cm ⁻¹	Correspondencia a fenilalanina ; Vibración media fuerte de fenilalanina ^(136,138–140) .
(D) 1031 cm ⁻¹ , 1037 cm ⁻¹ (NA) 1033 cm ⁻¹	1030 cm ⁻¹ ; 1034 – 1035 cm ⁻¹	Fenilalanina; Banda media extensión de C-N , prolina ^(136,138–140) .
(NA/NP/D) 1064 cm ⁻¹	1063 cm ⁻¹ ; 1070 cm ⁻¹	Bandas muy débiles con extensión de prolina ; Estiramiento de CO₄³⁻ ^(136,138,141) .
(D/NP) 1092 – 1098 cm ⁻¹	1101 cm ⁻¹	Tensión estiramiento de CO₄³⁻ ; Banda medianamente débil con deformación de N-CH , prolina ^(136,138,139,141) .
(NA) 1160 cm ⁻¹	1170 cm ⁻¹	Estiramiento de CO₄³⁻ ⁽¹³⁶⁾ .
(NA) 1246 cm ⁻¹ , (D) 1248 cm ⁻¹ , (NP) 1252 cm ⁻¹	1239 – 1249 cm ⁻¹ ; 1240 cm ⁻¹ ; 1245 y 1268 cm ⁻¹ ; 1246 cm ⁻¹ ; 1247 – 1248 cm ⁻¹ ; 1254 cm ⁻¹ ; 1256 cm ⁻¹	Vibración en estiramiento de C-N y flexión en deformación de N-H , amida III ; hojas β de amida III ; Doblete de identificación de amida III ; Regiones ricas en prolina (no polar) y pobres en prolina (polar); Intensidad fuerte correspondiente a amida III ; Característica de elastina ; Alternancia de amida III ^(136–140,142,143) .
(D) 1297 – 1301 cm ⁻¹	1284 cm ⁻¹ ; 1305 cm ⁻¹	Vibración en estiramiento de C-N y flexión en deformación de N-H , amida III ; α hélice de amida III ^(136–139,142) .
(NP) 1319 cm ⁻¹ , (NA) 1320 cm ⁻¹	1316 cm ⁻¹ ; 1317 cm ⁻¹ , 1322 cm ⁻¹	Modo de estiramiento de C-N y flexión en deformación de N-H , amida III ; Señal débil en la deformación de CH ^(136–139,142) .
(NP) 1341 cm ⁻¹ , (D) 1344 cm ⁻¹ , (NA) 1349 cm ⁻¹	1338 cm ⁻¹ ; 1343 cm ⁻¹	Modo de estiramiento de C-N y flexión en deformación de N-H , amida III ; banda media, movimiento de tijereo en CH₂ , glicina (Gly) ^(138,142) .
(D) 1450 cm ⁻¹ , (NA/P) 1457 cm ⁻¹	1450 cm ⁻¹ ; 1455 cm ⁻¹	Deformación en tijereo de CH₃ y deformación en flexión de CH₂ – CH₃ ; Intensidad fuerte en extensión de COO⁻ , lisina ^(136–139,142,143) .
(D) 1669 cm ⁻¹ , (NP/D) 1670 cm ⁻¹	1655 cm ⁻¹ , 1669 cm ⁻¹ ; 1660 cm ⁻¹ ; 1666 cm ⁻¹ ; 1668 cm ⁻¹ ; 1670 cm ⁻¹ ; 1668 cm ⁻¹ , 1675	Correspondencia a amida I ; Estiramiento de C=O (α hélice y hojas β), amida I ; amida I , dominada por la vibración de estiramiento del péptido carbonilo con alguna contribución del estiramiento C-N y

	cm ⁻¹ ; 1600 – 1700 cm ⁻¹	flexión en plano N-H; correspondencia a elastina; Correspondencia a amida I; hojas β de estiramiento CO de amida I; Identificación e integridad de las fibras de colágena ^(11,118,136,138,142,143) .
(D) 2862 cm ⁻¹	-----	-----
(NA/NP/D) 2885 - 2890 cm ⁻¹ , (NA/NP/D) 2945 cm ⁻¹	2879 – 2938 cm ⁻¹	Modo de vibración en estiramiento de CH ₂ y CH ₃ en colágena ^(142,143) .
(NA/NP/D) 2945 cm ⁻¹ .	2942 cm ⁻¹	Estiramiento de CH ₂ ^(142,143) .
(NA/P, D) 3335 cm ⁻¹		Modo de vibración débil de la molécula HO.

Este resultado muestra que la mayoría de los números de onda son coincidentes y están presentes en los 3 espectros, por lo tanto, estos espectros confirman la preservación bioquímica estructural y molecular de la matriz descelularizada como también forman parte del complemento a la caracterización bioquímica de córnea actualmente.

8.8. Análisis térmico

El análisis térmico la CDB y AT fueron usados para detectar en parámetros propios de estas macromoléculas la temperatura de desnaturalización (T_d), evaluar la estabilidad térmica y para analizar cambios, transiciones de la muestra control como experimental.

Se realizó en las dos muestras, nativa y descelularizada (ambas en estado hidratado) con una corrida de 200°C dentro de un ciclo de calentamiento y enfriamiento del material, donde los termogramas resultantes que se muestran son el promedio de las 3 corridas que fueron procesados por el programa "TA Universal Analysis V4.5A".

8.8.1. Calorimetría Diferencial de Barrido

En el termograma DSC de córnea control se observa 2 picos endotérmicos principales después de los 95°C y se observan para ambas muestras (figura 42-a y b), sin embargo, aparece un pequeño desnivel endotérmico alrededor de 29.27°C – 30.28°C en ambas muestras que es correspondiente a la eliminación de agua adsorbida (fisisorbida) como la volatilización de solvente sobre su superficie. Posteriormente se detecta un segundo cambio de línea a 44.90°C que se atribuye a la primera degradación poco percibida de colágena, reportándose en el biomaterial a 44.39°C, lo anterior mencionado lo confirma la primera pendiente del perfil termogravimétrico de la córnea control (figura 44-a).

El primer pico endotérmico importante aparece a los 98.20°C en córnea control y a 97.68°C del biomaterial, cual tiene un comportamiento muy similar en esa transición térmica. Este cambio es completamente correspondiente a la evaporación de agua quimisorbida de la estructura corneal dando paso al inicio de la degradación de la estructura proteica de colágena, se puede notar que la transición es más pronunciada y anticipada en el andamio.

La T_d de córnea control es de 114.52°C (inicial) indicativa de la degradación de proteínas de MEC, posteriormente, 128.91°C (máxima) la identificación del punto de mayor inestabilidad significativa a una degradación pronunciada de colágena y 141.60°C (final) donde se mantiene una desnaturalización continua. Mientras que el andamio la T_d indicativa de la degradación de proteínas residuales es de 109.76°C (inicial) y de 125.20°C (máxima) correspondiente a la desnaturalización más significativa por la falta de recubrimiento de la matriz de colágena, se observa que esta transición no finaliza como en la córnea control, si no que la transición se observa constantemente lineal, lo que es indicativo que el punto de inestabilidad mayor de la estructura corneal nativa es a 128.91°C, mientras que en la estructura descelularizada es de 125.20°C.

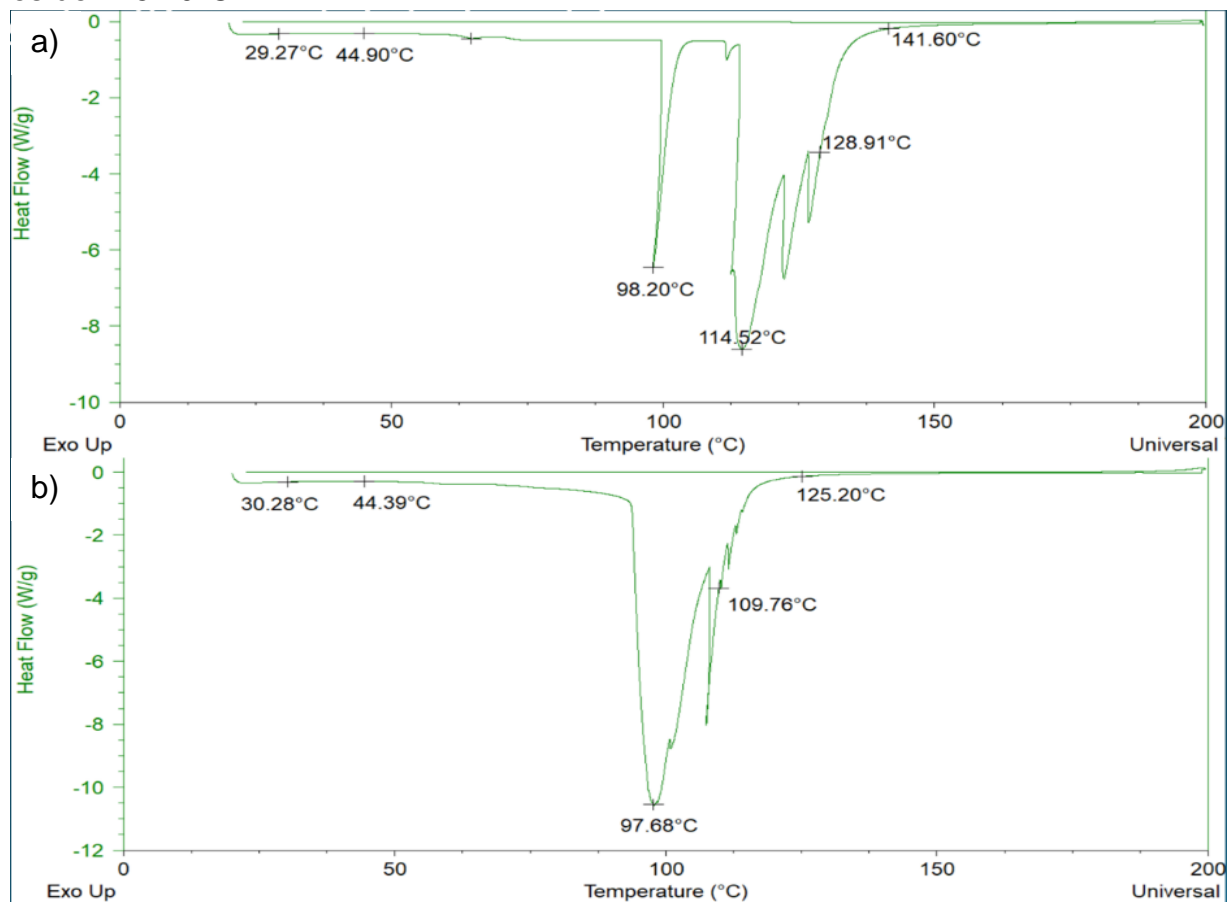


Figura 42. Perfil calorimétrico de córnea nativa (a) y córnea descelularizada (b).

Concordando con otros autores que reportan el inicio de la temperatura desnaturalizante es entre 104°C y 112°C, esta temperatura de desnaturalización está

directamente relacionada a la modificación de la estructura terciaria de colágena (estructura de triple hélice), lo cual no implica pérdida de masa de la matriz corneal, por lo que no se ve reflejado puntualmente en el termograma de AT (figura 42).

Las transiciones anticipadas se pueden observar en el perfil calorimétrico de la figura 43 y es debido posiblemente a la falta de recubrimiento glucoproteico lamelar en la MEC a consecuencias del procedimiento de descelularización como se muestra en la figura 38-b en MEB, por lo que genera cierta inestabilidad térmica antes del punto correspondiente de la córnea control.

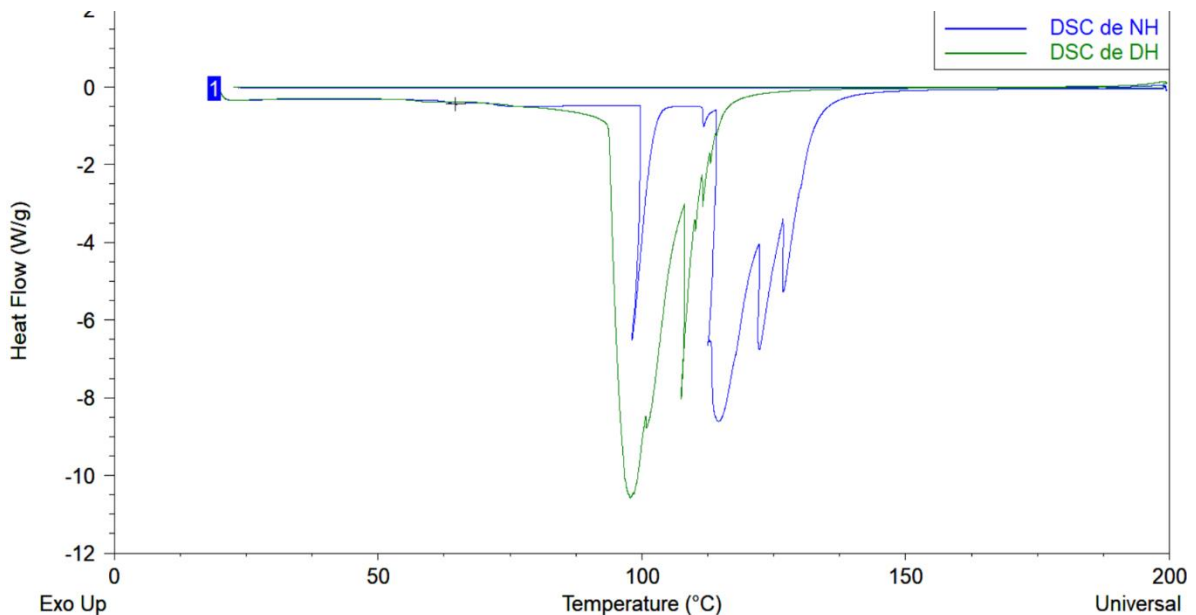


Figura 43. Comparación del perfil calorimétrico de la muestra nativa hidratada (NH) y descelularizada hidratada (DH). Se muestra un registro anticipado de la córnea descelularizada a comparación de las transiciones de calor que presenta la córnea nativa debido a que las proteínas de la MEC se pierden después del proceso de descelularización, por lo tanto, el punto de mayor inestabilidad térmica se presenta a una temperatura menor a la córnea control. En ambas curvas se puede observar que no ocurre una cristalización de la materia en el enfriamiento de la muestra, indicativo de que no hay equilibrio térmico cuando la muestra llega a 200°C.

8.8.2. Análisis Termogravimétrico

El perfil termogravimétrico es de utilidad para observar la pérdida de peso de la masa en relación a la temperatura, así como también, se pueden corroborar las transiciones caloríficas que ocurren en la CDB, sabiendo si dichas transiciones involucran una degradación de la materia o solo un cambio molecular donde se pierde masa del material.

La primera degradación detectada en la córnea nativa es a la temperatura de 30.96°C – 98.16% de peso, con una pérdida de 2% de masa por la volatilización del solvente y

agua adsorbida superficial, sin embargo, este cambio de peso no es detectado en la curva del andamio. El segundo cambio detectado gracias a la segunda derivada de la curva en ambas muestras es a 44.83°C y este es registrado en el andamio a 43.54°C que es atribuible a la primera degradación de colágena en la que es relacionada con una transición pequeña escalonada en la curva de DSC de ambas muestras (cabe mencionar que a los 50.71°C en la segunda derivada del andamio se confirma dicha degradación con un descenso pronunciado). A los 100.95°C de la córnea control se observa una pérdida brusca de agua con un 73.99% de masa conservada, sin embargo, este cambio se manifiesta de una forma descendente continua en la curva, puesto que la pérdida de agua quimisorbida en el andamio se presenta a 95.05°C detectada en la primera derivada (Figura 44-a).

En el biomaterial a diferencia de la córnea control, por medio de la derivada se observa la primera degradación atribuible a proteínas residuales de MEC a 109.34°C (inicial), seguidamente a 126.38°C (final), con un decremento continuo en la derivada se muestra la parte más significativa de la degradación de la estructura de colágena (punto de derretimiento/*melting point*), y en la córnea control se observa postergada a los 130.15 (inicial) y 140.45°C (final) de la segunda derivada, mientras que en la primera derivada a los 130.15°C se detecta un aumento de masa indicativo de oxidación de un compuesto orgánico. Esta última degradación mencionada de ambas muestras es de suma importancia ya que se conoce que es el punto de inestabilidad de la MEC de córnea nativa y del andamio (Figura 44-b).

Finalmente a la temperatura de 215°C, como se ha mencionado en la bibliografía⁽¹²⁰⁾, a partir de los 210°C para ambas muestras, ocurre la última transición o destrucción total de la estructura, reflejándose en la curva un decremento proporcional a la temperatura y se confirma con la primer derivada con un incremento potencial por pérdida de masa. Resultado que se muestra en anexos.

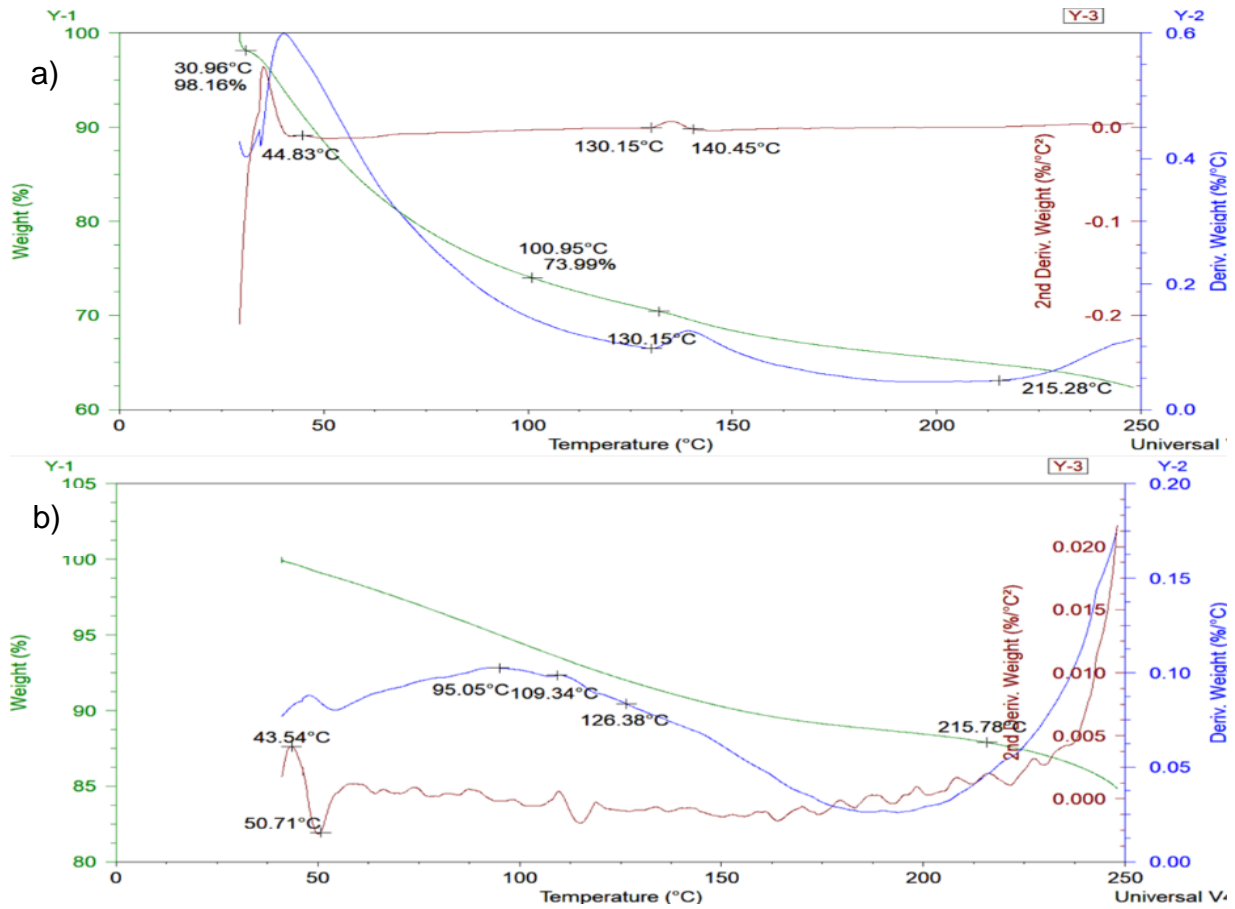


Figura 44. Perfil termogravimétrico de córnea nativa (a) y córnea descellularizada (b).

En el caso de las curvas térmicas en el AT, se muestra un comportamiento casi idéntico en ambas muestras (figura 45), esto es indicativo de estabilidad térmica de la muestra experimental después del tratamiento de descellularización y principalmente este análisis muestra que el andamio puede soportar la temperatura fisiológica del globo ocular, alrededor de 35 – 37°C.

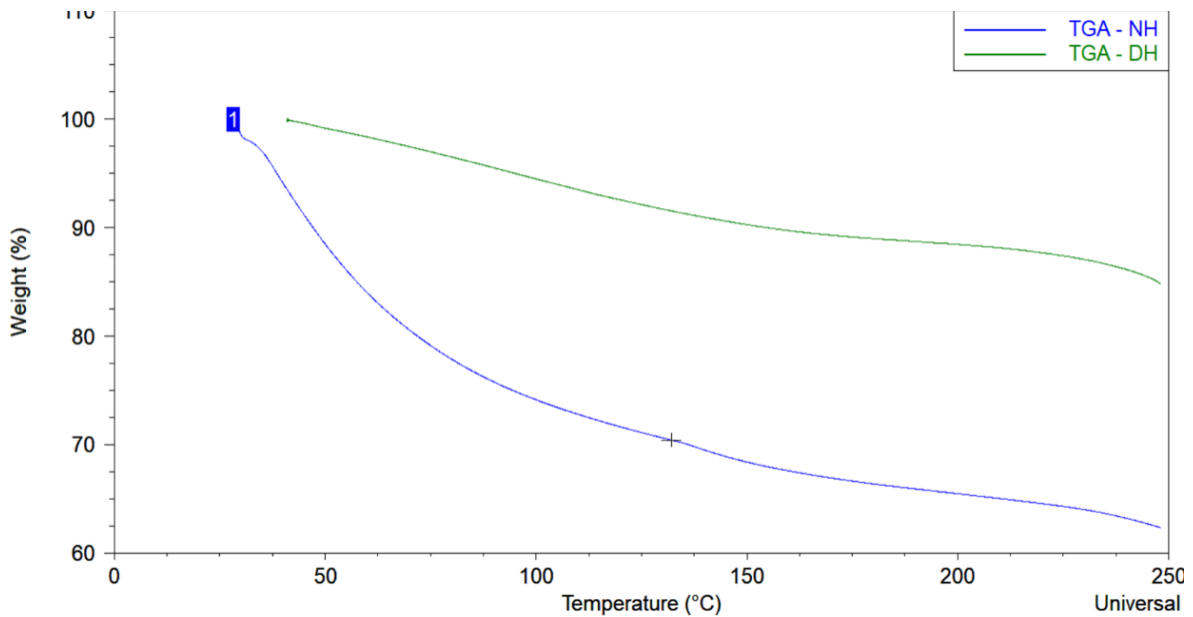


Figura 45. Comparación del perfil termogravimétrico de la muestra nativa hidratada (NH) y descelularizada hidratada (DH). Se observa que la curva de DH empieza un decremento de peso posterior a la NH, como una constante en degradación sin un decremento marcado ya que el procedimiento de descelularización eliminó componentes orgánicos observables en la degradación de la NH.

Por otro lado, es de gran importancia que la degradación de la matriz de colágena de la muestra experimental exprese su primera pérdida de masa a partir de los 40°C, asegurando que a una temperatura fisiológica el andamio se comporta con una estabilidad térmica óptima a la córnea nativa de 35°C hasta 37°C en procesos inflamatorios.

8.9. Refractometría por Reflexión

Para que se llevara a cabo el análisis de refractometría, se realizó un corte coronal seccionado de 10 micrómetros en estroma anterior de la muestra descelularizada con ayuda de un microqueratomo en estado parafinado siendo montados en un cubreobjetos. Una vez obtenida la membrana de 10 μm pasó por un proceso de desparafinado (descrito en la técnica de tinción fluorescente DAPI).

La muestra ya desparafinada y montada en el cubreobjetos se colocó en la cara posterior del prisma utilizando la técnica de “index matching”, donde se colocó un aceite de inmersión de índice de refracción similar al prisma ($n=1.5$) para poder unificar el sistema óptico sin cambios de índice de refracción incidiendo el haz de luz verde sobre la muestra captando la señal con el potenciómetro exitosamente (figura 46).

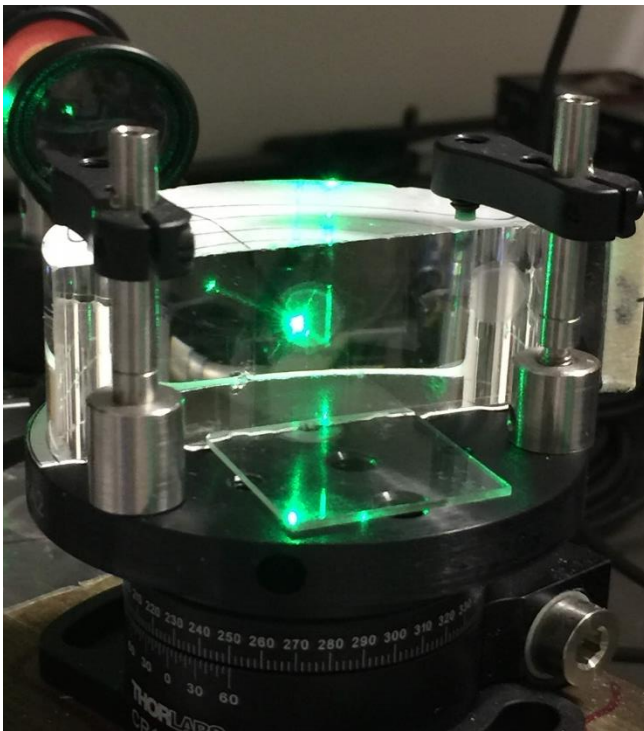


Figura 46. Adherencia del cubreobjetos con la biopelícula de 10 μm en la cara posterior del sistema óptico en orden, conformado por el prisma, aceite de inmersión, cubreobjetos biopelícula y aire.

En la gráfica de la figura 47 se observan 4 medidas de reflectividad como función del ángulo de incidencia. Primeramente, la curva de referencia correspondiente al prisma sin muestra, interfaz vidrio/aire (línea azul punteada), seguido por 3 variaciones de sustancia-material: película hidratada con agua desionizada, miliQ, en un caso cubierto con cubreobjetos en su cara posterior (confinada, línea roja punteada) y otra no cubierta (no confinada, línea azul cyan) donde se puede apreciar la respuesta óptica de

la superficie rugosa de la cara posterior del andamio y por último se muestra una curva correspondiente a la película que fue sumergida en glicerol al 100% (línea negra).

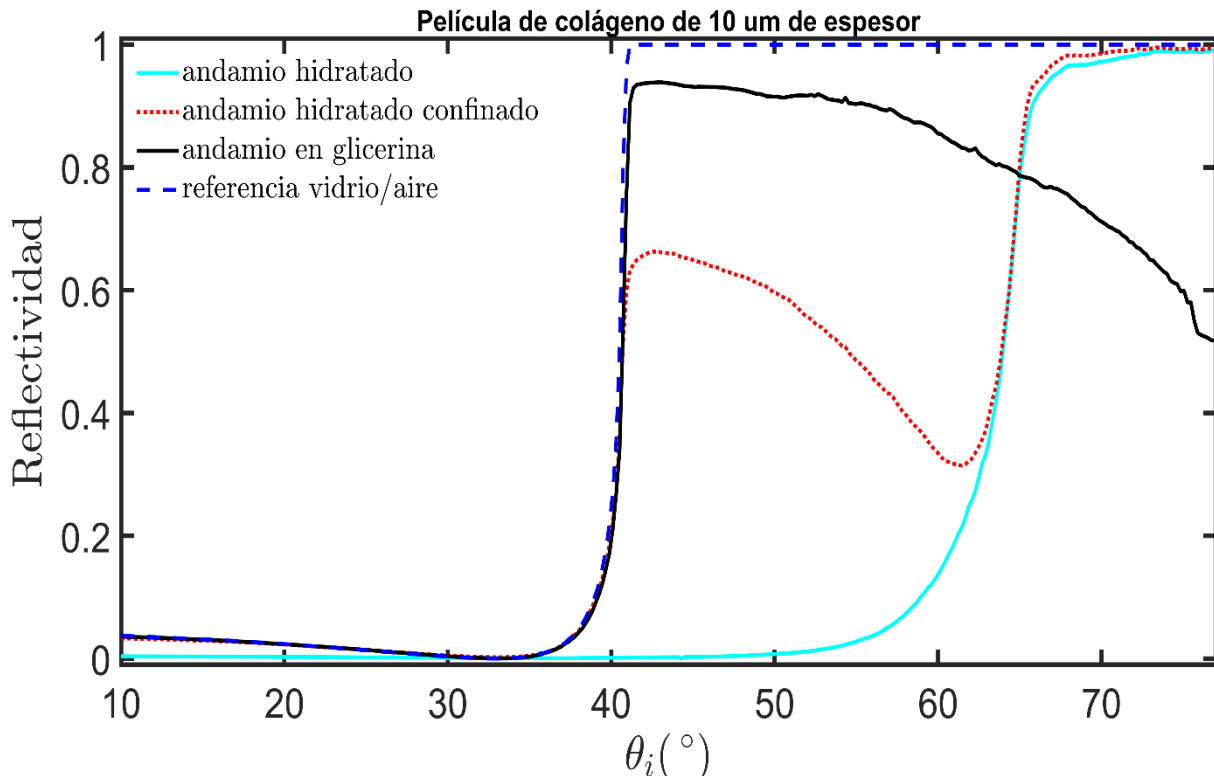


Figura 47. Refractometría de una película de 10 μm de espesor de estroma de córnea descelularizada.

La curva de referencia de la interfaz vidrio/aire (línea azul punteada) se utilizó para calibrar el sistema de medición y se ha mostrado para ilustrar la posición del ángulo crítico del sistema conocido en la literatura, éste, dado cerca de los **41.81°**. La curva del andamio hidratado no confinado (línea cian) muestra un solo ángulo crítico (**64°**) correspondiente a la interfaz entre el vidrio y la matriz hidratada, se observa que el valor de este ángulo es ligeramente mayor que el reportado para la interfaz vidrio/agua (62.73°). El hecho que ocurra un desplazamiento hacia la derecha de la referencia se atribuye a que la biopelícula contiene un índice de refracción mayor pero no tan lejano al del agua.

La rugosidad de la parte posterior del andamio hidratado (expuesta al aire) impide observar las propiedades de extinción de la matriz, por lo cual, se propuso confinar el sistema utilizando un cubreobjetos adicional en la cara posterior del andamio, ya que el cubreobjetos garantiza que se obtenga una interfaz plana. Por lo tanto, la muestra confinada (línea roja punteada) formó una regularidad en la cara posterior del sistema óptico revelando el ruido que causa la MEC inmersa en un medio acuoso, de esta manera se identificó el comportamiento de la luz con el material en un medio acuoso. Esta diferencia está relacionada con una ligera detección de extinción de luz que produce la película, cambio asociado al fenómeno de absorción y esparcimiento de la luz.

La altura de la curva del andamio confinado cerca del ángulo crítico de referencia (41°) se puede relacionar con la distribución y orientación residual de las fibras de colágena,

sin embargo, para obtener resultados más precisos de estas características este estudio necesitaría apoyarse de un modelo teórico. Nótese que las curvas para el andamio confinado y no confinado coinciden en 64° (figura 48-a), lo cual confirma que el andamio tiene la capacidad de comportarse similar al medio acuoso en el que está inmerso. El índice de refracción asociado a la posición de este ángulo crítico es de **1.39** (índice de refracción del sistema combinado de agua desionizada/biopelícula). A partir de aquí podemos inferir un índice de refracción para la biopelícula sin medio acuoso de **1.46**, resultados derivados de emplear una regla de mezclado de la fórmula $\theta_c = \text{arcSIN}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$, donde se toma en cuenta las dimensiones del andamio (10 mm de diámetro y 10 μm de espesor) y volumen de agua utilizado (10 μL), junto con los ángulos e índices de refracción conocidos de las sustancias. Aunque se debe considerar que estos resultados son preliminares, se puede inferir que el índice de refracción del andamio (1.46) puede disminuir y comportarse dependiendo del medio acuoso en el que está inmerso, y se infiere que este valor puede variar dependiendo el tiempo de inmersión dentro del medio y el cambio osmolar que produce el andamio (capacidad osmolar). Pruebas que se deberán retomar en futuros estudios.

Por último, la medición de la película en glicerina confirma el análisis anterior. En este caso no se puede observar el segundo ángulo crítico debido a los límites de medición de aparato (aprox. hasta los 80°). El ángulo crítico entre vidrio/glicerina está alrededor de 75° y al agregar la biopelícula aumenta el índice de refracción y por lo tanto su ángulo crítico, dificultando la observación porque se sale del intervalo de medición (figura 48-b), sin embargo, visualmente en esta inmersión con glicerina se observó un estado mayormente transparente.

Se considera posteriormente emplear un modelo físico-teórico para obtener resultados precisos para conocer las características de distribución y orientación de la MEC de colágena post-descelularización, como también resolver la limitante en la obtención del ángulo crítico en el sistema biopelícula/glicerina, ya que es de suma importancia conocer el índice de refracción que logra el andamio al estar inmerso en glicerina. Este punto es de suma importancia, tanto así que múltiples investigadores utilizan esta sustancia para recuperar cantidad de transparencia del andamio descelularizado catalogado como una sustancia osmorreguladora⁽¹⁴⁴⁾.

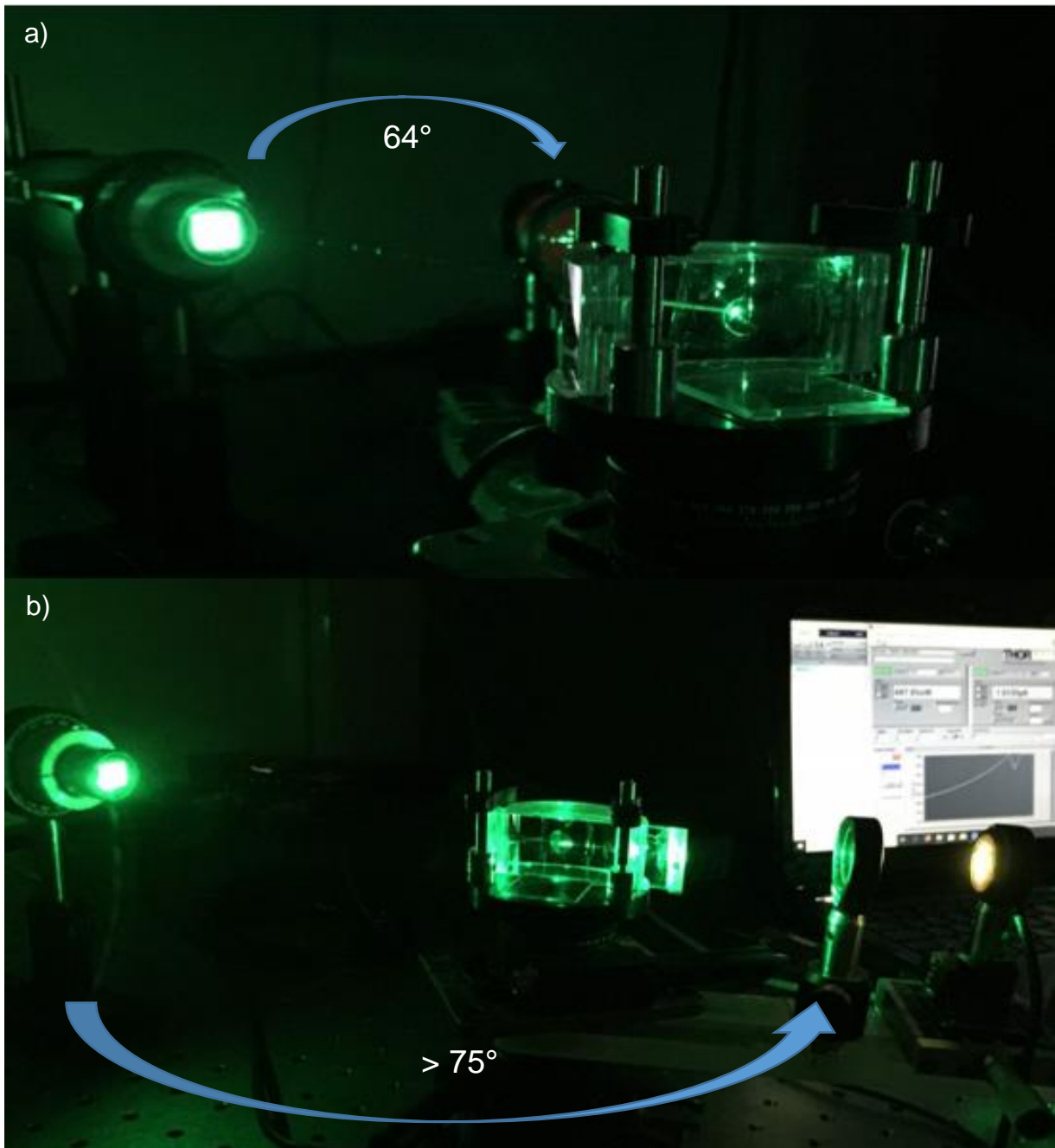


Figura 48. Evaluación de refractometría por reflexión especular interna de biopelícula de $10\ \mu\text{m}$ muestra a) andamio/hidratado en agua miliQ obteniendo un ángulo crítico de 64° , similar al del agua (62°); b) andamio inmerso en glicerina donde se muestra que el detector está a más de 75° (ángulo crítico de la vidrio/glicerina), el cual aumenta como el índice de refracción por la biopelícula adicionada sobrepasando los límites de medición del instrumento óptico.

9. Discusión

Para considerar una córnea descelularizada como andamio, este debe de presentar una nula respuesta inmunológica como propiedades biológicas similares a la nativa. Las técnicas de descelularización suelen variar en el lavado post-extracción, aplicación de surfactante y/o agente biológico, ciclos en agitación, temperatura y tiempo de permanencia en un medio acuoso. Estas variaciones pueden afectar la ultraestructura, transparencia y la eliminación celular del tejido.

Siendo la transparencia una de las características más importantes que debe presentar un biomaterial corneal después del proceso de descelularización, en algunas investigaciones no siempre se obtiene una transparencia óptima, debido al mecanismo de descelularización empleado. Por lo tanto, muchos autores optan por utilizar glicerol al 100% para recuperar la transparencia^(131,134,145). En dos investigaciones donde utilizaron SDS, se requirió utilizar glicerol al 100% para recuperar su transparencia en una concentración al 0.1% por su moderada opacidad⁽¹⁴⁶⁾. Y en la otra en las mismas condiciones utilizadas en esta metodología con diferencia de 8 lavados en 16 horas, se observó una turbidez menor a la córnea obtenida en esta investigación (posiblemente fue menor debido al gran tiempo que se destinó para lavar el andamio), sin embargo, aun así, optaron por colocar glicerol al 100% en al andamio corneal por 30 min. y particularmente en esa investigación, tampoco se observó células visibles o material nuclear por HyE y tinción DAPI⁽¹³¹⁾.

Otra investigación en donde se utilizó un método también similar (SDS al 0.5% con diferencia de 10 lavados en 24 h.), mencionaron que se obtuvo un andamio acelular, pero con una desorganización en las lamelas de colágena, iniciando desde el estroma anterior hacia la zona de la membrana de Descemet. Situación que podría deberse por un tiempo de sobre lavado de 24 horas en PBS, ya que se espera una edematización adicional a la que produce el procedimiento⁽¹³⁴⁾.

En esta presente investigación, la membrana de Descemet se observa que pierde discretamente su arquitectura, situación que no ocurrió en la investigación que realizó T. Bayyound⁽¹⁴⁷⁾ a pesar de someter la córnea más tiempo en medios acuosos. Él utilizó una solución tamponada hipotónica e incubación con inhibidores de proteasas (ácido etilendiaminotetraacético, EDTA 0.1%), donde muestra que se preservó el estroma posterior y membrana de Descemet después del procedimiento. Esto, posiblemente se debe a la utilización de inhibidores de proteasas post-extracción y previo a la inmersión en SDS, ya que estos inhibidores son los encargados de regulación de la inflamación y de la señalización celular, evitan que las proteínas de la MEC pierdan sus glucosaminoglicanos, proteínas estructurales disminuyendo el riesgo de la desnaturalización de la colágena, manteniendo su estado estructural⁽¹⁴⁸⁾.

Puede inferirse que el método de descelularización utilizando SDS en una concentración de 0.1% a 0.5% da como resultado una óptima remoción de células, afirmando que a mayor concentración del surfactante asegura una descelularización

completa y entre menor sea la concentración del surfactante hay la probabilidad de que restos nucleares sean detectados en la MEC, esto lo evidencia la investigación de M. González-Andrades *et al.* en la fluorescencia DAPI⁽¹²⁷⁾.

De este modo, cabe mencionar que la tinción HyE y marcaje fluorescente DAPI, fueron de utilidad en esta investigación para confirmar una descelularización óptima, ya que no se encontró material nuclear además de validar la preservación de la matriz corneal por microscopía óptica con magnificaciones de 10x y 20x.

En la cuantificación de ADN, los valores mostraron una curva de calibración adecuada para el modelo animal que se utilizó (macho de 8 a 12 meses de edad, de peso aproximado de 380 kg obtenidos de granja), el cual no interfirió en los resultados de la cuantificación de ADN en que el modelo animal no haya sido “sin génico”, ya que los datos analizados indicaron que son estadísticamente significantes.

En esta técnica por fluorometría que se utilizó para cuantificar el ADN, se obtuvo una estandarización para cuantificar ADN residual en peso húmedo a comparación de otras técnicas en peso seco que se han utilizado^(96,101). También, es significativa la cantidad de muestra que han utilizado otros autores en relación a los resultados con valores mínimos que obtienen, a diferencia de esta técnica donde se ocuparon 200 mg del andamio.

En la investigación ya mencionada de T. Bayyoud *et. al.*⁽¹⁴⁹⁾, realizaron una cuantificación de ADN extrayendo de 15 - 50 mg de estroma posterior de una muestra descelularizada. Ésta inmersa en 200 μ L de solución de digestión por 24 horas a 40°C, posteriormente se utilizó el kit “ADN purification” y el método de lectura que se utilizó fue con una longitud de onda igual de 260 nm. Por ésta condición, los resultados obtenidos tuvieron valores mínimos, 365.3 ± 88.6 ng/mg después de descelularización. Podría considerarse que el método de descelularización que se ocupó en esta investigación de tesis fue más eficaz que el de T. Bayyoud para remover el ADN, ya que se utilizó 4 veces más la cantidad de peso de muestra para el ensayo y se obtuvo un valor menor de promedio de 98.47 ng/mL.

La cuantificación de ADN no es una técnica en la que evidencia si hubo eliminación de células o no, principalmente, es una prueba que nos confirma si hay diferencia significativa en el ADN residual post-descelularización a comparación de la córnea nativa ya que es un indicativo de la alta o baja reactividad inmunológica que puede producir en el tejido huésped por la detección del CMH por el material nuclear presente. Esta prueba válida la bioseguridad del biomaterial.

Por otro lado respecto a la ultra estructura del andamio, en una investigación donde se obtuvo una córnea acelular de porcino por condiciones similares a la actual investigación (surfactante aniónico SDS a 0.5% en relación tejido solvente 20:1 (p/v)⁽¹³¹⁾, se confirmó por MEB que no hubo diferencia en la disposición regular en las fibras de colágena con un incremento espaciado entre ellas. Este incremento en el espacio entre las fibras de colágena resulta de una pérdida notoria de

glicosaminoglicanos (GAGs) de MEC crucial para la homeostasis del tejido corneal, ya que estos GAGs mantienen uniones estrechas entre las fibras estromales y células, razón por la que se muestran estructuras espaciadas y sin recubrimiento en la [figura 38-b](#). En general, esta teoría podría explicar la causa de la edematización y turbidez corneal post-descelularización.

Este análisis de la microtopografía estructural de la córnea descelularizada fue de utilidad para conocer la conservación de la microestructura corneal y características morfológicas nativas. El ancho promedio de 379.58 nm es coincidente con el tamaño reportado en la bibliografía en las lamelas de colágena dentro de un ancho que puede variar en un amplio rango de 200 a 2500 nm de espesor^(10,14).

Previos análisis de córnea por espectroscopia Raman, con micro Raman confocal, la longitud de onda utilizada fue de 632.8 nm⁽¹¹⁶⁾, sin embargo, S.C. Goheen utilizó una longitud de onda de 514.5nm, donde pudo realizar una de las primeras identificaciones de córnea⁽¹⁵⁰⁾, además los números de onda identificados fueron coincidentes con los resultados en la presente investigación y con la bibliografía.

La formación de las fibras de colágena involucra una serie de modificaciones de complejo post-translacional incluyendo la hidroxilación de prolina y lisina, glicosilación de hidroxilisina y la generación del entrecruzamiento de colágena⁽¹³⁶⁾, por lo tanto, la identificación de la repetición de triplete de glicina y frecuentemente prolina e hidroxiprolina, es característica de la molécula de colágena, así mismo, se sabe que la secuencia del tripéptido Gli-Pro-Hip (*Gly-Pro-Hyp*) formador del triple hélice, confirma estabilidad de la estructura del biomaterial de colágena⁽¹⁴³⁾.

Así mismo, las bandas de amida I y III, cuales representan enlaces peptídicos en la proteína de colágena, indican estabilización de la triple hélice en la estructura subfibrilar por la formación de enlaces de hidrógeno entre cadenas de los grupos N-H de glicina y los grupos C=O de prolina en las cadenas vecinas⁽¹¹⁹⁾.

De acuerdo a los datos obtenidos, estas bandas confirman que las moléculas identificadas revelan un estado estructural con alta estabilidad molecular en las proteínas de colágena⁽¹⁴³⁾.

Las posiciones de las bandas de amidas son sensitivas a una estructura secundaria de la proteína de colágena⁽¹⁴³⁾. Principalmente el doblete de la amida III se ha identificado como un marcador conformacional de colágena, como también se ha utilizado en este estudio para confirmar si existe algún grado de desnaturalización o trastorno de la estructura secundaria de la proteína colágena (en su caso ocurriría una transición de hélice a espiral aleatoria, posiblemente por la desnaturalización proteica que causa el surfactante sobre las proteínas en la muestra)⁽¹⁵¹⁾, sin embargo, no mostró alteración alguna. Cabe mencionar que los números de onda 1245 y 1268 cm^{-1} correspondientes a la amida III, son unas de las características de la orientación de las estructuras supramoleculares de colágena⁽¹¹⁸⁾.

Esta evaluación también resalta la importancia de almacenar tejidos a largo plazo a bajas temperaturas por la influencia en desventaja de la degradación proteolítica que tienen los tejidos después de la muerte, ya que puede alterar la estructura proteica de la MEC y el cambio de las propiedades biomecánicas de los tejidos⁽¹⁴³⁾.

Algunos métodos de descelularización son agresivos para la MEC y se ha reportado que pueden alterar la estructura secundaria de colágena por el desprendimiento de la molécula decorina en la triple hélice de colágena. Este indicativo de desnaturalización estructural se puede detectar por la ausencia de los picos de amida I, sin embargo, en el espectro se puede confirmar la presencia de amida I en 1660 cm^{-1} - 1633 cm^{-1} (característica de α hélice y hojas β), apareciendo más pronunciado el pico de 1633 cm^{-1} en la córnea descelularizada. En esta investigación, se descarta esta alteración en la triple hélice, porque los picos correspondientes a amida I tiene una expresión en 1669 cm^{-1} , conservada con la misma intensidad que la córnea nativa en sus dos caras (figura 41). Esta situación fue estudiada y se planteó una solución para recuperar el daño en la estructura secundaria de colágena utilizando glicerol al 100%, ya que esta molécula es un osmoregulador o agente osmótico efectivo en la remodelación de colágena corneal a su forma nativa, deshidratando la MEC a un nivel óptimo mientras que recupera la transparencia reduciendo la edematización post-descelularización⁽¹⁴⁴⁾. Razón por la que muchos investigadores ocupan esta molécula para recuperar la transparencia del biomaterial.

Por otro lado, Murab *et. al.* mencionan que el proteoglicano queratán sulfato es el más abundante en el tejido corneal y se puede confirmar su presencia con la molécula CO^- , pico ubicado en el espectro alrededor de 1000 cm^{-1} ⁽¹⁴⁴⁾, de este modo, en la espectroscopia de la córnea nativa como en el andamio descelularizado de la presente investigación se identifica el proteoglicano en el pico de 1064 cm^{-1} .

Este modelo de identificación espectroscópica nos permitió identificar qué cambios y alteraciones tuvo la matriz extracelular después de la técnica de descelularización. Al descelularizar córnea las bandas de identificación son más pronunciadas, más puras y exactas, como está reportada en la bibliografía, tales bandas son idénticas a la molécula mencionada: en cantidad disminuida cisteína, tirosina e hidroxiprolina, cantidades significativas de prolina, fenilalanina, elastina, amida III y I y glicina, que son características en la composición de colágena.

La espectroscopia Raman puede funcionar como un método adicional en apoyo a un diagnóstico patológico. La caracterización de la córnea nativa de cara anterior como posterior con la córnea descelularizada es de utilidad para detectar alguna conformación estructural patológica dentro de la composición estructural de colágena corneal al estar ausente alguna de estas bandas, asignaciones y número de ondas en dicha caracterización realizada. Así mismo, este estudio puede ser ampliamente ocupado para complementar el conocimiento de la estructura bioquímica de la MEC de córnea en estado acelular, ya que gracias a este análisis de identificación más

exacta de la MEC de córnea también puede servir en apoyo en futuros experimentos al sintetizar andamios para regeneración de tejido corneal.

En el análisis térmico, las transiciones notorias anticipadas como la T_d menor en el andamio como en la córnea control indica una desnaturalización reversible, esto corroborado por los productos de deshidratación y rehidratación periódica de las muestras en la investigación demostrada en los trabajos de A. Bigi *et. al.* y D. Giraldo⁽¹²⁰⁾, donde se sometieron muestras de colágena a deshidratación y rehidratación realizándoles DSC antes y después dando como resultado un T_d inicial de 112°C y una T_d final de 51°C después de haber sido deshidratadas. Este hecho no implica una degradación propia de la matriz, ya que se trata de una desnaturalización reversible, principalmente porque en su investigación se muestra una deshidratación de la MEC lo que conlleva un desorden al interior de la molécula de colágena, pudiéndose interpretar como una desnaturalización parcial de la molécula.

Menciona D. Giraldo⁽¹²⁰⁾ que “estas variaciones en la T_d implican la modificación de la estructura terciaria de la molécula porque se mantiene gracias a los puentes de hidrógeno entre cadenas y al deshidratar la molécula a esta temperatura se pierden estos enlaces. Esto implica que una molécula de colágena deshidratada al rehidratarse favorece la formación de puentes de hidrógeno y su regreso al estado nativo. Siempre y cuando no se afecte la estructura secundaria de la colágena.

La degradación precipitada del andamio a comparación de la córnea nativa en la primera degradación de colágena, la evaporación del agua quimisorbida como en la ausencia de detección de la volatilización de agua fisorbida a los 30.96°C, como en su punto de mayor inestabilidad es consecuencia del procedimiento de descelularización, ya que como se ha mencionado anteriormente en el análisis calorimétrico, la matriz extracelular descelularizada no tiene su recubrimiento glucoproteico como nativo (resultado de los posibles picos detectados en la cara anterior y posterior a diferencia de los picos reportados en el biomaterial en la espectroscopía Raman) y por lo tanto el agua como la estructura de colágena quedan expuestas a los cambios térmicos de manera discretamente precipitada, inclusive, algunas transiciones son detectadas en el perfil termogravimétrico del biomaterial y no en el de la córnea control por el desenmascaramiento de la matriz descelularizada.

Algunos autores han mencionado que la segunda pérdida de masa se presenta a un máximo de 450°C correspondiente a una pérdida del 65% de masa lo cual se debe a una descomposición total de las cadenas de colágena^(152,153).

Comúnmente, para lograr obtener la medida del índice de refracción se utiliza el refractómetro de Abbe, que es un refractómetro convencional ya comercial que principalmente es utilizado para medir índice de refracción en líquidos. Con este arreglo óptico se midió una configuración de reflexión total interna en una biopelícula de 10 μm en función del ángulo de incidencia, lo cual significa que el medio del que viene la luz (vidrio) tiene mayor índice de refracción que los demás medios involucrados. Esta configuración garantiza la obtención de ángulos críticos en la curva,

como la funcionalidad del sistema óptico, ya que, el biomaterial tuvo que cumplir el criterio de tener un índice de refracción menor al primer medio (vidrio) para que se pueda cumplir la condición de reflexión total interna, por ende, cumpliendo este principio, el índice de refracción de la biopelícula es menor a 1.5.

Otros autores han utilizado diferentes sistemas ópticos con la finalidad de saber el comportamiento óptico de las córneas procesadas. M. González-Andrades *et. al.* utilizaron un espectroradiómetro para determinar la distribución espectral de reflectancia de córneas descelularizadas con SDS en una concentración de 0.1%, donde la evaluación de igual forma se realizó en el centro del biomaterial y obtuvieron propiedades de dispersión y transmitancia similares a la córnea nativa⁽¹⁰⁰⁾.

Sin embargo, la obtención de la medición de reflectividad como función del ángulo de incidencia en configuración de reflexión interna presenta en la región cercana al ángulo crítico una mayor sensibilidad a variaciones en las propiedades ópticas del sistema, por ese motivo se seleccionó como parte en la caracterización óptica y se considera una medición muy precisa.

10. Conclusión

Una pérdida de la transparencia o patología corneal puede generar ceguera funcional por el daño estructural irreversible. Hoy en día, en el CENATRA, el tejido corneal ocupa el segundo lugar en tejidos y órganos más solicitados para trasplante durante los últimos 3 años, y a insuficiente cantidad de córneas donadas de origen nacional o internacional deja una lista de espera de miles de pacientes sin poder resolver su ceguera funcional.

El área de bioingeniería de tejidos tiene la capacidad para desarrollar alternativas terapéuticas que suplan los tratamientos convencionales ante la escasez de órganos y tejidos, inclusive, gracias a las numerosas herramientas para obtención de andamios, caracterización de biomateriales y evaluación biológica, se puede diseñar modelos personalizados a necesidades clínicas.

Con base en los objetivos planteados en esta investigación, se logró descelularizar tejido corneal por medio del empleo de SDS a 0.5%, por lo que es una técnica prometedora para que el andamio sea funcional ante el tratamiento para regeneración corneal.

En este trabajo de investigación además de complementar la caracterización físico-química de la córnea nativa reportada en la bibliografía, los puntos más sobresalientes fueron: la obtención de una matriz acelular con baja tasa de inmunoreactividad por la ausencia de células; disminución en la cuantificación de ADN y restos nucleares; similitud del andamio en microtopografía y ultraestructura a la córnea nativa; estabilidad estructural bioquímica de la matriz extracelular por la conservación de colágena corneal de diferentes tipos, como proteínas estructurales de la matriz (datos fundamentados y reportados en la bibliografía); conservación de la masa total del biomaterial sin desnaturalización en la temperatura natural del globo ocular, como la capacidad de soportar temperaturas mayores en condición patológica-inflamatoria. Por otro lado, se observa que ésta técnica genera una opacidad generalizada de la matriz, pero, pensando en la aplicación clínica del andamio, al utilizar determinado espesor del biomaterial (10 μm), se confirma que la biopelícula puede tener una calidad óptica con un índice de refracción similar a la sustancia acuosa en la que esté inmersa.

Este biomaterial logrado en este trabajo de tesis, puede ser de gran utilidad para realizar pruebas *in-vitro* en respuesta celular, *in-situ*, *in-vivo* en animales como de gran utilidad en modelos de tratamiento patológico corneal, y en un futuro en medicina traslacional evitando utilizar la queratoplastia penetrante en la zona de lesión corneal.

Por otro lado, el tiempo de obtención del andamio es de máximo 30 horas, de esta manera, se puede acelerar el proceso de obtención de un tejido corneal y podría disminuir la tasa de escasez de injertos corneales en México como reducir el riesgo de rechazo por aloinjerto.

11. Prospectos y traslación

1. Realizar experimentación en modelo animal para evaluar la repoblación celular *in-vivo*.
2. La traslación funcional objetiva del andamio es ser utilizado en lesiones corneales colocando un recubrimiento de espesor y diámetro adecuado a la lesión. Ya que el andamio puede ser parte de un tratamiento prometedor en la regeneración corneal por su acelularidad, por su preservación de la MEC, baja inmunogenicidad y propiedades ópticas adaptables al medio hidratado.
3. Cuantificar ADN en peso seco para que sean valores de ADN residual comparables a la estandarización que estipula P. M. Crapo (<0.50 ng/mg)⁽⁹⁵⁾.
4. Implementar el método de descelularización en córnea de avestruz por el diámetro de 39 mm donde se podría obtener una fuente mayor del biomaterial para el tratamiento corneal⁽¹³⁵⁾.

12. Anexos

1. Tabla 2. Preparación de PBS

Compuesto.	Concentración molar de osmolitos o isotónica.	Gramos por 1 litro.
KH ₂ PO ₄ (ácido) Fosfato de potasio monobásico (Sigma P. code 1002144434)	1.8 mM	0.24 gr.
Na ₂ HPO ₄ (base) Fosfato de sodio dibásico anhidro (Sigma P. code 7558794)	10 mM	1.44 gr.
KCl Cloruro de potasio (Sigma P. code 3911500G)	2.7 mM	0.2 gr.
NaCl Cloruro de sodio (Vertec Cod. V000106)	137 mM	8 gr.
MgCl ₂ Cloruro de magnesio (Sigma 110H0782)	0.5 mM	0.10 gr.
CaCl ₂ Cloruro de calcio (Sigma 100H0783)	1 mM	0.133 gr.

2. Tabla 3 y 4. Valores en la cuantificación de ADN por fluorometría de 4 córneas nativas y descelularizadas con cadena doble (ds) y cadena simple (ss).

Curva de calibración	Nativa 1		Nativa 2		Nativa 3		Nativa 4	
	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)
Excitación externa	.146		.162		.177		.158	
20 µL (1)	.154	147	.149	144	.157	150	.146	141
20 µL (2)	.152	147	.149	144	.156	150	.145	141
20 µL (3)	.154	146	.149	144	.156	150	.145	141
Excitación externa	.186		.149		.139		.144	
15 µL (1)	.189	178	.129	127	.123	122	.124	124
15 µL (2)	.188	179	.128	127	.122	121	.119	116
15 µL (3)	.189	178	.128	126	.122	121	.116	116
Excitación externa	.141		.128		.131		.129	
10 µL (1)	.143	139	.116	116	.122	121	.118	117
10 µL (2)	.143	139	.115	115	.122	121	.117	117
10 µL (3)	.143	140	.115	115	.122	121	.117	117

Curva de calibración	Descelularización 1		Descelularización 2		Descelularización 3		Descelularización 4	
	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)	ds (µg/mL)	ss (ng/mL)
Excitación externa	.119		.126		.126		.133	
20 µL (1)	.109	110	.114	114	.108	108	.130	128
20 µL (2)	.108	110	.114	114	.107	108	.129	127
20 µL (3)	.108	110	.113	114	.107	107	.129	127
Excitación externa	.0972		.129		.117		.140	
15 µL (1)	.083	88.3	.109	110	.103	104	.116	115
15 µL (2)	.083	88.2	.108	109	.102	104	.114	115
15 µL (3)	.082	87.9	.108	109	.102	103	.114	114
Excitación externa	.127		.097		.128		.126	
10 µL (1)	.099	102	.101	104	.102	103	.108	109
10 µL (2)	.099	102	.101	104	.101	103	.107	109
10 µL (3)	.0991	102	.101	104	.100	102	.107	109

3. Teoría de edematización en cuantificación de ADN en córnea descelularizada.

La cuantificación de ADN bicatenario y monocatenario contenido en un tejido nativo y descelularizado es leído por fluorometría gracias a la adherencia de un reagente a restos nucleares detectado por una fluorescencia emitida.

Después de un proceso de descelularización en una córnea nativa porcina se obtiene un estado de edematización generalizado en el botón corneal procesado. Dando como resultado un aumento en el peso inicial del tejido procesado por la retención de agua del PBS en el que se realiza el lavado post-descelularización (tabla 4).

Tabla 4. Comparación de peso de córnea nativa vs descelularizada donde el promedio de peso en córnea nativa es de 268.62 mg y el promedio de edematización de una córnea descelularizada es de 589.95 mg, dando una diferencia significativa de 321.30 mg. Por lo tanto, se puede inferir que la córnea descelularizada cuando se edematiza aumenta en un peso promedio de 2.19 veces la cantidad de peso nativo.

Pesos de córnea nativa	Promedio	Pesos de córnea descelularizada	Promedio
263.5 mg	268.62 mg	582.7 mg	589.95 mg
260 mg		600 mg	
262 mg		570 mg	
289 mg		607 mg	

De esta forma se puede pensar que la expresión de la cantidad de ADN es significativamente más notoria y directamente proporcional a la edematización por la

liberación facilitada de restos nucleares entre los intersticios de la matriz acelular en un tejido descelularizado hidratado a comparación tejido nativo recién extraído (4 horas *post-mortem*) que no sufre de una edematización y por lo tanto la expresión de ADN es evidente por las células externas y limitada por la restricción del ADN encapsulado en la matriz celular.

Siguiendo esta teoría de expresión por edematización, a la cantidad total de ADN expresado en córnea nativa podría considerarse un valor neto/total en su respectiva curva de calibración, sin embargo, en la cantidad de ADN expresado de córnea descelularizada puede inferirse que es directamente proporcional a la edematización, por lo que se podría ajustar en una escala proporcional de peso ganado en al edematizarse (cantidad de ADN en córnea descelularizada / 2.19) para obtener una relación proporcional a la facilidad de expresión.

Tabla 5. Promedios de cuantificación de ADN: Córnea nativa (CN), andamio descelularizado (AD) y andamio descelularizado con ajuste proporcional a la facilidad de expresión (ADAP) en sus respectivas curvas de calibración de 20, 15 y 10 μL en doble cadena de ADN y cadena simple. Los resultados de todos los promedios son aplicando la respectiva diferencia de fluorescencia control (24.3 ng/mL) en ss DNA, mientras que en ds DNA el control no afectó a la fluorescencia de las muestras ($<0.10\mu\text{g/mL}$).

<Grupos	Tipos	dsDNA20	dsDNA15	dsDNA10	ssDNA20	ssDNS15	ssDNA10
CN1	1	188.66	152.66	142.66	153.70	122.30	115.03
CN2	1	149	128	115.33	119.70	102.36	91.03
CN3	1	156.33	122.33	122	125.70	97.03	96.70
CN4	1	145.33	119.66	117.33	116.7	94.36	92.7
AD1	2	108.33	83.30	99.23	85.70	63.83	77.70
AD2	2	113.66	108.66	101.00	89.70	85.03	79.70
AD3	2	107.33	102.33	101.33	83.36	79.36	78.36
AD4	2	129.33	114.66	107.33	103.36	90.36	84.70
ADAP1	2	49.46	38.03	45.31	39.13	29.14	35.47
ADAP2	2	51.89	49.61	46.11	40.95	38.82	36.39
ADAP3	2	49.00	46.72	46.26	38.06	36.23	35.78
ADAP4	2	59.05	52.35	49.00	47.19	41.26	38.67

Para este análisis anexo se utilizó el programa *IBM SPSS 25.0* y los datos pasaron a ser normalizados por la prueba *Shapiro Wilk* (>0.05) y posteriormente por se aplicó una *t-student* de grupos independientes (<0.05) mostrando significancia estadística (figura 49).

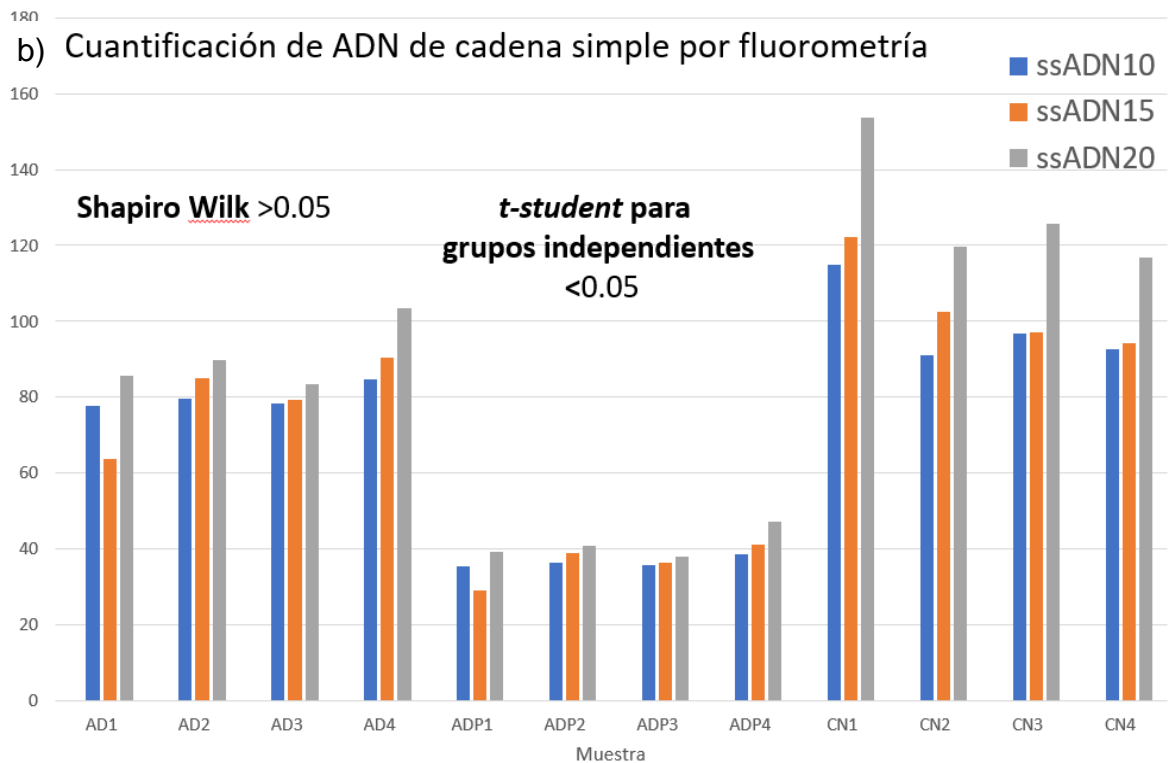
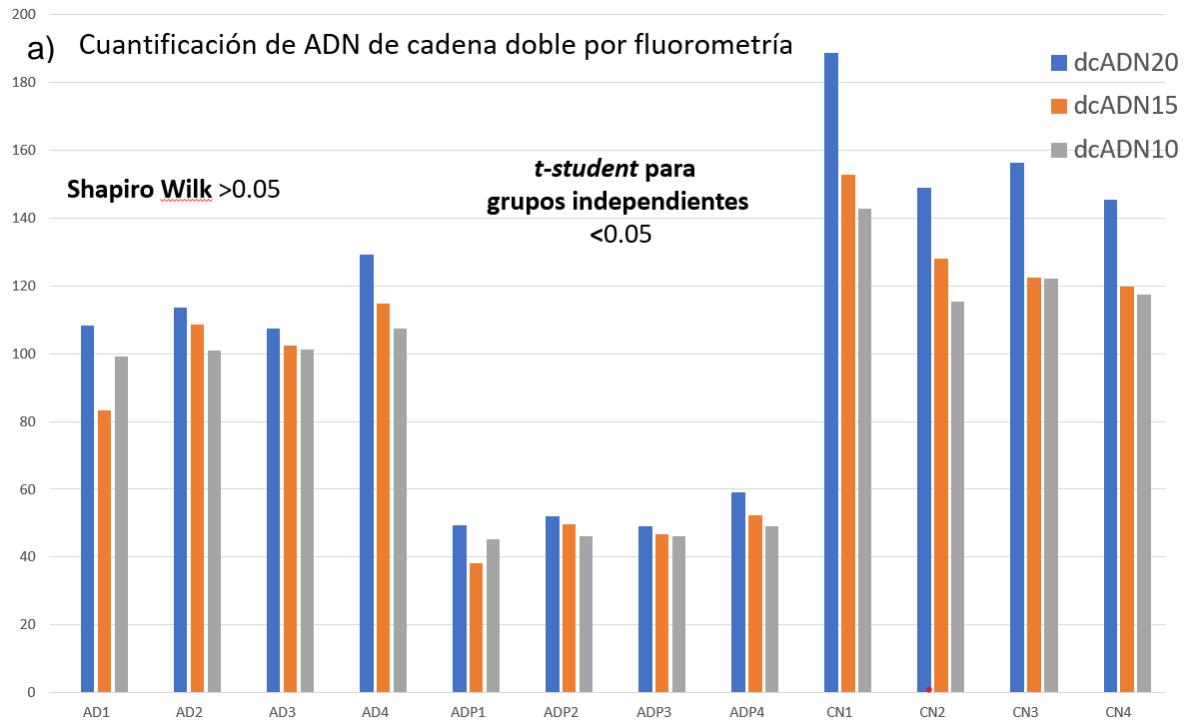


Figura 49. Cuantificación de ADN comparando 3 grupos en base a la teoría de edematización. 1. Andamio descelularizado (AD); 2. Andamio descelularizado proporcional (aplicando el ajuste por la teoría de edematización) (ADP); 3. Córnea nativa (CN). En la gráfica (a) cadena doble como en gráfica (b) se observa en el ADP una disminución de la mitad de la cantidad respecto al peso ganado por la edematización de la matriz referente a esta teoría.

4. En una corrida de TGA a 20 grados por minuto hasta 1000°C se muestra a 327.52°C el melting point (punto de derretimiento) correspondiente al 50% de la masa del andamio y una degradación total a los 817.13°C (figura 50).

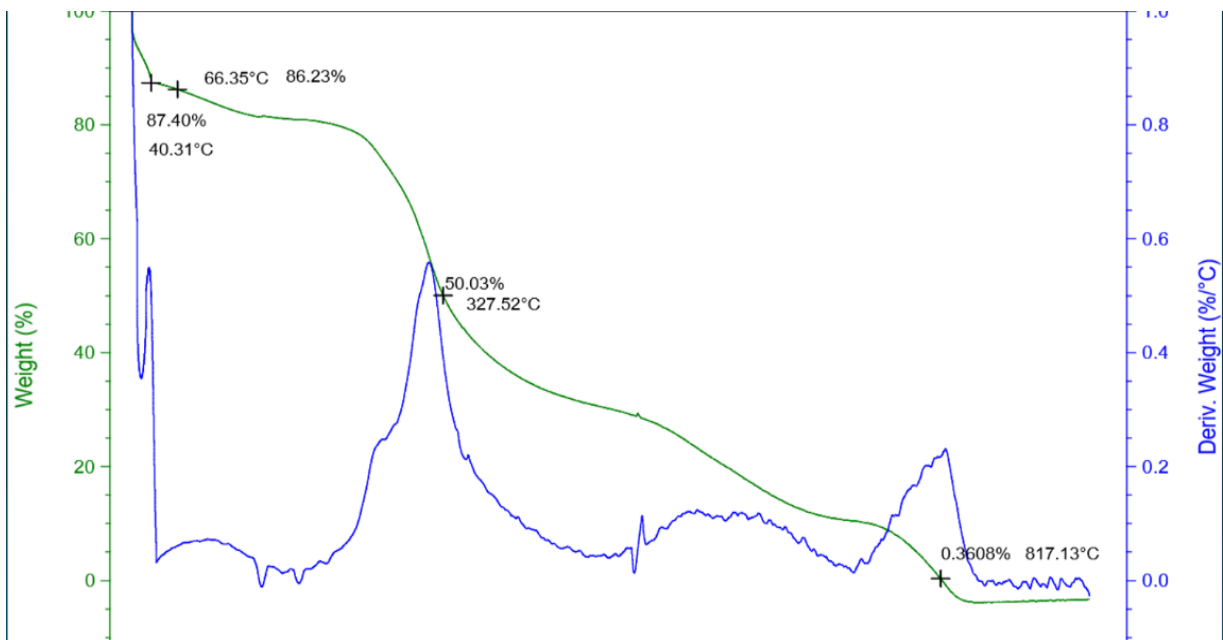


Figura 50. Corrida de TGA a 20 grados por minuto hasta 1000°C se muestra a 327.52°C el melting point y una degradación total a los 817.13°C.

5. Curva de viabilidad celular con fibroblastos corneales en el andamio descelularizado por la técnica de Alamar blue.

Rezasurin lectura a 492 nm									
Lectura a 24 h.	Control plato			Control sin células			Andamio repoblado		
Muestra	1	2	3	1	2	3	1	2	3
24 h.	0.543	0.55	0.571	0.537	0.541	0.569	0.468	0.476	0.495
48 h.	0.025	0.025	0.025	0.024	0.023	0.022	0.022	0.021	0.023
72 h.	0.024	0.025	0.025	0.025	0.025	0.023	0.021	0.022	0.021
Lectura a 48 h.									
24 h.	0.630	0.651	0.654	0.529	0.504	0.512	0.556	0.579	0.560
48 h.	0.541	0.507	0.517	0.545	0.559	0.566	0.488	0.485	0.488
72 h.	0.003	0.003	0.002	0.002	0.005	0.001	0.001	0.021	0.021
Lectura a 72 h.									
24 h.	0.639	0.657	0.660	0.523	0.494	0.506	0.551	0.574	0.549
48 h.	0.651	0.645	0.651	0.502	0.520	0.500	0.539	0.548	0.546
72 h.	0.465	0.503	0.501	0.517	0.497	0.515	0.534	0.502	0.517

Se consideró un promedio de diferencia de 0.0233 sobre los promedios de los resultados en las lecturas a 24 h., 48 h. y 72 h. y los resultados mostraron significancia evidenciando una proliferación en la [figura 51](#).

Tabla 7. Control de viabilidad celular en el biomaterial.

Tiempo	Control plato	Control células	Andamio Repoblado
24 horas	0.531	0.526	0.456
48 horas	0.498	0.533	0.464
72 horas	0.466	0.486	0.494



Figura 51. Viabilidad celular con queratocitos por la técnica Rezasurin. (a) Muestra que presenta una absorbancia en el control negativo (control andamio) y control células es mayor que el andamio repoblado, sin embargo, a las 72 h., la barra del andamio repoblado alcanza valores similares a el control de células; Y en la imagen (b) se observa una proliferación proporcional en cada día transcurrido.

13. Bibliografía

1. Derek W. DelMonte, MD, Terry Kim M. Anatomy and Physiology of the cornea. *J Cataract Refract Surg* [Internet]. 2011;37(3):588–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrs.2010.12.037>
2. Rüfer F, Schröder A, Erb C. White-to-white corneal diameter: Normal values in healthy humans obtained with the Orbscan II topography system. *Cornea* [Internet]. 2005;24(3):259–61. Available from: <http://doi.org.10.1097/01.ico.0000148312.01805.53>
3. Feizi S, Jafarinasab MR, Karimian F, Hasanpour H, Masudi A. Central and peripheral corneal thickness measurement in normal and keratoconic eyes using three corneal pachymeters. *J Ophthalmic Vis Res.* 2014;9(3):296–304.
4. Wilson SL, Haj AJ El, Yang Y. Control of Scar Tissue Formation in the Cornea: Strategies in Clinical and Corneal Tissue Engineering. *J Funct Biomater.* 2012;3(3):642–87.
5. Villa C. La córnea. Parte I Estructura, función y anatomía microscópica. *Gac Óptica Órgano Of del Colegio Nacional Ópticos-Optometristas España.* 2010;454(0210–5284):14–8.
6. García González RM, López Valle Y. Procesos de la visión : fundamentos morfofisiológicos [Internet]. Tlalnepantla Edo. de México: UNAM, Facultad de Estudios Superiores Iztacala; 2004 [cited 2019 Jul 10]. 169 p. Available from: <https://www.worldcat.org/title/procesos-de-la-vision-fundamentos-morfofisiologicos/oclc/57140113>
7. Li W., Hayashid Y., Chen YT. TS. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. *Cell Res* [Internet]. 2007;17(1):26–36. Available from: <http://doi.10.1038/sj.cr.7310137>
8. Secker G, Daniels JT. Limbal epithelial stem cells of the cornea [Internet]. *StemBook.* 2009. 1–18 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20614614>
9. Gipson IK. The epithelial basement membrane zone of the limbus. *Eye.* 1989;3(2):132–40.
10. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. *Indian J Ophthalmol* [Internet]. 2018 Feb [cited 2018 Dec 6];66(2):190–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29380756>
11. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531–46.
12. 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* [Internet]. 2017;124:180–94. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.02.003>

13. Miiller LJ, Pels L, Vrensen GFJM. Novel Aspects of the Ultrastructural Organization of Human Corneal Keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1995;36(13):2557–67. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/iovs/933408/>
14. Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32(8):2244–58.
15. Jester J V, Moller-Pedersen T, Huang J, Sax CM, Kays WT, Cavangh HD, et al. The cellular basis of corneal transparency: Evidence for “corneal crystallins.” *J Cell Sci*. 1999;112(5):613–22.
16. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Vol. 66, *Indian Journal of Ophthalmology*. 2018. p. 190–4.
17. Hofmann H, Fietzek PP, Kühn K. The role of polar and hydrophobic interactions for the molecular packing of type I collagen: A three-dimensional evaluation of the amino acid sequence. *J Mol Biol*. 1978;125(2):137–65.
18. Shoulders MD, Raines RT. Collagen Structure and Stability. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2009;78:929–58. Available from: <http://doi.10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
19. Ramshaw JAM, Shah NK, Brodsky B. Gly-X-Y tripeptide frequencies in collagen: A context for host-guest triple-helical peptides. *J Struct Biol*. 1998;122(1–2):86–91.
20. Copes F, Pien N, Van Vlierberghe S, Boccafoschi F, Mantovani D. Collagen-based tissue engineering strategies for vascular medicine. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7(166):1–15.
21. Agrawal VB, Tsai RJF. Corneal Epithelial Wound Healing. *Indian J Ophthalmol* [Internet]. 2003;51(1):5–15. Available from: <http://www.ijo.in/text.asp?2003/51/1/5/14743>
22. Ljubimov A V, Burgeson RE, Butkowski RJ, Michael AF, Sun TT, Kenney MC. Human corneal basement membrane heterogeneity: topographical differences in the expression of type IV collagen and laminin isoforms. *Lab Invest* [Internet]. 1995 Apr [cited 2018 Nov 8];72(4):461–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7723285>
23. Zhang Y, Gabriel MM, Mowrey-McKee MF, Barrett RP, McClellan S, Hazlett LD. Rat Silicone Hydrogel Contact Lens Model: Effects of High- Versus Low-Dk Lens Wear. *Eye Contact Lens Sci Clin Pract* [Internet]. 2008;34(6):306–11. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00140068-200811000-00004>
24. Knickelbein JE, Buela KA, Hendricks RL. Antigen-presenting cells are stratified within normal human corneas and are rapidly mobilized during ex vivo viral

- infection. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2014;55(2):1118–23. Available from: <http://doi.10.1167/iovs.13-13523>.
25. Higa K, Shimmura S, Miyashita H, Shimazaki J, Tsubota K. Melanocytes in the corneal limbus interact with K19-positive basal epithelial cells. *Exp Eye Res*. 2005;81(2):218–23.
 26. Bhela S., Varanasi SK., Jaggi U., Sloan SS., Rajasgi NK. RB. The Plasticity and Stability of Regulatory T Cells During Viral-Induced Inflammatory Lesions. *J Immunol*. 2017;199(4):1342–52.
 27. Lemischka, Ihor R. Moore KA. Stem cells and their niches. *Science* (80-). 2006;311(5769):1880–5.
 28. Thoft, RA., Friend J. The X, Y, Z Hypothesis of Corneal Epithelial Maintenance. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1983;24(10):1442–3.
 29. West-Mays JA, Dwivedi DJ. The keratocyte: Corneal stromal cell with variable repair phenotypes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(10):1625–31.
 30. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Corneal blindness: A global perspective. *Bull World Health Organ*. 2001;79(3):214–21.
 31. Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay MP. Prevention of corneal ulceration in the developing world. *Int Ophthalmol Clin*. 2002;42(1):71–7.
 32. Gonçalves ED, Campos M, Paris F, Gomes JÁP, Farias CC de. Ceratopatia bolhosa: etiopatogênese e tratamento. *Arq Bras Oftalmol*. 2008;71(6):61–4.
 33. Wilson SE, Bourne WM. Fuchs' dystrophy. *Cornea* [Internet]. 1988 [cited 2019 Jul 31];7(1):2–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3280235>
 34. nthony P. Adamis, Vadim Filatov, Brenda J. Tripathi RCT. Fuchs' endothelial dystrophy of the cornea.pdf.
 35. Gaynes BI, Oshinskie LJ. Pseudophakic bullous keratopathy. *J Am Optom Assoc*. 1985;56(10):794–6.
 36. Loureiro JC. Boletín estadístico informativo CENTRO NACIONAL DE TRASPLANTES (BEI-CENATRA). *Rev Iberoam Bioética*. 2017;(5):1.
 37. Jhanji V, Rapuano CJ, Vajpayee RB. Corneal calcific band keratopathy. *Curr Opin Ophthalmol*. 2011;22(4):283–9.
 38. Mansour AM, Haddad R. Optical coherence tomography of band keratopathy. *BMJ Case Rep*. 2016;2016:1–2.
 39. Weng SF, Jan RL, Chang C, Wang JJ, Su S Bin, Huang CC, et al. Risk of Band Keratopathy in Patients with End-Stage Renal Disease. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(June):1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep28675>
 40. Gomes JAP, Tan D, Rapuano CJ, Belin MW, Ambrósio R, Guell JL, et al. Global consensus on keratoconus and ectatic diseases. *Cornea*.

- 2015;34(4):359–69.
41. Ruiz-Morales ML, Verdiguél-Sotelo K, Hernández-López A. Frecuencia del queratocono y trasplante de córnea. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2010;48(3):309–12.
 42. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: A review. *Contact Lens Anterior Eye*. 2010;33(4):157–66.
 43. Davidson AE, Hayes S, Hardcastle AJ, Tuft SJ. The pathogenesis of keratoconus. *Eye [Internet]*. 2014;28(2):189–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/eye.2013.278>
 44. Imbornoni LM, Ninian C, Mcghee J, Belin MW, Science V, States U, et al. Evolution of Keratoconus : From Diagnosis to Therapeutics Die Evolution in der Behandlung des Keratokonus : von der Diagnose zur Therapie Authors Early History. 2018;680–8.
 45. Downie LE, Lindsay RG. Contact lens management of keratoconus. *Clin Exp Optom*. 2015;98(4):299–311.
 46. Squirrell DM, Winfield J, Amos RS. Peripheral ulcerative keratitis “corneal melt” and rheumatoid arthritis: a case series. *Rheumatology*. 1999;38(12):1245–8.
 47. Cao Y, Zhang W, Wu J, Zhang H, Zhou H. Peripheral Ulcerative Keratitis Associated with Autoimmune Disease: Pathogenesis and Treatment. *J Ophthalmol [Internet]*. 2017;Vol. 2017:12. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/7298026>
 48. Timlin HM, Hall HN, Foot B, Koay P. Corneal perforation from peripheral ulcerative keratopathy in patients with rheumatoid arthritis: Epidemiological findings of the British Ophthalmological Surveillance Unit. *Br J Ophthalmol*. 2018;102(9):1298–302.
 49. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benitez-del-Castillo JM, Hossain PN, et al. Neurotrophic keratopathy. *Prog Retin Eye Res [Internet]*. 2018;66:107–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.04.003>
 50. Sacchetti M, Lambiase A. Diagnosis and management of neurotrophic keratitis. *Clin Ophthalmol*. 2014;8:571–9.
 51. Belmonte C, Gallar J. Cold thermoreceptors, unexpected players in tear production and ocular dryness sensations. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3888–92.
 52. Gomez AG, De Gor Crooke JLG, García-Ben A, García-Campos JM. Dellen and corneal perforation after bilateral pterygium excision in a patient with no risk factors. *BMJ Case Rep*. 2015;2015:1–3.
 53. Rosenberg S. Corneal dellen. Following contact-lens wear. *Am J Ophthalmol [Internet]*. 1969;67(6):970. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/0002->

9394(69)90101-9

54. Kymionis GD, Plaka A, Kontadakis GA, Astyrakakis N. Treatment of corneal dellen with a large diameter soft contact lens. *Contact Lens Anterior Eye* [Internet]. 2011;34(6):290–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2011.07.002>
55. Tsai YY, Lin JM, Shy JD. Acute scleral thinning after pterygium excision with intraoperative mitomycin C: A case report of scleral dellen after bare sclera technique and review of the literature. *Cornea*. 2002;21(2):227–9.
56. Kern TJ. Ulcerative keratitis. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* [Internet]. 1990;20(3):643–66. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(90\)50055-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(90)50055-8)
57. Hamilton HL. Pediatric ocular emergencies. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* [Internet]. 1999;29(4):1003–22. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(99\)50087-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(99)50087-9)
58. Belknap EB. Corneal Emergencies. *Top Companion Anim Med* [Internet]. 2015;30(3):74–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2015.07.006>
59. Wilkie DA, Whittaker C. Surgery of the cornea. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* [Internet]. 1997;27(5):1067–107. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(97\)50104-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(97)50104-5)
60. Kinoshita S, Koizumi N, Ueno M, Okumura N, Imai K, Tanaka H, et al. Injection of cultured cells with a ROCK inhibitor for bullous keratopathy. *N Engl J Med*. 2018;378(11):995–1003.
61. Gonçalves ED, Paris FDS, Gomes JÁP, Kanecadan L, Campos M. Bullous keratopathy. *Ophthalmology*. 2011;118(11):5–7.
62. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol*. 2016;134(2):167–73.
63. Gold J, Chauhan V, Rojanasthien S, Fitzgerald J. Munson’s Sign: An Obvious Finding to Explain Acute Vision Loss. *Clin Pract Cases Emerg Med*. 2019;3(3):312–3.
64. Anderson K, El-Sheikh A, Newson T. Application of structural analysis to the mechanical behaviour of the cornea. *J R Soc Interface*. 2004;1(1):3–15.
65. Fullwood NJ. Collagen Fibril Orientation and Corneal Curvature. *Structure*. 2004;12(2):169–70.
66. Garralda A, Epelde A, Iturralde O, Compains E, Maison C, Altarriba M. Trasplante de córnea. 2006;29:163–73.
67. Mathews PM, Lindsley K, Aldave AJ, Akpek EK. Etiology of Global Corneal Blindness and Current Practices of Corneal Transplantation: A Focused Review. *Cornea*. 2018;37(9):1198–203.

68. Donald T H Tan, John K G Dart, Edward J Holland SK. Corneal transplantation. *Lancet*. 2012;379(9827):1749–61.
69. Zhu L, Zha Y, Cai J, Zhang Y. Descemet stripping automated endothelial keratoplasty versus descemet membrane endothelial keratoplasty: a meta-analysis. *Int Ophthalmol*. 2018;38(2):897–905.
70. Böhringer D, Grotejohann B, Ihorst G, Reinshagen H, Spierings E, Reinhard T. Rejection prophylaxis in corneal transplant - A randomized study of HLA matching (the FANCY study). *Dtsch Arztebl Int*. 2018;115(15):259–65.
71. Niederkorn JY. Corneal transplantation and immune privilege. *Int Rev Immunol*. 2013;32(1):57–67.
72. Gebhardt B. M. SW. Experimental corneal allograft rejection. *Immunol Res*. 2002;25(1):1–26.
73. Sniegowski MC, Erlanger M, Olson J. Thermal imaging of corneal transplant rejection. *Int Ophthalmol*. 2018;38(6):2335–9.
74. Yoon JW, Chang H, Lee SJ, Hwang YK, Hong DY, Lee SK, et al. Selective nitrogen capture by porous hybrid materials containing accessible transition metal ion sites. *Nat Mater*. 2017;16(5):526–31.
75. Sánchez Cornejo DM, Olivares Morales DO, Muñoz-ibarra P, Milagros Razo Blanco Hernández DD, Lima-gómez V, Pérez Taibo DC. Incidencia de rechazo a trasplante de córnea por grupos de pronóstico. *Rev del Hosp Juárez México*. 2009;76(3):117–21.
76. Muñoz Ocampo M, Valderrama Atayupanki Y, Aguirre Luna O, Rodríguez Almaraz M, Ramírez Ortíz M. Resultados visuales en pacientes pediátricos con trasplante de córnea: reporte de 10 años de experiencia. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2012;69(2):91–6.
77. Luis Othon Gittins-Nunez, Ernesto Diaz del Castillo-Martin, Irma Huerta-Albanil, Rita Rios-Prado MAS-D. Factores de riesgo y frecuencia de rechazo en pacientes con queratoplastia penetrante. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc [Internet]*. 2016;54(2):190–5. Available from: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=65210>
78. Hernández-Da Mota SE, Jacobo MP, Revuelta GG, Martínez RMP. Trasplante corneal en hospital de segundo nivel. Un análisis de supervivencia. *Gac Med Mex*. 2013;149(4):425–30.
79. Pascolini D, Mariotti SP. Global estimates of visual impairment: 2010. *Br J Ophthalmol*. 2012;96(5):614–8.
80. Hashimoto Y, Hattori S, Sasaki S, Honda T, Kimura T, Funamoto S, et al. Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model. *Sci Rep*. 2016;6(27734):1–9.

81. CENATRA. Centro nacional de trasplantes (CENATRA), estado actual de receptores, donación y trasplantes en México del 3er trimestre de 2019 [Internet]. 2019. p. 1–78. Available from: http://http://cenatra.salud.gob.mx/transparencia/trasplante_estadisticas.html
82. CENATRA. Centro nacional de trasplantes (CENATRA), reporte anual 2018 de donación y trasplantes en México. [Internet]. 2018. p. 1–81. Available from: <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>
83. Nathan AJ, Scobell A. How China sees America [Internet]. Vol. 91, Foreign Affairs. 2012. p. 1–81. Available from: http://http://cenatra.salud.gob.mx/transparencia/trasplante_estadisticas.html
84. Greiner MA, Li JY, Mannis MJ. Longer-term vision outcomes and complications with the boston type 1 keratoprosthesis at the university of California, Davis. *Ophthalmology*. 2011;118(8):1543–50.
85. Lynch AP, Ahearne M. Strategies for developing decellularized corneal scaffolds. *Exp Eye Res* [Internet]. 2012;108:42–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.12.012>
86. Ramos J. Desarrollo y análisis de un protocolo de descelularización para la obtención de válvulas cardíacas acelulares. Tesis Dr Univ León. 2014;25–304.
87. Nacionales I. Ingeniería de Tejidos y Medicina Regenerativa. Institutos Nac Salud [Internet]. 2013;1–3. Available from: <http://https://inr.gob.mx/i20.html>
88. Scheller, EL. Krebsbach, PH. Kohn D. Tissue engineering: state of the art in oral rehabilitation. *Bone* [Internet]. 2009;26(5):368–89. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19228277>
89. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications [Internet]. Vol. 20017, BioMed Research International. 2017. p. 1–14. Available from: <https://ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28540307>
90. Schumann P, Von See C, Kampmann A, Lindhorst D, Tavassol F, Kokemüller H, et al. Comparably accelerated vascularization by preincorporation of aortic fragments and mesenchymal stem cells in implanted tissue engineering constructs. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2011;97 A(4):383–94.
91. Zhang, Zhanpeng. Gupte, Melanie J. Ma PX. Biomaterials and Stem Cells for Tissue Engineering. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2013;13(4):527–40. Available from: <http://https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3596493/>
92. Gabriel D, Dvir T, Kohane DS. Delivering bioactive molecules as instructive cues to engineered tissues. *Expert Opin Drug Deliv*. 2012;9(4):473–92.
93. Denia D, Navarro M. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología Tissue engineering as a pillar of regenerative medicine in dentistry. *Rev Cuba Estomatol*. 2014;51(3):288–304.

94. Smith IO, Liu XH, Smith LA, Ma PX. Nano-structured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2009;1(2):226–36.
95. Rodríguez-Lozano FJ, Insausti CL, Iniesta F, Blanquer M, Ramírez M del C, Meseguer L, et al. Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(6):1062–7.
96. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006;27(19):3675–83.
97. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis*. 2009;15(May):2022–8.
98. Ponce Márquez S, Martínez VS, McIntosh Ambrose W, Wang J, Gantxegui NG, Schein O, et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomater*. 2009;5(6):1839–47.
99. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N₂ gas. *Mol Vis*. 2008;14(May):878–82.
100. Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, del Mar Perez M, Alamino M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):215–22.
101. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. 2011;32(12):3233–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
102. Fu RH, Wang YC, Liu SP, Shih TR, Lin HL, Chen YM, et al. Decellularization and recellularization technologies in tissue engineering. *Cell Transplant*. 2014;23(4–5):621–30.
103. Suzuki H, Terada T. Removal of dodecyl sulfate from protein solution. *Anal Biochem*. 1988;172(1):259–63.
104. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2004;1666(1–2):105–17.
105. Dahl SLM, Koh J, Prabhakar V, Niklason LE. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12(6):659–66.
106. Klebe RJ. Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature*. 1974;250(5463):248–51.
107. Linke D. Chapter 34 Detergents. An Overview [Internet]. 1st ed. Vol. 463, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc.; 2009. 603–617 p. Available from:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63034-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63034-2)

108. Megías M, Molist P, Pombal MA. Técnicas histológicas: Tinción [Internet]. Atlas de Histología Vegetal y animal. 2018. 1–29 p. Available from: <http://mmegias.webs2.uvigo.es/inicio.html>.
109. Montalvo-Arenas C. Técnica Histológica César Eduardo Montalvo Arenas. 2010;1–12.
110. Kapuscinski J. DAPI: a DNA-specific fluorescent probe. Biotech Histochem [Internet]. 1995 Sep [cited 2019 Apr 9];70(5):220–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8580206>
111. Kubista M, Akerman B, Norden B. Characterization of Interaction between DNA and 4',6-Diamidino-2-phenylindole by Optical Spectroscopy. Biochemistry. 1987;26(14):4545–53.
112. Palu' G, Valisena S, Barcellona ML, Masotti L, Meloni GA. DAPI - pUC8 complex: A tool to investigate biological effects of nucleic acid-drug interaction. Biochem Biophys Res Commun. 1987;145(1):40–5.
113. Garcia-Elias A, Alloza L, Puigdecanet E, Nonell L, Tajés M, Curado J, et al. Defining quantification methods and optimizing protocols for microarray hybridization of circulating microRNAs. Sci Rep. 2017;7(1):1–14.
114. Casaril AE, de Oliveira LP, Alonso DP, de Oliveira EF, Gomes Barrios SP, de Oliveira Moura Infran J, et al. Standardization of DNA extraction from sand flies: Application to genotyping by next generation sequencing. Exp Parasitol. 2017 Jun 1;177:66–72.
115. Gómez-Lizárraga KKTD. Obtención y caracterización de colágena tipo 1 a partir de tendón bovino.pdf. 2010. 1–111 p.
116. Lin SY, Li MJ, Cheng WT. FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biodiagnosis of human tissues. Spectroscopy. 2007;21(1):1–30.
117. Otero, Javier. Gutierrez-Cano VT de M. Espectroscopía Raman : Fundamento y aplicaciones. Revista Ingeniería e Investigación. 2014. 19 p.
118. Bonifacio A, Sergio V. Effects of sample orientation in Raman microspectroscopy of collagen fibers and their impact on the interpretation of the amide III band. Vib Spectrosc [Internet]. 2010;53(2):314–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vibspec.2010.04.004>
119. Janko M, Davydovskaya P, Bauer M, Zink A, Stark RW. Anisotropic Raman scattering in collagen bundles. Opt Lett. 2010;35(16):2765–2764.
120. Giraldo-Gomez DM. Obtención de un andamio acelular para sustitución de tráquea. UNAM-Dir. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) - Dirección General de Bibliotecas de la UNAM. México; 2011. 103 p.
121. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Principios de Análisis Instrumental. In:

Principios de Análisis Instrumental. 2001. p. 607–843.

122. Rincón J, Abello S. Aplicación de la técnica instrumental de la refractometría para análisis cuantitativo y cualitativos de muestras problema y mezclas binarias. *Sci Tech [Internet]*. 2016;0122–1701:1–7. Available from: <https://www.academia.edu/32015150/REFRACTOMETRÍA.pdf>
123. Hecht E. *Óptica*. Tercera ed. Rosa; WT, Manuel GPJ, editors. Madrid: Addison Wesley; 2000. 722 p.
124. Malacara D. *Óptica básica*. 3ra edició. México: FCE - Fondo de Cultura Económica; 2015. 532 p.
125. Vidal Salgado L, Vargas-Hernández C. Medición de la absorbancia óptica de soluciones acuosas mediante la instrumentación virtual y el control. *Sci Tech*. 2014;19(1):49–53.
126. Lunkenheimer P, Emmert S, Gulich R, Köhler M, Wolf M. Electromagnetic-radiation absorption by water. *Phys Rev E*. 2017;96(6):1–10.
127. González-Andrades M, Carriel V, Rivera-Izquierdo M, Garzón I, González-Andrades E, Medialdea S, et al. Effects of Detergent-Based Protocols on Decellularization of Corneas With Sclerocorneal Limbus. Evaluation of Regional Differences. *Transl Vis Sci Technol [Internet]*. 2015;4(2):13. Available from: <http://tvst.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/tvst.4.2.13>
128. Matthyssen S, Van den Bogerd B, Dhubhghaill SN, Koppen C, Zakaria N. Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomater*. 2018;69:31–41.
129. Wang HY, Wei RH, Zhao SZ. Evaluation of corneal cell growth on tissue engineering materials as artificial cornea scaffolds. *Int J Ophthalmol [Internet]*. 2013;6(6):873–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392340>
130. Chen Z, You J, Liu X, Cooper S, Hodge C, Sutton G. Biomaterials for corneal bioengineering. *Biomed Mater*. 2018;13(3).
131. Pang K, Du L, Wu X. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. *Biomaterials [Internet]*. 2010;31(28):7257–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.066>
132. Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Negishi J, Honda T, Hattori S, et al. Corneal regeneration by deep anterior lamellar keratoplasty (DALK) using decellularized corneal matrix. *PLoS One*. 2015;10(7):1–10.
133. Ma XY, Zhang Y, Zhu D, Lu Y, Zhou G, Liu W, et al. Corneal stroma regeneration with acellular corneal stroma sheets and keratocytes in a rabbit model. *PLoS One*. 2015;10(7):1–13.
134. Zhang J, Zhang CW, Du LQ, Wu XY. Acellular porcine corneal matrix as a

- carrier scaffold for cultivating human corneal epithelial cells and fibroblasts in vitro. *Int J Ophthalmol* [Internet]. 2016;9(1):1–8. Available from: http://www.ijo.cn/gjyken/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20160101&flag=1
135. Hospital F, Province S, Province G. Acellular ostrich corneal stroma used as scaffold for construction of tissue-engineered cornea. *Int J Ophthalmol* [Internet]. 2016;9(3):325–31. Available from: http://www.ijo.cn/gjyken/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20160301&flag=1
 136. Caraher MC, Sophocleous A, Beattie JR, O’Driscoll O, Cummins NM, Brennan O, et al. Raman spectroscopy predicts the link between claw keratin and bone collagen structure in a rodent model of oestrogen deficiency. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2018;1864(2):398–406. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.020>
 137. Morris MD, Mandair GS. Raman assessment of bone quality. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(8):2160–9.
 138. Cárcamo JJ, Aliaga AE, Clavijo RE, Brañes MR, Campos-Vallette MM. Raman study of the shockwave effect on collagens. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2012;86:360–5.
 139. Widjaja E, Lim GH, An A. A novel method for human gender classification using Raman spectroscopy of fingernail clippings. *Analyst*. 2008;133(4):493–8.
 140. Nguyen TT, Gobinet C, Feru J, Brassart-Pasco S, Manfait M, Piot O. Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy: Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. *Adv Biomed Spectrosc*. 2012;27(686183):7.
 141. Garland M, Morris JS, Stampfer MJ, Colditz GA, Spate VL, Baskett CK, et al. Prospective study of toenail selenium levels and cancer among women. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(7):497–505.
 142. Timchenko E V., Zherdeva LA, Timchenko PE, Volova LT, Ponomareva U V. Detailed Analysis of the Structural Changes of Bone Matrix during the Demineralization Process Using Raman Spectroscopy. *Phys Procedia*. 2015;73:221–7.
 143. Gasiór-Głogowska M, Komorowska M, Hanuza J, Maczka M, Kobielarz M. Structural alteration of collagen fibres - spectroscopic and mechanical studies. *Acta Bioeng Biomech*. 2010;12(4):53–60.
 144. Murab S, Ghosh S. Impact of osmoregulatory agents on the recovery of collagen conformation in decellularized corneas. *Biomed Mater* [Internet]. 2016;11(6):65005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-6041/11/6/065005>
 145. Pang K, Du L, Zhang K, Dai C, Ju C, Zhu J, et al. Three-dimensional

- construction of a rabbit anterior corneal replacement for lamellar keratoplasty. *PLoS One*. 2016;11(12):1–13.
146. Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, del Mar Perez M, Alamino M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(1):215–20.
 147. Bayyoud T, Thaler S, Hofmann J, Maurus C, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, et al. Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Curr Eye Res*. 2012;37(3):179–86.
 148. Coronato S, Laguens G, Di Girolamo V. Rol de las metaloproteinasas y sus inhibidores en patología tumoral. *Med*. 2012;72(6):495–502.
 149. Bayyoud T, Thaler S, Hofmann J, Maurus C, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, et al. Decellularized bovine corneal posterior lamellae as carrier matrix for cultivated human corneal endothelial cells. *Curr Eye Res*. 2012;37(3):179–86.
 150. S.C. Goheen LJL and JWK. Raman spectroscopy of intact feline corneal collagen. *North-holl Biomed Press*. 1978;536(1):197–204.
 151. Martínez Montes F, Pardo Vázquez JP, Riveros Rosas H. *Bioquímica de Laguna y Piña* (8a. ed.). Editorial El Manual Moderno; 2018. 764 p.
 152. Mano V, Ribeiro e Silva MES. Bioartificial polymeric materials based on collagen and poly (N-isopropylacrylamide). *Mater Res*. 2007;10(2):165–70.
 153. Jose M V., Thomas V, Dean DR, Nyairo E. Fabrication and characterization of aligned nanofibrous PLGA/Collagen blends as bone tissue scaffolds. *Polymer (Guildf)* [Internet]. 2009;50(15):3778–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.polymer.2009.05.035>