

**“Material Trilaminar Compuesto por Biomoléculas de
Bajo Costo Para la Construcción de Implantes
Corneales”**

JUAN FELIPE HERNÁNDEZ ESPINOZA

Tesis para optar al Grado Académico de Doctor/a en Ciencias de Materiales
Avanzados.

Director/a de Tesis : **Manuel Ahumada Escandón**

Santiago de Chile, Abril de 2024

**“Material Trilaminar Compuesto por Biomoléculas de
Bajo Costo Para la Construcción de Implantes
Corneales”**

Tesis presentada por:

JUAN FELIPE HERNÁNDEZ ESPINOZA

Para optar al Grado Académico de Doctor/a en Ciencias de Materiales
Avanzados.

APROBADA POR:

Dra. Paula Zapata

Académico/a. Examinador/a

Dr. José Rivera

Académico/a. Examinador/a

Dr. Leonardo Valdivia

Académico/a. Examinador/a

Dr. Igor Osorio

Académico/a. Examinador/a

12 - Abril – 2024

EXPEDIENTE DE GRADUACION DOCTORADO

FACULTAD/ESCUELA: VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN
NOMBRE COMPLETO: JUAN FELIPE HERNÁNDEZ ESPINOZA
RUT: 15.455.405-K

La Comisión Examinadora del Examen de Grado del(la) estudiante

ha determinado **aprobarlo(a) con nota** 6.8 **reprobarlo(a) con nota** _____

Dra. Paula Zapata
Nombre

Paula Andrea Zapata R
Firma

Dr. Igor Osorio
Nombre

Igor Osorio
Firma

Dr. Leonardo Valdivia
Nombre

Leonardo Valdivia
Firma

Dr. José Ricardo Rivera
Nombre

José Ricardo Rivera
Firma

FECHA:

12	04	24

FECHA DIRECTORIO:

Nº DIRECTORIO:

	<i>Juan Felipe Hernández Espinoza</i>	<i>Juan Felipe Hernández Espinoza</i>
--	---------------------------------------	---------------------------------------

JEFE OFICINA DE REGISTRO DE ESTUDIANTES

FIRMA ESTUDIANTE

DIRECTOR(A) DE DOCTORADOS

SOLO USO ACADÉMICO

AGRADECIMIENTOS Y/O DEDICATORIA

Deseo comenzar por agradecer a quienes me han tenido paciencia por mucho, mucho, mucho tiempo: a mi familia “adoptiva” los Lopez-Flores y a mi pequeño núcleo, Katty, Marcelo y mis sobrin@s Camila, Ignacio y Matías... Muchas gracias por contar con ustedes

Al CNAP que fue como mi casa chica en estos años y quienes siempre estaban ahí y siguen ahí dando vueltas como inmortales (Pauli, Fabian, Gloria, Diego, Fabiola, Pablo, Rafael y Manuel) otros, que ya han partido y espero recordarlos siempre con especial afecto (Esteban, Cesar, el pequeño Nicolas, Igor, Belén, Gabriel). Muchas gracias

Al comité académico que también me ha tenido una paciencia infinita hasta el último día y por el apoyo que siempre brindaron. Muchas gracias.

En particular a Manuel, una excelente persona y con un humor particular, que se dio el tiempo de ayudarme y aconsejarme en el desarrollo de esta tesis. Su aporte no tiene precio, muchas gracias.

También quiero agradecer a Ethel, quien me brindo la oportunidad de conocer en primera persona, el área de los biomateriales aplicados a la regeneración de tejidos y los bancos de tejidos. Muchas gracias.

A los olvidados... no, a ellos no.

No puedo olvidar agradecer a quienes financiaron este trabajo. El proyecto FONDECYT 11180616

Finalmente, a la Universidad Mayor, por las becas que permitieron comenzar y terminar este proceso. Y quien iba a pensar que, la primera universidad a la que asistí, cuando estaba en la media en a cursos de verano o invierno, seria también donde finaliza mi formación académica con un doctorado. Muchas gracias.

SOLO USO ACADÉMICO

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS Y/O DEDICATORIA.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS	v
LISTA DE ABREVIACIONES.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Marco teórico	4
1.1. El globo ocular	4
1.2. La córnea	5
1.3. Estructura y función corneal.....	6
1.4. Problemas visuales asociados a la córnea.....	8
1.5. Tratamientos destinados a mejorar o recuperar la visión	10
1.7. Costos	26
1.8. Definición del problema/Pregunta de investigación.....	28
II. HIPÓTESIS	31
III. OBJETIVOS.....	¡Error! Marcador no definido.
Objetivo General	33
Objetivos Específicos	34
IV. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
1. Materiales	35
2. Equipos y procedimientos.....	37
3. Metodología experimental.....	37

3.1. Metodología para el primer objetivo específico	37
3.2. Metodología para el segundo objetivo específico	40
3.3. Metodología para el tercer objetivo específico.....	43
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	45
1. Resultados y discusión del primer objetivo específico.....	46
2. Resultados y discusión del segundo objetivo específico	56
2.1. La evaluación espectroscópica por infrarrojo (FTIR)	56
2.2. Evaluación de transmitancia	59
2.3. Ensayos térmicos	61
2.3.1. Termogravimetría	61
2.4. Índice de refracción	67
2.5. Ángulo de contacto.....	68
2.6. Ensayos de degradación.....	71
2.7. Citocompatibilidad	75
3. Resultados y discusión del tercer objetivo específico	80
VI. CONCLUSIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	92
ANEXOS.....	121
Imágenes Complementarias.....	121
Esquema de la reticulación con glutaraldehído	122
Imágenes de los constructos trilaminares	124
Estructuras moleculares, protonación y solubilidad de alginato y quitosano	126
Consentimiento informado	128

SOLO USO ACADÉMICO

LISTA DE ABREVIACIONES

CXL	Crosslinking corneal
EDC	Clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
FTIR	Espectroscopía infrarrojo por transformada de Fourier
GA	Glutaraldehído
LED	Diodo emisor de luz
MES	Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidratado
NHS	N-Hidroxisuccinimida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución salina tamponada en fosfato
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TGA	Termogravimetría
TSG	Glutarato de tetrasuccinimidil éter de polietilenglicol de pentaeritritol
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta
UV-vis	Espectroscopía ultravioleta y visible

SOLO USO ACADÉMICO

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la formación de imagen en retina	3
Figura 2. Esquema de capas del globo ocular	5
Figura 3. Córnea. Corte histológico	6
Figura 4. Esquema de distribución y disposición de láminas de colágeno en el estroma corneal	7
Figura 5. Esquema de los estados refractivos del ojo.....	8
Figura 6. Tomografías de coherencia óptica de ectasias corneales	9
Figura 7. Fotografía de opacidad corneal por trauma perforante.	10
Figura 8. Esquema de la corrección óptica por lentes oftálmicas.	11
Figura 9. Esquema de ablación corneal.....	12
Figura 10. Esquema de queratoplastias lamelar y penetrante.....	15
Figura 11. Fotografías de queratoprótesis.....	17
Figura 12. Microscopia SEM de nanofibras de colágeno.....	23
Figura 13. Fotografía de las disoluciones testeadas	46
Figura 14. Fotografía de mezclas, prueba complementaria. Elaboración propia	47
Figura 15. Fotografía de la reticulación de quitosano con glutaraldehído	48
Figura 16. Espectrograma de absorbancia UV-vis de riboflavina	50
Figura 17. Fotografías de la coloración asociada a la reticulación.....	51
Figura 18. Fotografía de la reticulación con EDC-NHS	52
Figura 19. Graficas del porcentaje de masa seca de las formulaciones testeadas.	55
Figura 20. Espectrogramas de absorción FTIR de los precursores Poli-D-lisina, gelatina y quitosano.....	56
Figura 21. Espectrogramas FTIR de las formulaciones seleccionadas antes y después de reticular con glutaraldehído	58
Figura 22. Espectrograma FTIR para varias concentraciones de glutaraldehído	59
Figura 23. Espectrogramas de absorbancia UV-vis de formulaciones y córnea.....	60
Figura 24. Termogravimetrías de formulaciones.....	63
Figura 25. Termogravimetrías a distintas concentraciones de glutaraldehído	65
Figura 26. Calorimetría diferencial de barrido de formulaciones seleccionadas.....	66
Figura 27. Fotografías del ángulo de contacto a formulaciones seleccionadas.	70
Figura 28. Gráfica de los ángulos de contacto	71

Figura 29. Gráfico de la degradación hidrolítica de las formulaciones	72
Figura 30. Gráfica de la degradación enzimática	74
Figura 31. Citocompatibilidad de formulaciones	79
Figura 32. Fotografías de los constructos trilaminares liofilizados	81
Figura 33. Microscopias SEM de hidrogel trilaminar hidratado en agua y adhesivo	82
Figura 34. Microscopias SEM de córnea y formulaciones trilaminares.....	83
Figura 35. Gráfico del tamaño de poro de córnea y los hidrogeles trilaminares.	85
Figura 36. Gráficas de transmitancia para hidrogeles monolaminares y trilaminares	86
Figura 37. Tomografías de coherencia óptica de hidrogeles trilaminares con forma de córnea	87
Figura A1. Equipamiento utilizado.....	121
Figura A2. Esquema de la reacción entre las aminas y aldehídos	122
Figura A3. Microscopía SEM de hidrogel trilaminar destacando adhesivo y adherente.	124
Figura A4. Microscopías de campo claro de hidrogel trilaminar	124
Figura A5. Microscopía SEM de hidrogeles trilaminares elaborados	125
Figura A 6. Alginato, estructura, estado de protonación y curva de solubilidad	127
Figura A 7. Quitosano, estructura, estado de protonación y curva de solubilidad....	127
Figura A 8 Consentimiento informado	128

SOLO USO ACADÉMICO

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cirugías refractivas asistidas por láser.....	13
Tabla 2. Mezclas realizadas y volumen utilizado	39
Tabla 3. Conjunto de formulaciones testeadas.....	53
Tabla 4. índice de refracción de formulaciones, córnea y agua.....	68
Tabla 5. Ángulo de contacto de las 4 formulaciones	69

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

RESUMEN

En el mundo existen millones de personas con problemas visuales que derivan en ceguera parcial o total, conllevando con ello, consecuencias negativas tanto a nivel personal, como social y gubernamental. Entre las causas predominantes de ceguera, destacan aquellas relacionadas a la córnea, cuyo principal tratamiento corresponde a la queratoplastia para la cual, no existen suficientes tejidos que puedan suplir la demanda. El campo de la ingeniería de tejidos y la ciencia de materiales, han permitido el desarrollo de biomateriales que asemejan una córnea, con algunos de ellos en etapas clínicas. Sin embargo, a la fecha, estos materiales han mostrado ciertas limitaciones en términos de las propiedades fisicoquímicas que posee una cornea humana, además, de sus altos costos de producción. Es ello por lo que, esta tesis explora el diseño y desarrollo de un material avanzado que emule el tejido corneal, con el potencial de ser utilizado como implante o injerto. En este sentido, La investigación se enfocó en la creación de un biomaterial laminado utilizando gelatina y otras biomoléculas, de bajo costo económico, a través de la técnica de *casting*. La caracterización del material desarrollado consideró la evaluación de propiedades físicas (transmitancia, índice de refracción, porosidad, entre otros), químicas (entrecruzamiento, estabilidad térmica y en solución, degradabilidad hidrolítica y enzimática, entre otros) y biológicas *in vitro* (adhesión, proliferación y sobrevivencia) del material desarrollado demuestran su aplicabilidad como posible implante corneal. Los hallazgos revelan que las propiedades de formulaciones específicas creadas, fueron comparables a las corneas humanas, con una ventaja significativa en términos de costo, demostrando su potencial como alternativa sintética para el reemplazo del tejido corneal. Por tanto, esta investigación contribuye al campo de la regeneración y reemplazo corneal, sentando las bases en el desarrollo de formulaciones de bajo costo económico y ofreciendo una alternativa prometedora y económicamente accesible.

SOLO USO ACADÉMICO

ABSTRACT

In the world, millions of people with visual problems result in partial or total blindness, bringing with it negative consequences at both personal, social, and governmental levels. Among the predominant causes of blindness, those related to the cornea stand out, whose primary treatment is keratoplasty, for which there are not enough tissues to meet the demand. The field of tissue engineering and materials science has allowed the development of biomaterials that resemble cornea, some in clinical stages. However, to date, these materials have shown certain limitations in terms of the physicochemical properties that a human cornea possesses and their high production costs. For this reason, this thesis explores the design and development of an advanced material that emulates corneal tissue, with the potential to be used as an implant or graft. In this sense, the research focused on creating a laminated biomaterial using gelatin and other biomolecules, at a low economic cost, through the casting technique. The characterization of the developed material considered the evaluation of physical (transmittance, refractive index, porosity, among others), chemical (cross-linking, thermal and solution stability, hydrolytic and enzymatic degradability, among others), and in vitro biological (adhesion, proliferation, and survival) properties of the developed material demonstrate its applicability as a possible corneal implant. The findings reveal that the properties of specific formulations created were comparable to human corneas, with a significant advantage in terms of cost, demonstrating their potential as a synthetic alternative for the replacement of corneal tissue. Therefore, this research contributes to the corneal regeneration and replacement field, laying the foundations for developing low-cost economic formulations, and offering a promising and economically accessible alternative.

SOLO USO ACADÉMICO

I. INTRODUCCIÓN

La visión es el más importante de los sentidos, por él conocemos el mundo, sus colores, formas y texturas. Cuando la visión se encuentra afectada, surgen varios imprevistos relacionados a la disminución en la agudeza visual como es el caso de caídas, confundir etiquetas de remedios, accidentes e incapacidad para reconocer personas, por dar unos ejemplos. Lo anterior, se refleja sin lugar a duda, en un desmedro en la calidad de vida de las personas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el mundo hay 1100 millones de personas con deficiencias visuales que no tienen acceso a tratamiento. De esa cifra, 950 millones corresponden a deficiencias oculares relacionadas directa o indirectamente a la córnea (World Health Organization, 2019). Se estima que el costo para tratar la ceguera y los vicios de refracción solo en Estados Unidos alcanzó, en el año 2015, la suma de 7,8 billones de dólares (Eckert et al., 2015; James et al., 2018).

La córnea es, sin lugar a duda, un tejido imprescindible para el fenómeno visual, su superficie lisa, geometría esférica y cuerpo transparente actúan como una lente convergente que proyecta una imagen perfecta del mundo exterior sobre la retina, ver Figura 1. Cuando esta estructura se encuentra alterada, ya sea por patologías o traumatismos, el efecto sobre la visión es variable y puede manifestarse como una disminución en la sensibilidad al contraste, una reducción en el campo visual, una baja en la agudeza visual y en los casos más extremos, puede alcanzar la ceguera total (Mathews et al., 2018; Porth et al., 2019). El tipo de tratamiento depende de la etiología, los tratamientos corneales destinados para recuperar o mejorar la visión, suelen ser ópticos o quirúrgicos (Chuck et al., 2018; Vincent & Fadel, 2019). En los casos leves, el uso de lentes ópticos es suficiente para corregir imperfecciones visuales. Casos más complejos dependen de las características anatómicas y fisiológicas únicas del tejido corneal y, en particular, de su estroma, permitiendo que este pueda ser utilizado como sustrato quirúrgico, como es el caso de las cirugías refractivas *Laser-assisted in situ keratomileusis* (LASIK) (Chuck et al., 2018). En los casos más graves, y cuando la visión está

completamente comprometida, el tratamiento utilizado en clínica es el trasplante corneal y si, existiera rechazo del tejido donado o su opacificación, se recurre al uso de córneas artificiales también llamadas queratoprótesis (M. Chen et al., 2020), que no están exentas de complicaciones (Iyer et al., 2018).

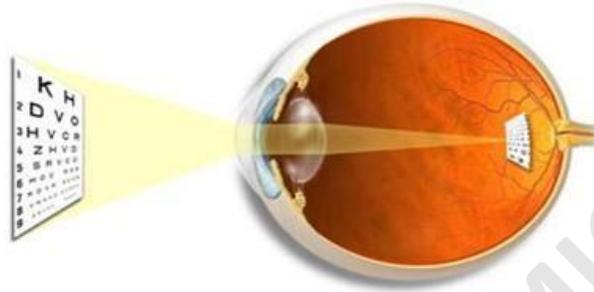


Figura 1. Esquema de la formación de imagen en retina. Bajo licencia (CCBY 3.0).

Dada las limitaciones de los tratamientos actuales, el establecer (o desarrollar) un material que reemplace el tejido corneal dañado, sin interferir en la función visual, es decir, un material que adopte la forma, transparencia, promueva la regeneración celular, biocompatibilidad, biodegradabilidad y posea propiedades mecánicas similares a la córnea, simplificaría el acceso a un tratamiento quirúrgico de reemplazo tisular, en comparación a la baja o nula disponibilidad de donantes de córneas compatibles. A la búsqueda de esta piedra angular en ingeniería de tejidos, varios grupos de investigación han realizado ensayos con distintos materiales que puedan reemplazar el estroma corneal. Sin embargo, aún no ha sido desarrollado el reemplazo estromal ideal que sea biomimético, citocompatible y trasplantable (Matthyssen et al., 2018).

Lo expuesto anteriormente, refleja las limitadas opciones existentes para tratar las alteraciones visuales, respecto a cuándo la integridad corneal está comprometida. Para hacer frente a este reducido abanico de posibles tratamientos, postulamos la creación de un material avanzado, que emule el tejido corneal y pueda ser utilizado como implante o injerto que, permita la corrección de vicios refractivos, favoreciendo la migración y diferenciación

celular, que sea biodegradable a razón de la regeneración tisular, ópticamente compatible y finalmente accesible económicamente.

Para conseguir tal objetivo, se propuso el diseño y desarrollo de un material laminado a partir gelatina y otras biomoléculas con reconocida utilidad en la creación de andamios e ingeniería regenerativa en la construcción un material multilaminar que asemeje el tejido estromal. El material desarrollado fue caracterizado física-, química-, y biológicamente, para establecer y asegurar el cumplimiento de condiciones como posible implante corneal.

A continuación, en la sección de marco teórico se exponen las bases fisiológicas y anatómicas del tejido corneal, las cuales son fundamentales para la elaboración y desarrollo del material a base de macromoléculas en conjunto con el análisis del estado del arte de otros tratamientos. Además, se da una descripción del tipo de material escogido, técnicas de síntesis y preparación de hidrogeles y sistemas laminares, siendo la discusión enfocada en su aplicabilidad en sistemas biológicos.

1. Marco teórico

1.1. El globo ocular

Situado en la cavidad orbitaria, el ojo, es la principal ventana al mundo exterior. Su desarrollo tiene un comienzo embrionario entre la tercera y cuarta semana de gestación, sus tejidos provienen del ectodermo y del tubo neural en el prosencéfalo (Sadler & Langman, 2019). Finalizando su desarrollo entre los primeros años de infancia y adolescencia (Van Cruchten et al., 2017). El ojo maduro, en condiciones óptimas al término de su desarrollo, alcanza un diámetro de 25 mm y un volumen de 8.2 mL. Histológicamente, el ojo puede ser descrito en tres capas (Mescher, 2018; Moore et al., 2017).

1. Capa externa: estructura fibrosa que da rigidez al globo ocular, constituida principalmente por colágeno. Comprende córnea y esclera (Figura 2A).

2. Capa media: compuesta principalmente por vasos sanguíneos y responsable del suministro metabólico. Comprende coroides, cuerpo ciliar e iris (Figura 2B).
3. Capa interna: comprende la retina que es una lámina fina donde la información visual es convertida en señales nerviosas que viajan por el nervio óptico al cerebro (Figura 2C).

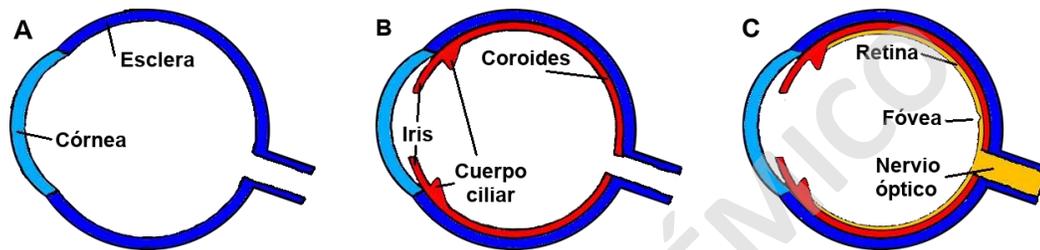


Figura 2. Esquema de capas del globo ocular. En A la capa externa que comprende córnea y esclera; en B la capa media comprende coroides, cuerpo ciliar e iris; y en C capa interna que corresponde a la retina. Elaboración propia.

1.2. La córnea

La córnea, es un tejido fibroso, ocupa la sexta parte anterior de la capa externa del globo ocular, limitando radialmente con la esclera en el limbo esclerocorneal, es transparente y está constituida principalmente por agua (hasta un 78% de su masa) y colágeno (71% de masa seca) laminarmente organizado (Adler et al., 2011). Anatómicamente está constituida por una serie de 5 capas (Adler et al., 2011; Mescher, 2018) que, de afuera hacia adentro, son el epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio (Mescher, 2018), como se puede ver en la Figura 3. Sin embargo, existe evidencia de una sexta capa (del Buey Sayas & Peris Martínez, 2014), que se ubica entre el estroma y la membrana de Descemet (Dua et al., 2013).

La cornea junto a la película lagrimal, forman el principal medio refractivo del sistema visual, aportando 2/3 del poder dióptrico del ojo (Adler et al., 2011). Por ello, su arquitectura, contenido y transparencia, son cualidades primordiales para la visión. Gran parte de las propiedades mecánicas y ópticas

de la córnea, son atribuidas al estroma, cuyo espesor ocupa cerca del 90% del tejido macizo (J. Ma et al., 2018; Mannis & Holland, 2017).

1.3. Estructura y función corneal

Como se mencionó previamente, la córnea se describe clásicamente como un conjunto de 3 capas y 2 membranas apiladas (Figura 3A). La lámina más externa es su epitelio estratificado constituido por unas 5 a 6 capas celulares, que se aplanan al alejarse de la capa celular basal (Figura 3B). Estas células de aspecto escamoso, los queratocitos, poseen una microvellosidad en su cara apical que aumenta el contacto e interacción con la película lagrimal (Mannis & Holland, 2017). A diferencia de otros epitelios, este carece de queratina y se encuentra altamente innervado (Adler et al., 2011). Su función junto a la película lagrimal es refractar la luz y ser una barrera fisiológica (Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014). Soportando el epitelio, se encuentra la membrana de Bowman, compuesta por fibras de colágeno tipo I, contribuyendo a la estabilidad y rigidez corneal (Kling & Hafezi, 2017). El estroma, es la capa de mayor volumen, se encuentra formada por láminas de manojos de colágeno tipo I y V.

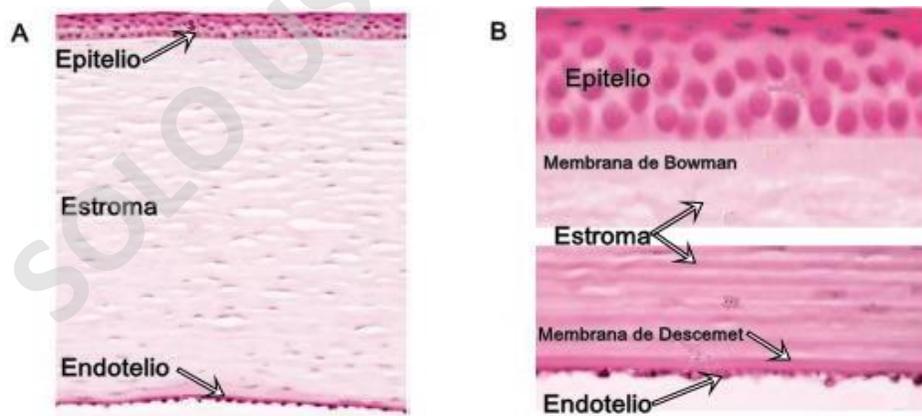


Figura 3. Córnea. Corte histológico corneal en A; y sus capas en B. Modificado de Junqueira's Basic Histology Text and Atlas (p. 494), por Mescher Anthony, 2011, McGraw-Hill Education.

La disposición adoptada por las láminas de colágeno del estroma se puede observar en la Figura 4. En el tercio anterior, las láminas se entrelazan entre ellas formando sin seguir un orden aparente (Figura 4B) los dos tercios posteriores, se encuentran apiladas y orientadas ortogonalmente entre ellas (Figura 4C) (Adler et al., 2011).

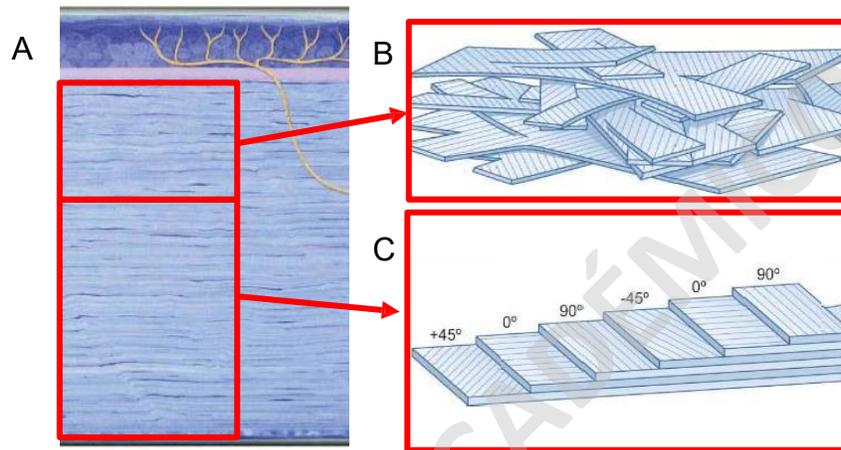


Figura 4. Esquema de distribución y disposición de láminas de colágeno en el estroma corneal. En A se observa un corte transversal; en B la orientación azarosa de las láminas de colágeno en el tercio corneal anterior y en C la orientación transversal y ordenada de las láminas de colágeno en los 2/3 corneal posterior. Modificado de Adler's Physiology of the Eye (p. 106), Por Levin, Mosby Elsevier.

La separación uniforme de las fibrillas de colágeno está regida por la presencia de proteoglicanos tales como el queratán sulfato y dermatán sulfato, que distancian de forma uniforme las fibrillas y mantienen fija su organización espacial. Esta disposición le brinda transparencia y resistencia mecánica (Adler et al., 2011; Meek & Knupp, 2015; Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014). Entre las láminas de colágeno, se encuentran los queratocitos, células fibroblásticas de aspecto plano y nucleadas, que son responsables del mantenimiento de la matriz extracelular (Mescher, 2018). Su citoplasma, contiene una proteína soluble llamada "cristalina" que aportaría a su transparencia (Jester, 2008).

La capa siguiente, es la membrana de Descemet, constituida por fibras de colágeno tipo IV, sirve de soporte y membrana basal de la capa más interna de la córnea, el endotelio. Este último, consta de una sola capa de células hexagonales que producen el colágeno tipo IV, y que, mediante el uso de bombas Na^+/K^+ mantiene los niveles de hidratación estables, contribuyendo a la transparencia y refracción (Adler et al., 2011; Mescher, 2018; Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014; Weisenthal et al., 2018).

1.4. Problemas visuales asociados a la córnea

A nivel óptico la percepción visual estará siempre relacionada a la geometría de los medios refractivos del globo ocular, como es el caso de la córnea. Pequeñas imperfecciones en sus superficies o espesor alteran la imagen proyectada en retina, provocando una visión borrosa. Ejemplificación de esto, son los vicios de refracción y las ectasias. Otras afecciones son adquiridas o secundarias a traumas oculares. Estos pueden afectar profundamente la visión, debido a complicaciones y pérdida de transparencia, reduciendo la percepción visual.

1.4.1. Vicios de refracción

El estado de refracción ideal (emetrópia), se da cuando el largo axial del ojo coincide con la distancia focal del conjunto de medios refractivos (Figura 5A). De este modo, cuando esa coincidencia espacial no se cumple, se denomina ametropía (Montés-Micó, 2011). La miopía (Figura 5B), hipermetropía (Figura 5C) y astigmatismo (Figura 5D) son las ametropías visuales.

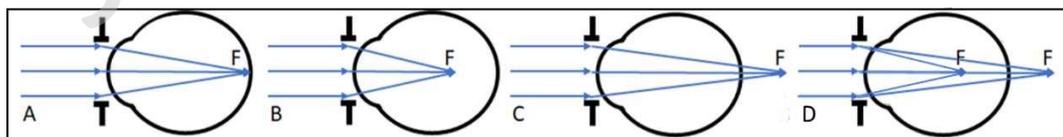


Figura 5. Esquema de los estados refractivos del ojo. En A un ojo emétrico; en B un ojo miope; en C un ojo hipermetrope y en D un ojo con astigmatismo. Elaboración propia.

La refracción ocular está ligada al poder refractivo de la córnea, cristalino y de su separación (Montés-Micó, 2011). En el 2015, Hashemi et al. reportó que cambios en el largo axial y el poder corneal, son significativos en las ametropías esféricas elevadas (miopía e hipermetropía) (Hashemi et al., 2015). El aporte refractivo de la córnea es considerablemente mayor que el aportado por el cristalino, por ello, modificaciones en su curvatura modifican en el valor de la refracción (Boyd, 2000). El astigmatismo, es una condición donde los medios refractivos, generalmente la córnea adopta una geometría tórica (dos radios de curvatura) que puede variar fisiológicamente. El astigmatismo se determina por la diferencia entre, la fuerza dióptrica de sus meridianos (Montés-Micó, 2011). La refracción de una superficie tórica provoca que la imagen de un punto forme dos líneas focales, correspondientes a los meridianos de menor y mayor fuerza dióptrica (Furlan et al., 2009).

1.4.2. Ectasias corneales

Las ectasias corneales son patologías progresivas que afectan la forma y espesor corneal. Entre ellas se encuentran el queratocono, la degeneración marginal pelúcida y el queratoglobo (Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014) La Figura6A muestra una OCT a una córnea normal. La Figura6B muestra un

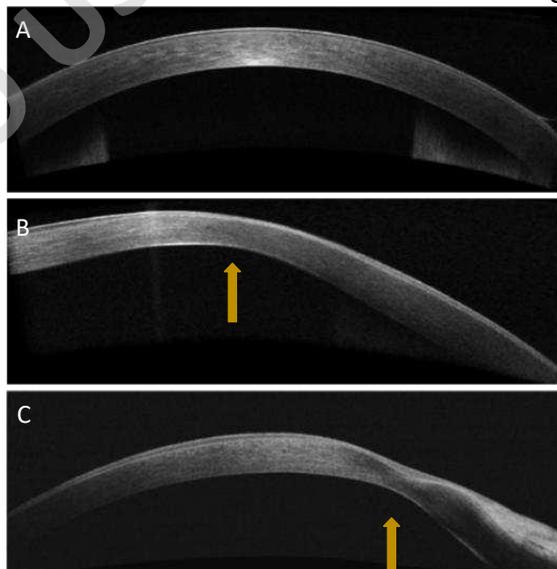


Figura 6. Tomografías de coherencia óptica de ectasias corneales. En A una córnea sana; en B una córnea con queratocono y en C una córnea con degeneración marginal pelúcida. Bajo licencia (CCBY 3.0)

queratocono, este se caracteriza por una protrusión junto al adelgazamiento estromal. Por su parte, la degeneración marginal pelúcida que se muestra en la Figura 6C presenta un adelgazamiento estromal en la periferia corneal (Lenk et al., 2016; Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014). El queratoglobo, por su parte, es visto como una complicación o evolución del queratocono (Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014) que clínicamente es una protrusión globular y adelgazamiento estromal de limbo a limbo (Gupta & Ganger, 2016; Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014).

1.4.3. Traumatismos

Los traumas oculares se presentan como un amplio espectro de alteraciones y representan el 3% de las urgencias oftalmológicas (Willmann et al., 2020). Según la etiología, estas pueden ser abrasivas, perforantes y quemaduras (Barrientez et al., 2019). La intensidad y lugar de la lesión presenta cuadros clínicos diversos y que pueden afectar el párpado, la órbita y al globo ocular (Salmon, 2020). En la córnea, las lesiones pueden causar alteraciones en su estructura y fisiología afectando su transparencia (Figura7) y pueden requerir de trasplantes corneales (Barrientez et al., 2019).



Figura 7. Fotografía de opacidad corneal por trauma perforante. Tomado de Corneal injury: Clinical and molecular aspects de Barrientes et al; Experimental Eye Research 2019;186, 107709.

1.5. Tratamientos destinados a mejorar o recuperar la visión

1.5.1. Tratamientos no quirúrgicos

Los vicios de refracción clásicamente se han compensado de forma óptica con el uso de anteojos y lentes de contacto o lentillas (Furlan et al., 2009), los

cuales son utilizados para desplazar el plano imagen de un ojo amétrope a su retina y de esta manera compensar la refracción, ver Figura 8. La diferencia entre los anteojos y las lentillas es donde se aplica la corrección óptica, siendo en el aire en los anteojos y sobre la córnea en las lentillas. Lo anterior, permite que las lentillas brinden un mayor campo visual que los anteojos, que producto de encontrarse en un marco, solo brindan una buena visión a través de esa pequeña ventana que condiciona la amplitud del campo visual. Las lentillas que son fabricadas en materiales semirrígidos tienen gran aceptación visual por sobre los anteojos en pacientes con ectasias (Downie & Lindsay, 2015), córneas irregulares (Porcar et al., 2017) y en la rehabilitación posterior a queratoplastias (Severinsky et al., 2014), ya que estos pueden cubrir los defectos en la superficie corneal con la lagrimea que se encuentra entre el lente y la córnea.

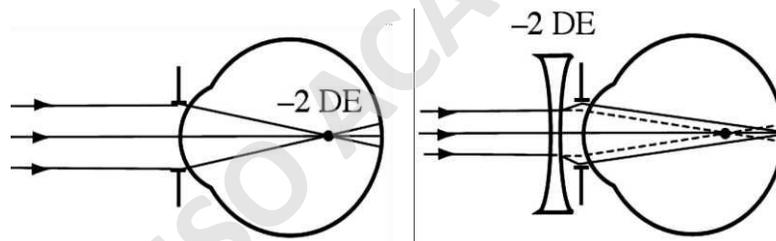


Figura 8. Esquema de la corrección óptica por lentes oftálmicas. A la izquierda un ojo con miopía enfoca la luz antes de llegar a retina y a la derecha el esquema de su corrección con lentes divergentes y enfocando la luz en retina. Modificado de *Fundamentos de optometría Refracción ocular* (p. 68), por Furlan, García y Muñoz, Universitat de València.

1.5.2. Tratamientos quirúrgicos

1.5.2.1. Cirugías refractivas

Con este nombre se engloba una serie de procedimientos quirúrgicos destinados a corregir el estado refractivo del ojo, realizando modificaciones a la córnea o al cristalino (Salmon, 2020). Algunas técnicas utilizadas para alcanzar este objetivo son asistidas por láser (Moshirfar et al., 2018) que, por medio de una ablación selectiva y precisa, permite la remoción de tejido estromal modificando su grosor y curvatura como se ilustra en la Figura 9 para la corrección de hipermetropía y miopía.

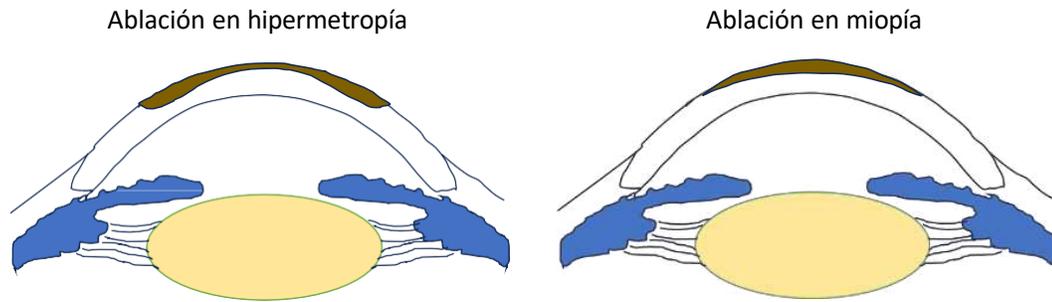


Figura 9. Esquema de ablación corneal. A la izquierda el perfil de ablación láser para la corrección de hipermetropía y a la derecha el perfil de ablación para corregir miopía. Elaboración propia.

Otras, modifican la refracción utilizando implantes ópticos, conocidos como lentes intraoculares (LIO) que, pueden o no, reemplazar el cristalino (Martínez-Plaza et al., 2020; Zvorničanin & Zvorničanin, 2018). Las cirugías asistidas por láser utilizan longitudes de onda pertenecientes al ultravioleta, para ello, se requiere de la emisión de un fotón de alta energía (6,4 eV) y una longitud de onda de 193 nm, que se produce a partir de la separación espontánea del dímero Argón-Flúor (inestable), que se forma al aplicar una elevada diferencia de potencial a la cavidad del láser que contiene dicha mezcla de gases. Esta energía es capaz de romper los enlaces moleculares del tejido corneal (3.4 eV para enlaces C-C y 3.0 eV en enlaces peptídicos), permitiendo remover entre 0,22 - 0,25 μm de tejido (Vance & Gordon, 1994). Entre las técnicas quirúrgicas asistida por láser, se encuentran: la queratectomía fotorrefractiva, *queratomileusis in situ* asistida con láser y la *queratomileusis* subepitelial asistida con láser. Estas son más reconocidas por sus siglas en inglés PRK, LASEK y LASIK, respectivamente. La Tabla 1 resume algunas características más relevantes de las cirugías refractivas convencionales asistidas por láser LASIK, LASEK y PRK.

La corrección refractiva con LIO brindan una excelente oportunidad a pacientes que no son candidatos a tratamientos de corrección corneal, como es el caso de refracciones muy elevadas o corneas muy delgadas, e incluso,

Tabla 1. Cirugías refractivas asistidas por láser.

	LASIK	LASEK	PRK
<i>Aplicación</i>	Sobre estroma profundo y requiere de colgajo.	Sobre estroma anterior y requiere de colgajo.	Sobre el estroma subepitelial requiere remoción epitelial sin colgajo.
<i>Ventajas</i>	Mayor rango de corrección, útil en córneas gruesas.	Baja incidencia de ojo seco.	Predecible, preciso y reproducible. Aplicable a córneas delgadas.
<i>Complicaciones</i>	Queratitis lamelar difusa, desperfectos en el colgajo, desarrollo de ectasias, aberraciones de alto orden, ojo seco y retinopatías.	Recuperación lenta, sensación dolor, requiere uso de lentes de contacto terapéuticos.	Corrección insuficiente o excesiva, regresión, descentración y opacidad, ectasia corneal y ojo seco.

para cuando hay presencia de cataratas en el cristalino. La LIO puede reemplazar la función del cristalino utilizando diseños multifocales. El avance en el desarrollo de materiales y diseños han permitido, además, crear LIO implantables tanto en la cámara anterior como en la cámara posterior, con o sin, reemplazo del cristalino. Cuando no es reemplazado el cristalino, estas lentes son llamadas LIO fáquicas (René Moreno et al., 2010). También hay métodos que modifican el espesor y curvatura corneal por la introducción o incrustación (*corneal inlays*) de materiales poliméricos sintéticos o biológicos en el estroma corneal (Nuijts et al., 2010), de este modo, es posible cambiar el poder refractivo corneal. Uno de estos, es el Kamra®, creado con polifluoruro de vinilideno y nanopartículas de carbono (Naroo & Bilkhu, 2016), el cual es utilizado en el tratamiento de la presbicia. Las complicaciones que se han presentado en las incrustaciones son varias y, principalmente,

inflamatorias por el rechazo al cuerpo extraño (S. E. Wilson, 2020) y que en condiciones extremas puede causar necrosis (Taneri et al., 2018).

1.5.2.2. Entrecruzamiento corneal

Esta técnica, también conocida como *corneal crosslinking* (CXL), se realiza con la finalidad de dar mayor rigidez al estroma de corneas queratectásicas. Estas patologías, caracterizadas por la protrusión y adelgazamiento corneal progresivo, han pasado por varios tipos de tratamiento, principalmente destinados a eliminar la sintomatología visual con el uso de lentes de contacto (Downie & Lindsay, 2015), o la incrustación estromal de segmentos anulares (Colin et al., 2000).

En la actualidad, la investigación está centrada en detener la progresión y aumentar la rigidez corneal (Jhanji et al., 2011). Con este cometido, se ha utilizado la riboflavina como agente reticulador de colágeno corneal, presentando estabilidad y baja progresión a largo plazo (Hashemi et al., 2013). La técnica quirúrgica consiste en aplicar riboflavina sobre el estroma, previa remoción del epitelio, la que es activada con luz ultravioleta de longitud de onda larga (UVA) de 370 nm (Hashemi et al., 2013). Si bien, se desconoce el mecanismo exacto por el cual se produce el entrecruzamiento entre las fibras de colágeno, se ha asociado la reticulación principalmente a los grupos carbonilos libres y a la presencia de oxígeno singlete (Scott McCall et al., 2010). Entre las limitaciones que tiene la aplicación de riboflavina, se encuentra su naturaleza hidrofílica que impide su difusión por el epitelio y, por lo cual, la técnica requiere la remoción epitelial antes de su instilación, sin embargo, el mercado farmacéutico ha creado varios tipos de riboflavinas (Benatti et al., 2022), una de ellas compuesta por una nanoemulsión biocompatible basada en riboflavina-5-fosfato y riboflavina, que puede atravesar la barrera epitelial (Bottos et al., 2013), sin necesidad de remover el epitelio y evitando las complicaciones que se pueden desencadenar como opacidad, cicatrices, daño endotelial, infiltrados estériles y reactivación del herpes (Dhawan et al., 2011). No obstante, requiere 8 veces más tiempo para

alcanzar la misma concentración de riboflavina en el estroma, si es comparado con el tiempo requerido por el método de remoción epitelial (Bottos et al., 2013). Por tanto, la técnica transepitelial es menos efectiva que la técnica convencional (Al Zubi et al., 2019; Wollensak & Iomdina, 2009).

1.5.2.3. Trasplante corneal (queratoplastia)

Es para muchos casos de alteración irreversible de la córnea, la última alternativa y consiste en el reemplazo del tejido corneal anómalo por un tejido sano de un donante. Entre los diferentes tipos de trasplantes, el trasplante corneal representa el mayor número de cirugías realizadas en humanos (Gain et al., 2016). Las principales indicaciones de este procedimiento son: distrofia de Fuchs, queratocono, y secuelas infecciosas (Gain et al., 2016). La forma en que se realiza este procedimiento puede ser de dos tipos, el primero, involucra el reemplazo de todo el grosor corneal, llamada queratoplastia penetrante (Figura 10B) y la que consiste en el reemplazo de solo una porción laminar superficial o profunda (Figura 10C), denominada queratoplastia lamelar anterior o posterior (Salmon, 2020). Entre las dos técnicas, cuando son utilizadas en el tratamiento del queratocono, el tipo lamelar profunda presenta un menor número de rechazo respecto de la queratoplastia penetrante, sin

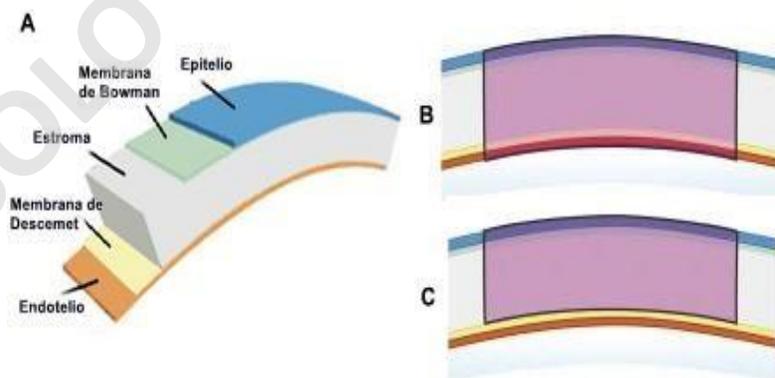


Figura 10. Esquema de queratoplastias lamelar y penetrante. En A las capas corneales; en B la queratoplastia penetrante que afecta todo el espesor corneal; y C queratoplastia lamelar, donde se reemplazan solamente las capas dañadas y se conserva el endotelio corneal. Modificado de *The Evolution of Corneal Transplantation* de Rock, Landenberger, Bramkamp, Bartz-Schmidt, *Annals of Transplantation*, 22, 749 – 754

embargo, la de tipo penetrante tiene mejor éxito en la calidad visual (Henein & Nanavaty, 2017).

Las complicaciones asociadas a la queratoplastia lamelar profunda son las microperforaciones, el glaucoma secundario y el síndrome de Urretz-Zavalía. En queratoplastia penetrante son el rechazo endotelial y el defecto epitelial (Pérez Parra et al., 2020). Si bien, según se reporta en la *encuesta global de trasplante corneal y banca ocular* (Gain et al., 2016), las tasas de éxito son elevadas en las queratoplastias realizadas a nivel mundial, su número, como de los tiempos de espera y las córneas donadas, son variables entre países, existiendo algunos con capacidad de exportar córneas, siendo la falta de donantes el principal obstáculo (Gain et al., 2016). Para Chile, la situación no es mejor, en el año 2017, según cifras reportadas por el Ministerio de Salud, solo se contó con 173 donantes de los cuales solo 44 fueron córneas procuradas, y del total de trasplantes informados (457) ni uno solo correspondía a trasplante corneal (Minsal, 2017). La página dependiente del Ministerio de Salud “Yo dono vida” (<https://yodonovida.minsal.cl>) publica y actualiza constantemente el número de pacientes en lista de espera de trasplante a nivel nacional. Al mes de noviembre del 2023, dicha página no publicó la cifra de pacientes que esperan por una queratoplastia. Sin embargo, a través servicio de transparencia (<https://www.portaltransparencia.cl/>) se pudo acceder a dichas cifras. La lista de espera a diciembre del 2022 fue de 879 pacientes, mientras el mismo año se donaron 98 córneas, 31 fueron importadas y el total de cirugías realizadas fue de 121.

1.5.2.4. Queratoprótesis

La última posible opción para recuperar la funcionalidad visual de un ojo, cuya córnea no responde a tratamientos y la queratoplastia no es viable, es el reemplazo del tejido dañado por un implante corneal artificial (queratoprótesis). Estas técnicas quirúrgicas son complejas, requieren más de una intervención separadas por 2-4 meses (Salmon, 2020). En su diseño requiere de un tejido autólogo, distinguiéndose dos tipos, el primero llamado osteo-odonto-

queratoprótesis (OOKP) y el segundo osteo-queratoprótesis tibial (OKP tibial) (Charoenrook de la Fuente, 2015). La OOKP requiere la extracción de un diente canino, junto a una porción discal del hueso alveolar del paciente. Al ojo que es intervenido, se le extraen los epitelios de conjuntiva bulbar y tarsal, además del corneal y se reemplaza con un injerto de mucosa bucal, con el fin de proporcionar un ambiente que de protección a la prótesis. La prótesis, está formada por un anillo osteo-dental en cuyo centro se cementa un disco óptico de polimetilmetacrilato (PMMA), ver Figura 11 panel izquierdo. Esta es dejada al interior de la órbita protegida por una bolsa subcutánea o submuscular por dos meses. Al paso de ese tiempo, se espera que la lámina se encuentre vascularizada y no reabsorbida para ser implantada en su posición final, lo que requiere que la mucosa sea perforada, y se retiren el iris, cristalino y vítreo anterior para finalizar con la sutura del implante sobre la córnea (Kaur, 2018). Comercialmente, las queratoprótesis más distribuidas son las Boston, de estas hay dos tipos, la recién mencionada es tipo II, utilizada cuando los pacientes presentan complicaciones palpebrales u otras alteraciones graves de la superficie ocular y, las de tipo I, diseñadas para ojos con buena salud palpebral y de la superficie ocular (Charoenrook de la Fuente, 2015). Estas últimas están diseñadas en titanio y PMMA, la Figura 11 panel derecho muestra las queratoprótesis Boston I y Boston II.

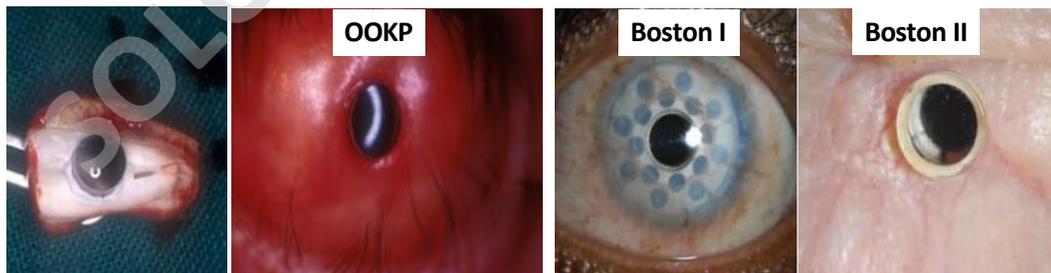


Figura 11. Fotografías de queratoprótesis. A la izquierda, una osteo odonto queratoprótesis, seguida de la misma insertada en un paciente. Le siguen las fotografías de las queratoprótesis Boston I y Boston II. Tomado de *Keratoprosthesis for corneal blindness: a review of contemporary devices*, de Avadhanam, Smith y Liu, *Clinical Ophthalmology*, 2015;9 697-720.

1.6. Ingeniería de tejidos y reemplazos estromales

La ingeniería de tejidos, definida como la ciencia del diseño y fabricación de nuevos tejidos para el restablecimiento funcional de órganos alterados, y la sustitución de estructuras dañadas por traumatismos o enfermedades (Langer & Vacanti, 1993), ha destinado esfuerzos en el desarrollo de materiales que permitan reemplazar el estroma corneal dañado, sin necesidad de recurrir a la ya mencionada queratoplastia (Matthyssen et al., 2018), que, tal como fue descrito, es el principal medio de rehabilitación visual de la ceguera corneal y, que lamentablemente, cuenta con un número de donación que no cubre el requerimiento total (Gupta et al., 2018). De este modo, varios grupos de investigación han centrado su trabajo en la creación de materiales que simulen el estroma corneal, imitando su microambiente, biomecánica, y promoviendo su biocompatibilidad con células corneales (Matthyssen et al., 2018). Los materiales desarrollados son variados, entre ellos hay hidrogeles (Fagerholm et al., 2014; Islam et al., 2016), esponjas (Crabb et al., 2006), películas (Bray et al., 2011; Crabb et al., 2006; Zhong et al., 2007) y mallas (S. L. Wilson et al., 2012), en donde, generalmente, se destaca la utilización de colágeno como compuesto base, ya que, el estroma corneal es básicamente una red tridimensional de colágeno y agua (hidrogel). Sin embargo, se han utilizado otros compuestos naturales y sintéticos que pueden aportar a la biocompatibilidad y propiedades mecánicas y ópticas, entre ellos se mencionan gelatinas (Lai, 2013; Mimura et al., 2008), córneas acelulares (Hashimoto et al., 2016; X. Y. Ma et al., 2015), escamas de pescado (Lin et al., 2010), seda (Bray et al., 2011) y sistemas celulares de autoensamble (Boulze Pankert et al., 2014; Couture et al., 2016).

En los párrafos siguientes, se incluyen algunas definiciones y reseñas consideradas importantes para el planteamiento del presente proyecto de investigación. Así, se destacarán algunas propuestas y resultados obtenidos en el desarrollo de materiales (andamios estructurales) destinados al reemplazo del estroma corneal, destacando, como el diseño modifica el

comportamiento y la viabilidad celular, una característica relevante en el desarrollo de un material avanzado que pueda ser utilizado como implante. De igual forma, se exponen otros resultados que hablan de diversas propiedades de estos materiales que involucran las cualidades ópticas, mecánicas, de estabilidad y biodegradabilidad, y las diferencias que se presentan según la fuente de origen del colágeno utilizado en los andamios.

Los materiales creados, cumplen la función de andamios, lo que en ingeniería de tejidos son construcciones con funciones físicas, químicas y biológicas específicas y complejas que interactúan con el entorno (Campo et al., 2019). En este punto, los hidrogeles, que son estructuras poliméricas tridimensionales, han demostrado junto a su capacidad de contener grandes volúmenes de agua, una buena biocompatibilidad, baja tensión interfacial y mínimas muestras de irritación por fricción mecánica (Barbucci, 2009). Estas redes poliméricas, son optimizables por medio de reticulación, un método que permite modificar parámetros tales como la porosidad, la cantidad de agua que puede incorporar y las propiedades ópticas, variando la concentración del agente reticulador (Y. Chen, 2019; Zhou et al., 2013). También es posible la agregación de otros compuestos que permiten la modificación de las propiedades mencionadas de matrices basadas en colágeno (Crabb & Hubel, 2008) que, como ya se mencionó, es el principal componente estructural del estroma corneal. La forma en que se trabajan o construyen los andamios, también tiene importancia, como lo describe Crabb et al. quienes observaron diferencias al construir andamios de colágeno modificando sus constituyentes (Crabb & Hubel, 2008). De igual forma, la técnica utilizada para la construcción de los andamios es relevante, entre ellas destaca la utilización de electrohilado, una técnica destinada a la síntesis de fibras o nanofibras por medio de la electrodeposición del material polimérico, donde se aplica una diferencia de potencial entre la boca de la jeringa y el plato o rodillo, donde la fibra es atraída por fuerzas electroestáticas (Zagho & Elzatahry, 2016; Zhong et al., 2007).

El colágeno, siendo una proteína de tipo fibrilar, cuando es trabajado como hidrogel, presenta propiedades mecánicas que se pueden optimizar mediante reticulación. Al respecto, se han utilizado reticuladores tales como glutaraldehído (Doillon et al., 2003; Duan & Sheardown, 2006), EDC/NHS (Duan & Sheardown, 2006; Fagerholm et al., 2014), y glutarato de tetrasuccinimidil éter de polietilenglicol de pentaeritritol (TSG) (Kato et al., 2007). La reticulación de colágeno con glutaraldehído ha mostrado una mejora en el módulo de compresión, una reducción en la transparencia en concentraciones de 0,05% v/v de GA, reducción en la degradación y una disminución en el número de células estromales (Doillon et al., 2003). Cuando, el reticulador es la copla EDC/NHS se evidencia un aumento en el módulo de Young, transparencia y viabilidad celular, respecto del GA (Duan & Sheardown, 2006). Fagerholm et al. lograron demostrar el éxito de reticular un hidrogel de colágeno con EDC/NHS, al evaluar la regeneración corneal al cabo de 4 años de ser utilizado como injerto (Fagerholm et al., 2014). En tanto, el reticulador TSG, permitió la construcción de un hidrogel de colágeno utilizado en el cultivo de células corneales, donde se pudo observar una migración y diferenciación celular, pero sin real secreción de colágeno (Kato et al., 2007).

Otro tipo de material a base de colágeno son las esponjas, las cuales se describen como una red porosa de fibrillas de colágeno, y son utilizadas comúnmente como matriz de cultivo celular (Doillon et al., 1986). El proceso de preparación de estas permite regular la conformación, resistencia y porosidad, al modificar parámetros tales como el pH y la temperatura (Doillon et al., 1986). La presencia de poros permite a las células estromales cultivadas, penetrar la matriz con mayor facilidad cuando se compara a un hidrogel. Como resultado del cultivo celular, se ha establecido que presentan mayor transparencia, donde al ser tratados con proteoglicanos esta aumenta un 50%, y como respuesta a las pruebas de compresión, su módulo disminuye con la presencia de células estromales cuando son comparados con los hidrogeles (Orwin et al., 2003).

Materiales laminares también han sido preparados con colágeno, donde dado sus finos espesores presentan una alta transparencia. Al ser utilizadas como matriz de cultivo celular, Crabb et al. observaron menor penetración de células entre las láminas comparado al uso de esponjas. Similar observación se mostró cuando se evaluó el diámetro de las fibrillas de colágeno secretadas por los miofibroblastos cultivados. Los diámetros de las fibrillas de colágeno alcanzan unos 67 ± 47 nm entre las láminas. Cuando las láminas se moldearon con surcos (con el fin de evaluar cómo afecta la geometría de la lámina a la difusión celular), los diámetros aumentaron alcanzando los 73 ± 21 nm. Dichos valores, son superiores a los encontrados en cultivos realizados en esponjas, que en comparación poseen un diámetro de $47,5 \pm 17$ nm en igual periodo de tiempo (Crabb et al., 2006). Por otra parte, cuando la matriz laminar incorpora tropocolágeno soluble y colágeno insoluble entrecruzadas por glucosa, y mediada por irradiación UV, mejoran la transparencia y resistencia en comparación al reticulado deshidrotérmico (Crabb & Hubel, 2008). El reticulado deshidrotérmico corresponde a una técnica de reticulación física y estabilizadora del colágeno, por medio de la remoción de agua de las moléculas de colágeno al incrementar la temperatura (>90 °C) en vacío, promoviendo la formación de un reticulado por condensación promoviendo la esterificación o formación de amida (Haugh et al., 2009).

Otros tipos de andamios en base a colágeno son complementados con proteoglicanos y polisacáridos o polilípidos, siendo estos denominados “andamios de colágeno aumentados” (Matthyssen et al., 2018). Esto se realiza para mejorar la similitud a las propiedades mecánicas y biológicas con el estroma vivo. Un ejemplo de esto es la creación de un complejo de colágeno-quitosano-hialuronato de sodio, utilizado como sustrato de cultivo de células estromales de conejo (J. Chen et al., 2005). La biocompatibilidad de dicho complejo fue evaluada insertando un pequeño disco del material dentro del estroma corneal de conejos, manteniéndolo durante 5 meses, tiempo suficiente para evaluar la degradación del material. Los ojos de los conejos

presentaron respuestas inflamatorias y de neovascularización que desaparecieron con el tiempo. El material conformado por el complejo 20% colágeno, 10% quitosano, y 0,5% hialuronato de sodio, permitió la proliferación y formación de una monocapa de células a los 9 días de la siembra sobre el andamio. En este trabajo, los autores concluyen que el complejo es biocompatible y una opción viable para la creación de sustitutos corneales (J. Chen et al., 2005). También se ha evaluado la inclusión de condroitín sulfato en esponjas de colágeno, aportando a su transparencia y disminuyendo la contracción de la matriz (Orwin et al., 2003).

Otra forma de andamio que ha generado amplia aceptación, son aquellos creados por electrohilado. Un ejemplo de ello es el artículo publicado por Zhong et al. en donde desarrollaron una matriz fibrilar con esta técnica compuesta por colágeno, glucosaminoglicanos y condroitín sulfato que fueron reticulados con vapor de GA (para mantener la integridad de las fibras) por tres días, donde se formaron fibras con diámetros entre 100 y 600 nm con un diámetro promedio de 260 nm. La porosidad formada entre las fibras permitió el paso de nutrientes como glucosa y la migración celular, indicó el autor. La Figura 12 contiene las imágenes de microscopía SEM de sus nanofibras sin reticular (Figura 12A) y reticuladas con vapor de GA (Figura 12B). La degradación enzimática por colagenasa se comparó con y sin reticulación de vapor de GA, dando una menor razón de degradabilidad cuando el material se encuentra reticulado, hasta por un periodo de seis días desde el inicio de la degradación. En el caso de la proliferación celular, se informó que el mayor aumento celular se produjo entre los días 3 y 7 de incubación, posiblemente, relacionado a la alta razón entre superficie y volumen que potenciaría la adhesión y proliferación celular, la que es mayor en las muestras reticuladas (Zhong et al., 2007). Sin embargo, lograr un espaciado interfibrilar uniforme es una tarea compleja que limita la transparencia del material (Wu et al., 2013).

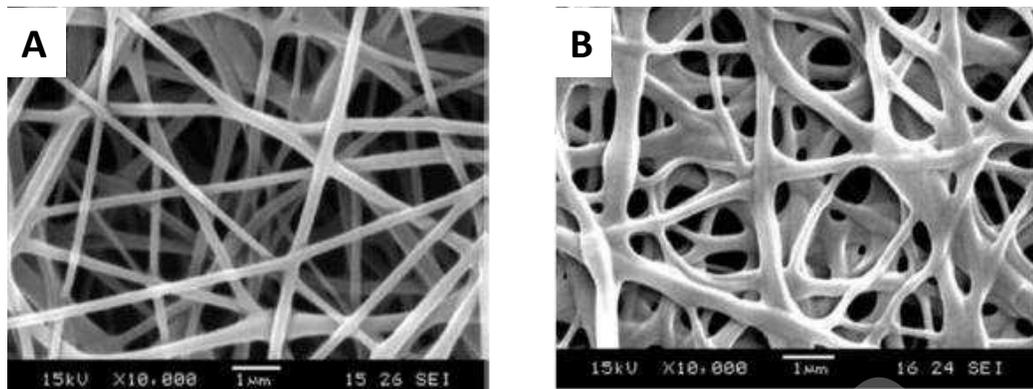


Figura 12. Microscopia SEM de nanofibras de colágeno. En A se observa la estructura formada por electrohilado de colágeno sin reticular y en B nanofibras de colágeno reticulada con vapor de glutaraldehído. Tomada de *Development of a novel collagen-GAG nanofibrous scaffold via electrospinning*, de Zhong et al, 2007;262–266.

La gelatina, siendo una forma de colágeno hidrolizado, también se ha utilizado ampliamente para la formación de hidrogeles. En el caso de hidrogeles reticulados con GA, Mimura et al. los utilizaron como sustrato de cultivo de fibroblastos y precursores de fibroblastos, que posteriormente fueron injertados en forma lamelar sobre las corneas de conejos, donde al finalizar, se encontró que las corneas estaban claras, sin mostrar edema, ni infiltración celular del estroma, así como tampoco se evidenció respuesta inmunológica, ni de biodegradación (Mimura et al., 2008). La gelatina, también ha sido reticulada con EDC/NHS y complementada con condroitín sulfato, lo que optimizó la citocompatibilidad, difusión de glucosa y contenido acuoso, cuando la relación molar del EDC/NHS es de 0,5 M, lo que permitió elevar el contenido de condroitín sulfato, promoviendo la actividad proliferativa (Lai, 2013).

Islam et al. crearon una matriz de hidrogel transparente y de baja biodegradación, basada en proteínas colágeno, en los denominados péptidos similares al colágeno autoensamblados (*peptides-like collagen*) y conjugadas con polietilenglicol-maleimida, la que fue utilizada como implante en corneas de cerdos, donde como resultado, después de doce meses, lograron observar la regeneración de nervios y células corneales, permitiendo restaurar características morfológicas similares a las corneas naturales. Los autores

sugieren que estas matrices cuentan con potencial de ser utilizadas como injertos corneales a futuro (Islam et al., 2016).

Otra forma de sistemas de regeneración utiliza corneas acelulares, que en estricto rigor son las proteínas de la matriz extracelular. En el caso corneal, hablamos de un estroma, al que, por medios físicos, químicos o biológicos se le extraen los componentes celulares. El grupo de Lee et al. alcanzó una reducción de queratocitos superior a un 80%, manteniendo la estructura de colágeno al aplicar tres métodos de descelularización en córneas de cerdo. Estas luego sirvieron como sustrato para cultivo de células del endotelio corneal, resultando en la formación de una monocapa celular en la superficie del material (W. Lee et al., 2014). Ma et al. probaron con un modelo formado por láminas de 20 μm (cada una) apiladas de estroma corneal de cerdo descelularizadas, a las que posteriormente se les realizó una siembra de queratocitos. Estas, fueron injertadas en corneas de conejo y luego de seis meses, evidenciaron transparencia, y propiedades mecánicas similares a las corneas normales junto a una distribución uniforme de los queratocitos, demostrando así, el potencial de este modelo en la regeneración estromal (X. Y. Ma et al., 2015).

Las escamas de pescado que son una fuente natural de colágeno han sido utilizadas para la creación de andamios previa descelularización y descalcificación por Lin et al., quienes probaron la citocompatibilidad sembrando células corneales de conejo, las que luego mostraron proliferación y migración en los primeros siete días de cultivo, ellos atribuyeron esto a la migración favorecida por la presencia de canales presentes (porosidad) en la estructura acelular (Lin et al., 2010).

La fibroína, principal componente del capullo del gusano de seda *Bombyx mori*, fue utilizada en la formación de membranas de 6,5 μm de espesor, permitiendo la proliferación de células epiteliales del limbo corneal, en un trabajo por el grupo de Bray et al. Ellos evaluaron la unión de células epiteliales, así como también, la morfología y distribución laminar o

estratificada que estas células epiteliales adoptaban sobre la fibroína, y las compararon con las propiedades de las membranas amnióticas (usadas como tratamiento en lesiones corneales). Si bien, el cultivo resultó exitoso sobre las membranas de seda, su viabilidad celular era 6 veces menor al encontrado en membranas amnióticas (Bray et al., 2011). En un estudio posterior, Bray et al. evaluaron células del limbo corneal humano sobre membranas dobles, porosas y lisas, donde se observó que las células en la membrana porosa se distribuían en una sola capa escamosa, mientras que, en la membrana lisa, adoptaron un patrón estratificado con formas cubicas, además, de una reducida transparencia, que limitaba su aplicación para la regeneración estromal (Bray et al., 2012).

Fagerholm et al, diseñaron por moldeo andamios con formas que imitaban corneas utilizando colágeno humano recombinante en su fabricación de sistemas acelulares. Estos andamios fueron implantados en pacientes con queratocono por medio de queratoplastia lamelar, obteniendo como resultado, regeneración del epitelio, estroma y de los nervios subepiteliales con mínimas reacciones adversas. Sin embargo, los pacientes tratados no presentaron mejoras significativas en la visión al cabo de 6 meses (Fagerholm et al., 2009). Posteriormente, a 2 años de realizada la cirugía, observaron que el material se encontraba bien integrado en las corneas y la visión continuaba siendo deficiente. También se observaron problemas de epitelización en las suturas, provocando superficies rugosas y reducida transparencia en al menos 8 de los 10 pacientes (Fagerholm et al., 2010). Al cabo de cuatro años de seguimiento, el material continuaba presentando una alta resistencia a la biodegradación. Al observar mediante microscopia confocal, se observó una distribución no homogénea de los queratocitos en el estroma, los que migran al material acelular (Fagerholm et al., 2014). Finalmente, probaron un sistema basado en colágeno humano recombinante (8%) y una red estructural de 2-metacrilolioxietilfosforilcolina (4%), en las pruebas realizadas al material se encontró que, en comparación a una cornea sana, contenía cantidades

superiores de agua (89% contra 78%), mayor transmisión de luz blanca (92% contra 87%) una temperatura de degradación menor (>50 °C contra 65.1 °C) y un índice de refracción menor (1.334 contra 1.373). Realizaron pruebas preclínicas en cerdos, donde confirmaron la eficacia y seguridad del implante al observar mediante microscopía electrónica de barrido a superficies de bloques en serie (*Serial block face scanning electron microscopy*) similares características estructurales del epitelio estrona entre corneas sanas y operadas. Por otro lado, el estudio clínico en humanos no fue muy prometedor, los implantes mostraron mejor recuperación en corneas con lesiones infecciosas y no así en las lesiones térmicas, químicas y degenerativas. En ellas, se observó mediante lampara de hendidura signos de opacidad, neovascularización y pterigión, además de presentar dolor, lagrimeo, enrojecimiento y fotofobia en los pacientes luego de la cirugía (relacionada a la desepitelización) (Islam et al., 2018).

Posiblemente, los andamios que utilizan el colágeno humano recombinante puedan resultar útiles como modelos de partida, pero, tienen un gran inconveniente en su aplicabilidad, debido a los altos costos, bajos rendimientos y sistemas de expresión complejos (Paredes-Puerto, 2016).

1.7. Costos

Otro punto importante de abordar es el costo que tienen las materias primas para la investigación y el desarrollo de biomateriales destinados a suplir la escasez de corneas donadas sumado al valor de los tratamientos quirúrgicos corneales mencionados en este trabajo.

En cuanto, los biomateriales utilizados en investigación de tratamientos para el remplazo corneal se encuentran el colágeno humano, cuyo costo se establece en 320 mil CLP por 1.0 mg, el colágeno de tendón bovino 167 mil CLP por 1.0 g (Merk, 2023), el colágeno humano recombinante alcanza el valor de 515 USD por 50 μ g (OriGene Technologies Inc., 2023) y 634 mil CLP por 20 μ g en genex.cl.

En el ámbito quirúrgico, en Chile con cobertura del Fondo Nacional de Salud (FONASA), establece los valores de referencia para cirugía refractiva (LASIK o PRK) en 968 mil CLP, el CXL 2.31 millones CLP, queratoplastía 449 mil CLP, queratoprótesis (sin incluir prótesis) 490 mil CLP (FONASA, 2023). Los precios en clínicas privadas son más elevados, siendo: 885 mil CLP para la queratectomía laminar, 1.48 millones CLP para la queratoplastía, 1.65 millones CLP la queratoprótesis (Clínica Alemana, 2023), 2.4 millones CLP la CXL, 1.88 millones LASIK, 1.25 millones CLP el trasplante corneal (Centro Oftalmológico Láser, 2018).

Lo anterior ha demostrado que la cantidad de dinero requerida para el desarrollo de materiales destinados a regeneración corneal es extremadamente elevada en las investigaciones de mayor desempeño. Afortunadamente, existe una serie de biomateriales de menor costo y reconocidos por su aplicabilidad en materia de regeneración tisular y son los que en este estudio se sugieren como precursores.

La gelatina, un derivado del colágeno (Spizzirri et al., 2012) utilizado en la ingeniería de tejidos con aplicación oftálmica (White & Rose, 2014), creación de andamios para cartílago (Maihemuti et al., 2023) y para promover el crecimiento celular en el estroma corneal (Lai, 2013) y su forma metacrilada para simular el estroma corneal (Kilic Bektas & Hasirci, 2018). El valor de gelatina de piel de cerdo es de 83 mil CLP por 100 g. El alginato, es un polisacárido estudiado como “*carrier*” de drogas oculares (Karmakar et al., 2022) así como también en el desarrollo de materiales para la regeneración corneal (Tarsitano et al., 2022; Tonsomboon et al., 2013). Su costo es de 88 mil CLP por 100 g (Merk, 2023). El quitosano es otro polisacárido con propiedades antibacteriales (Su et al., 2021) también utilizado en la ingeniería de tejidos con fines oculares (J. Chen et al., 2005; Ozcelik et al., 2013; Vijayaraghavan & Seyed, 2018). Su costo es de 123 mil CLP por 50 g. Finalmente la Poli-D-lisina es un componente útil para la adhesión celular mediante enlaces covalentes (Kim et al., 2011; Sitterley, 2008) y descrita como

una matriz extracelular que se aplica sobre superficies de plástico o vidrio mejorando la adhesión celular a esas superficies y cuyo valor alcanza los 133 mil CLP los 100 mL (Thermo Fisher Scientific Inc., 2023).

1.8. Definición del problema/Pregunta de investigación

La ceguera corneal es un problema mundial, cuya mejor opción de tratamiento es un trasplante corneal de un donante. Sin embargo, existe una baja disponibilidad de tejidos corneales. Lo anterior, puede ser suplido por medio de la creación de un material destinado a la recuperación funcional del tejido dañado. En la literatura hay evidencia de grandes avances en la creación de materiales destinados a la regeneración corneal, entre ellos, destaca la presencia del colágeno como principal componente y promotor de la regeneración tisular y el uso de andamios acelulares con menor rechazo por el huésped. Adicionalmente, la incorporación de otros componentes y el uso de reticuladores, permiten la optimización de las propiedades físicas, químicas y biológicas, las que regulan la forma o estructura tridimensional del material y, finalmente, determinan la viabilidad, diferenciación y migración celular. Dentro de los materiales más prometedores que se encuentran en estado de desarrollo (diseño, modelos *in vivo*, o en etapas clínicas) destacan por ser muy costosos, como consecuencia, el acceso a estos por parte de la población seguirá siendo limitada, haciendo a estos tratamientos poco viables. Es por lo anterior, que urge la necesidad de desarrollar materiales que sirvan como una real y accesible alternativa, para el tratamiento de alteraciones corneales que comprometen la visión.

A modo de síntesis de la investigación del estado del arte, se destacan los siguientes aspectos. La composición y la disposición tridimensional del diseño en los andamios, es un determinante en la respuesta migratoria de células que, finalmente, promueven el efecto de regeneración. Las estructuras que mejor permiten la difusión o migración celular son aquellas que presentan verdaderos “camino” en la matriz del material, ya sean, poros, estructuras trabeculares o los espacios interlaminares. Lo que refuerza la idea de que,

generar un material avanzado con características estructurales laminares, similares a la disposición y estructura del estroma corneal, podría favorecer la migración celular. La probada estrategia de incorporar proteoglicanos y polisacáridos que beneficia la biocompatibilidad del material y disminuye el rechazo, deja la puerta abierta para evaluar su incorporación de estos compuestos en el desarrollo de nuevos materiales avanzados. Si bien, hay reportes de resultados aceptables *in vivo*, destaca en este ámbito, el uso de corneas acelulares, que se presenta como un gran avance, pero, requiere de otras corneas donantes para ser viable. En cuanto a la transparencia, los patrones fibrilares (electrohilado y seda) son los que presentan resultados menos prometedores, sin embargo, esta deficiencia podría suplirse, si la técnica permitiera la elaboración de paquetes fibrilares equidistantes entre sí, cualidad presente en los estromas corneales y no en los andamios previamente mencionados. Las escamas de pescado son una opción para tomar en consideración en estudios posteriores, ya que, su limitada investigación en el desarrollo de andamios corneales presenta un nicho del cual obtener materia prima de bajo costo para la creación de nuevas propuestas regenerativas. Por último, es importante mencionar que los avances en el desarrollo de implantes corneales que incluyen el uso de andamios acelulares, basados en colágeno humano recombinante, muestran resultados prometedores respecto a propiedades ópticas y de biocompatibilidad en estudios clínicos en pacientes humanos. La aplicabilidad de este método de remplazo estromal tiene su limitación en los elevados costos, bajos rendimientos y los complejos sistemas de expresión.

Por lo anterior, es que en este proyecto planteamos el desarrollo de un material basado en gelatina y biomoléculas de bajo costo como el alginato, quitosano y Poli-D-lisina, buscando la sinergia que permita favorecer las propiedades fisicoquímicas y citocompatibilidad.

Este proyecto descriptivo, tuvo un fuerte componente experimental en diseño y preparación de biomateriales, caracterizaciones fisicoquímicas y estudios *in vitro*.

Con el material desarrollado, esperamos que las personas que han visto mermada su calidad de vida producto de alteraciones corneales que reducen su visión, tengan acceso a un tratamiento alternativo al trasplante corneal. Aportando de esta forma a reducir el impacto negativo a nivel económico y social de la ceguera.

Es por ello, que en la presente investigación se planteó la siguiente pregunta: El desarrollo de un sistema laminar, inspirado en la bioarquitectura corneal creado por formulaciones a base de gelatina, alginato, quitosano y Poli-D-lisina ¿podría imitar las características corneales?

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

II. HIPÓTESIS

A partir de biomoléculas de bajo costo, como gelatina, alginato, quitosano y Poli-D-lisina, es posible desarrollar sistemas laminares que imitan propiedades fisicoquímicas corneales. Se anticipa que, mediante la evaluación de formulaciones, se lograrán biomateriales con una bioarquitectura similar a la corneal. La valoración de propiedades fisicoquímicas, estabilidad y citocompatibilidad establece una base para su aplicación en ingeniería de tejidos.

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

III. OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar un sistema laminar, inspirado en la bioarquitectura corneal creado a partir de formulaciones a base de gelatina, alginato, quitosano y Poli-D-lisina y, a través de la caracterización de propiedades fisicoquímicas y biológicas, evaluar su similitud con características corneales humanas.

Objetivos Específicos

1. Formular la matriz del o los hidrogeles candidatos considerando la relación de sus componentes, entrecruzamiento y la absorción de agua.
2. Evaluar propiedades fisicoquímicas (térmicas, moleculares y ópticas), estabilidad (pH y temperatura), degradación (hidrolítica y enzimática) y citocompatibilidad de las matrices candidatas.
3. Desarrollar el biomaterial trilaminar uniendo las matrices candidatas con un adhesivo a base de las mismas formulaciones y evaluar propiedades fisicoquímicas.

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiales

Recursos adquiridos de Arquimed: ácido acético glacial 90% y densidad 1.06 gr/mL; de Hes: ácido clorhídrico; de Winkler: hidróxido de sodio; de Gibco Thermofisher: Poli-D-lisina 0.1 mg/mL; de Sigma-Aldrich: tabletas de solución salina tamponada en fosfato (PBS), tampón MES con bajo contenido de humedad $\geq 99\%$, tampón tris(hidroximetil)aminometano (Tris), gelatina de piel de cerdo tipo A, quitosano de peso molecular medio, sal sódica de ácido algínico, Glutaraldehído grado II 25%, (-)-Riboflavina adecuada para cultivo celular $\geq 98\%$, clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida 98% (NHS), cloroformo ACS; de Mouser Electronics: diodos emisores de luz (Led) UV de 365 y 440 nm.

Recursos informáticos: *Suite Ms. Office 360* licencia educativa; almacenamiento imágenes, archivos y datos en servidor OneDrive y Google drive de la Universidad Mayor; procesado y gráfico de datos con software OriginPro 9, el análisis estadístico de varianza ANOVA se realizó con el software GraphPad Prism 9, proceso de imágenes con el software Gimp 2.10.34 e ImageJ, el diseño de estructuras moleculares, su protonación y solubilidad fue realizado con el software MarvinSketch v23.5 y finalmente se utilizó la plataforma Tinkercad.com para diseñar objetos 3D.

Otros instrumentos de laboratorio utilizados: Fuente de poder regulable Pro'skit Te-5305B; placa calefactora con agitador magnético y control automático de la temperatura MS-H280-Pro; medidor de pH AD1030 Adwa Adwainstrument; micropipetas p1000; papel filtro; balanza analítica Radwag AS220/C/2; ultrapurificador de agua Adrona B30 Trace; Vortex Velp Scientifica Zx3. Material de vidrio (vasos de precipitados, embudos, buretas, placas de Petri, pipetas); tubos Falcón; tubos Eppendorf; guantes de nitrilo, mascarillas tipo N-95 y gafas de protección; filamento de ácido poliláctico para impresión 3D; una impresora 3D Ender 3 (Creality3D); una CNC laser de elaboración propia; sacabocados.

2. Equipos y procedimientos

Se realizaron análisis por Espectrofotometría de Infrarrojos y Transformada de Fourier (FT-IR) con Reflectancia Total Atenuada (ATR) del equipo *Spectrum two* (Perkin Elmer) con 64 barridos entre 4000 cm^{-1} a 450 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} . Las transmitancias y absorbancias UV-vis fueron obtenidas con un equipo *Spectroquant Prove 3000* (Merck) en el rango de 190 nm a 900 nm con pasos de 1 nm con agua destilada como blanco en una cubeta de cuarzo de 10 mm de camino óptico. El índice de refracción se midió con el refractómetro de líquidos *Soonda Refractometer* (Guangdong, China); Estufa de vacío *BioBase B0V-50V* para el secado de las láminas de hidrogel; Para observar la morfología estructural de los constructos en el microscopio electrónico de barrido con el equipo Phenom ProX (Thermo Fisher Scientific) se liofilizaron las muestras con el liofilizador BioBase BK-FD10P. Los cortes de las láminas se realizaron con un láser UV de 0.5 W integrado a un sistema de Control Numérico Computacional (CNC) de elaboración propia. Las microscopias se realizaron por campo claro y con el microscopio invertido DMI8 de Leica Microsystems. Fotografías algunos instrumentos utilizados se encuentran en el anexo (Figura A1).

3. Metodología experimental

Salvo que se indique lo contrario, los ensayos que se detallan a continuación fueron realizados por triplicado. Los valores obtenidos de ensayos cuantitativos se muestran como su media aritmética junto a su desviación estándar. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza ANOVA que nos permitió comparar las medias de nuestros resultados y significancia estadística.

3.1. Metodología para el primer objetivo específico

3.1.1 Preparación de disolventes

Para la solución ácida, se diluyeron 3.1 mL de ácido acético glacial por cada 100 mL de solución acuosa (0.5 M) y pH 2.2. La solución neutra fue preparada

disolviendo una tableta de PBS en 1 litro agua MilliQ (pH 7.3), Adicionalmente, a 100 mL de la solución neutra se agregó gota a gota ácido clorhídrico 0.1 M hasta un pH 6.0.

3.1.2 Preparación de disoluciones

Se agrego a 3 tubos Falcon de 15 mL 0.1 gr de gelatina (1.0% m/v). A uno de ellos se agregó 10 mL de la solución neutra (G) en otro igual volumen de la solución levemente acida (Gpbs) y la última, con 10 mL de la solución de ácido acético (Gaa). Se repitió el proceso para el quitosano (Q; Qpbs; Qaa) y el alginato (A; Apbs; Aaa). A los 9 tubos se les dejó en baño María por 24 h a 40°C. También se les agitó en vortex a su máxima potencia por 1 minuto y se evaluó su transparencia y aspecto.

3.1.3 Pertinencia de mezclas

Para complementar las observaciones cualitativas, se calentaron a 40 °C las disoluciones del punto anterior y agregaron los volúmenes indicados en la tabla 2 a tubos Eppendorf de 1.5 mL, mezcladas en vortex y dejadas a baño Maria por 24 h. Se etiquetaron con letra "A" seguida de un número a las mezclas de ácido acético y con una "P" las de PBS.

3.1.4 Reticulado de formulaciones

La reticulación con glutaraldehído se realizó en viales de color ámbar a 40 °C en constante agitación. En ellos se preparan 20 mL de soluciones de quitosano en concentraciones 1.0%, 2.0% y 3.0% m/v a los que se agregó glutaraldehído en concentraciones 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% v/v. Se dejaron por 24 h a 40 °C y agitación constante. Finalmente se agregaron alícuotas por duplicado en placas de cultivo de 24 pocillos y secadas en estufa de vacío por al menos 24 h.

Para el caso de la riboflavina, las mezclas o disoluciones de quitosano fueron preparadas en viales transparentes dentro de a una cámara de irradiación de elaboración propia y con el uso de un agitador magnético. Estas se realizaron por 30 minutos de exposición a radiación con leds de 365 y 440 nm. Ambos

Tabla 2. Mezclas realizadas y volumen utilizado

Mezcla	Mililitros utilizados			Total
	Gaa	Qaa	Aaa	
A1	0.50	0.00	0.50	1.00
A2	0.50	0.50	0.00	1.00
A3	0.50	0.25	0.25	1.00
A4	0.60	0.20	0.20	1.00
A5	0.75	0.00	0.25	1.00
A6	0.75	0.25	0.00	1.00

leds alimentados como indica el proveedor a 16.0 V y 0.7 A. Las concentraciones evaluadas fueron 1.0%, 2.0% y 3.0% m/v para el quitosano y 0.2%, 0.3%, 0.4%, y 0.5% m/v de riboflavina. Las soluciones se dejaron con duplicado en placa de cultivo y secadas en estufa de vacío por al menos 24 h.

La reticulación con EDC/NHS se realizó entre gelatina y quitosano siguiendo el protocolo de Thermo Scientific con modificaciones (Thermo Scientific, 2023). Brevemente se agregaron 0.20 g de gelatina en 10 mL de buffer PBS y en otro 0.20 g de quitosano en 10 mL de buffer MES 0.1 M. En el primero se agregaron 80 mg de EDC y 120 mg de NHS. Se dejó agitando a temperatura ambiente (20 °C) por 15 minutos. Se agregaron 240 µL de 2-mercaptoetanol. Finalmente se agrega el contenido del segundo vial al primero y se dejó por 2 h en constante agitación. Finalmente, se dejó secando en moldes por 24 h en estufa de vacío.

3.1.5 Preparación de moldes, secado y laminado

Se utilizaron moldes cilíndricos de PLA creados por impresión 3D, cuyas dimensiones fueron de 30 y 32 mm para los diámetros internos y externos, respectivamente, con una altura de 7 mm. Los cilindros fueron adheridos en una lámina de policarbonato transparente o sobre placas de Petri con una solución (~10% m/v) de PLA en cloroformo, esta solución se utilizó también para crear una fina capa en el fondo que permite homogenizar (alisar) la

superficie del policarbonato o la placa Petri. A cada molde se agregó 3 mL de cada formulación. El laminado (secado) se realizó en el horno de vacío a 32 °C y 0.04 MPa.

3.1.6 Prueba de hinchamiento

Los hidrogeles tienen la característica de absorber grandes cantidades de agua y aumentar su volumen y masa. La máxima cantidad de agua que un hidrogel puede contener es calculada en función de su masa seca e hidratada como lo describe la siguiente ecuación:

$$\% \text{ agua} = \frac{(\text{masa hidratada} - \text{masa seca})}{\text{masa hidratada}} \times 100$$

Para determinar cada una de las masas secas se cortaron trozos de igual tamaño de cada lámina (5.0 x10.0 mm), los cuales fueron masados de forma individual y luego se sumergieron en agua y agitaron suavemente hasta observar su completa hidratación. Posteriormente, se sacaron del agua y con el uso de papel filtro, y sin presionar, se quitó el agua superficial y se masó rápidamente cada espécimen. Todos los datos fueron registrados y tabulados para la selección.

3.2. Metodología para el segundo objetivo específico

3.2.1. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

Se realizaron evaluaciones FTIR sobre los materiales secos. Se tomaron las láminas y se recortaron pequeños trozos que se evaluaron en el equipo. Se realizaron los blancos sobre aire y un total de 64 barridos para cada muestra con un rango de exploración entre 4000 cm⁻¹ a 450 cm⁻¹. Esta evaluación se realizó con el propósito de caracterizar los compuestos utilizados y el efecto de la reticulación.

3.2.2. Evaluación de transmitancia

Se utilizó el espectrofotómetro Spectroquant® Prove 300 en modo de transmitancia con un barrido de 190 nm a 900 nm con pasos de 1 nm. Para su realización, las láminas fueron lavadas con agua desionizada en tres

ocasiones, luego cortadas en tiras rectangulares de 5 mm x 15 mm que fueron adheridas a una de las paredes internas de las cubetas con agua desionizada. El blanco utilizado correspondió a una cubeta de cuarzo con agua desionizada.

3.2.3. Ensayos térmicos

3.2.3.1. Termogravimetría

Estos fueron realizados con el equipo STA 8000 (Perkin Elmer), configurado con un barrido de 20 °C por minuto desde 20 °C hasta los 500 °C. Los ensayos se realizaron sobre muestras hidratadas, secas y sobre las materias primas gelatina y quitosano secos.

3.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Estas pruebas se realizaron con el equipo Differential Scanning Calorimeter DSC 4000 (Perkin Elmer), configurado en tres partes. La primera corresponde a una ambientación de la muestra manteniendo la temperatura fija en 10 °C por un minuto. La segunda corresponde al barrido térmico desde los 10 °C a los 100 °C a una tasa de 1 °C por minuto. El último paso consistió en mantener la temperatura fija en 100 ° por un minuto.

3.2.4. Índice de refracción

La refractometría se realizó con el refractómetro de líquidos Soonda Refractometer. Las formulaciones se midieron en estado líquido. 2 mL de cada formulación se colocó en la sonda a temperatura ambiente, esto se realizó en triplicado y considerando al agua como patrón de calibración.

3.2.5. Ángulo de contacto

El ángulo de contacto se midió utilizando el equipo “Analizador de Perfil de Gota” KRÜSS. Se utilizaron gotas de 4.5 µL y el método elipse tangente de gota sessile. La toma del ángulo se realizó rápidamente, ya que el material comenzaba rápidamente a absorber la gota de agua y el ángulo cambiaba su valor.

3.2.6. Degradación

La duración de un biomaterial puede determinar su aplicabilidad, es por ello por lo que se realizaron ensayos de degradación hidrolítica utilizando soluciones tampón con tres valores de pH (MES pH 4.0, PBS pH 7.0 y Tris pH 10.0) y otra degradación enzimática con lisozima en una concentración de 55 unidades de actividad por μL . Estas pruebas se realizaron en viales de 20 mL en cuyo interior se agregaron las soluciones tampón Tris, PBS, MES y la solución enzimática. Sobre cada una de ellas se colocaron discos de cada formulación y dejadas en baño María a 37 °C. Se registro la masa seca de cada espécimen cada 7 días por un mes.

3.2.7. Citocompatibilidad

La evaluación de citocompatibilidad fue realizada por medio de una colaboración con el Centro de biología Integrativa de la Universidad Mayor y a cargo de la Dra Macarena Arrázola y la asistente de investigación Concepción Panadero. Para su realización, se siguieron dos protocolos. El primero, consistió en cultivar fibroblastos embrionarios de ratón NIH/3T3 (ATCC, CRL-1658) sembrados en placas de cultivo, previamente lavadas con PBS 1x en tres ocasiones. Sobre la placa se agregó tripsina, una enzima proteolítica que permite desprender células adheridas a un sustrato de cultivo) se incubaron durante 5 minutos a 37 °C. Luego, se inactivó la acción de la tripsina con medio. Posteriormente, se centrifugaron las células por 5 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió en 1 mL de medio. De este mL se tomó una muestra y se contaron las células, de este modo, se logró ajustar la densidad celular para la siembra. Posteriormente, se sembraron 210 mil células sobre 3 láminas de hidrogel de cada formulación en una placa de cultivo. La placa se llevó a incubación a 37 °C con un 5% de CO₂. Se tomaron fotos a campo claro en intervalos de tiempo específicos (24h, 48h, y 72h) y se determinó porcentaje de área que recubren las células utilizando el software ImageJ. El segundo protocolo es el de fijación y consistió en fijar las células con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos. Se lavaron las células fijadas

tres veces con PBS 1x. Se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (un tinte que se une al ADN). Nuevamente se lavaron las células tres veces con PBS 1x después de la tinción. Se añadió PBS 1x tomaron fotos en el microscopio de fluorescencia (DMI8) y se analizó la viabilidad celular utilizando ImageJ.

3.3. Metodología para el tercer objetivo específico

Este consistió en apilar tres láminas en el interior de una formulación de hidrogel adhesivo como un “cemento” que une ladrillos. Se realizaron dos ensayos, en el primero las láminas se hidrataron en agua antes de unir las en el cemento y en la segunda, las láminas se sumergieron secas en el cemento y así se hidrataban con la misma formulación con la cual se adhirieron. La formulación probada como adhesivo fue basada en la formulación 10 pero, con el doble de concentración para cada constituyente, siendo gelatina 2.0% m/v, Poli-D-lisina 2.0% v/v y glutaraldehído 0.20% v/v.

En detalle: para la hidratación en agua se utilizaron 3 láminas secas de cada formulación. Ellas fueron hidratadas en agua durante 30 minutos. Posteriormente, se sacaron del agua secaron sus superficies con papel filtro sin presionar demasiado, para luego ser sumergidas en la solución de cemento en una placa de Petri, se retira el exceso de la solución cemento y luego llevadas a secado en estufa de vacío a 32 °C y 0.04 MPa por una noche. Para la hidratación en cemento las 3 láminas secas se introdujeron directamente en la solución adhesiva contenida en una placa de Petri.

Posterior a su secado, las estructuras trilaminares fueron rehidratadas en agua por 30 minutos, se recortaron discos de 5 mm de diámetro con un sacabocados y se congelaron a -60 °C por 24 h y liofilizaron posteriormente durante una noche. Se tomaron imágenes de las estructuras por microscopía de campo claro y microscopía SEM.

Finalmente se evaluó de forma complementaria la transmitancia UV-vis a tiras del material trilaminar de 5 mm x 15 mm; su paquimetría (espesor corneal) por medio de tomografía de coherencia óptica a los hidrogeles trilaminares sobre

moldes con forma de córneas. El tamaño los poros en μm^2 fue obtenido por la selección de 30 poros de una imagen SEM de cada formulación multilaminada utilizando el programa ImageJ. A continuación, se listan los pasos realizados para ello: La escala se ajustó por la herramienta “*Set Scale*” (Analyze=>Set Scale) para relacionar la distancia conocida de la barra de escala de cada imagen SEM y los pixeles que mide dicha barra. La herramienta “*Threshold*” (Image =>Adjust=>Thresholdnos) permitió destacar los poros. Finalmente, con la herramienta “*Polygon selections*” se crea un polígono con los bordes de cada poro. Con este polígono seleccionado, se ejecutó la instrucción “*Measure*”, la cual, nos entregó el valor de cada área. Luego de 30 mediciones el programa nos entregó el valor promedio y la desviación estándar al ejecutar la instrucción “*Sumarize*”.

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Resultados y discusión del primer objetivo específico

Producto de las primeras observaciones cualitativas, se constató la transparencia homogénea de las disoluciones de gelatina (G, Gpbs, Gaa). El quitosano solo se disolvió en ácido acético (Qaa); por su parte, el alginato fue relativamente soluble a pH neutro (A), reduciendo su transparencia. La Figura 13 tiene fotografías de los 9 tubos.

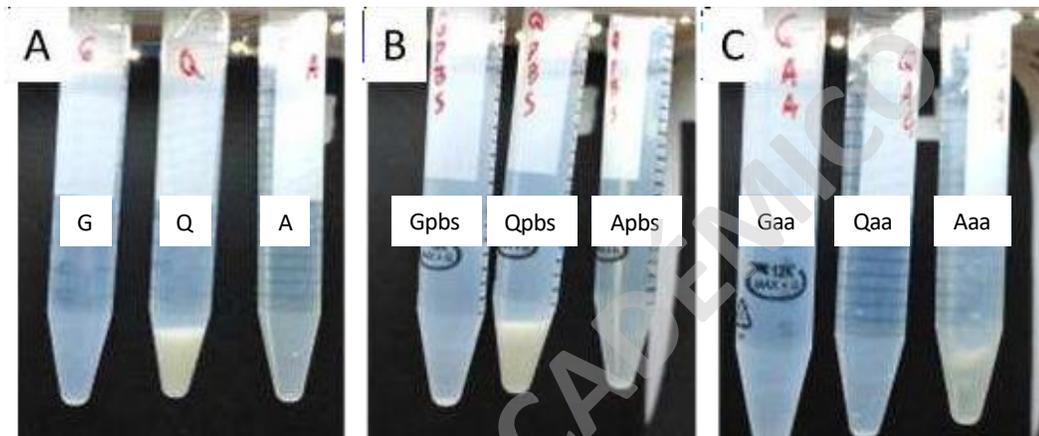
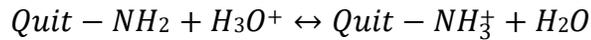


Figura 13. Fotografía de las disoluciones testeadas. Neutras en A; levemente ácidas en B; y en ácido acético en C. Elaboración propia.

Lo anterior, está acorde a lo indicado por Benjakul (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2019) que, sin especificar el rango y citando a la *Gelatin Manufacturers Institute of America* indica que su solubilidad es alta en un amplio rango de pH. Por su parte, el quitosano se solubiliza en ácidos, la evidencia de esto no es nueva, ya en el año 1999 Rinaudo et al. estudiaron la influencia del ácido acético en la solubilidad del quitosano, encontrando que era posible disolverlo en ácido acético en un rango de 0.5 M a 8 M e indicaron que la presencia del ácido o en agua promueve la formación de iones hidronio y formación de acetato en equilibrio (Rinaudo et al., 1999). A la vez, la amina del quitosano abstrae el protón del ion hidronio para protonarse. En esta condición de cation, el quitosano aumenta su solubilidad debido a las interacciones entre sus grupos de carga positivas y el agua cargada parcialmente negativa. La estructura química y estado de protonación y solubilidad del quitosano se encuentra en el Anexo 3



Otro factor determinante en la solubilidad del quitosano es su fracción acetilada. La desacetilación es un proceso químico que utiliza una solución alcalina para extraer los grupos acetyl de la quitina. La quitina está entre los polisacáridos más abundantes. Es un biopolímero de N-acetilglucosamina presente en caparazones de crustáceos, alas de insectos, conchas entre otros (Cohen, 2009). Cuando la quitina es desacetilada en más del 50%, se denomina quitosano (Hudson & Jenkins, 2001). Teniendo en cuenta el párrafo anterior, El quitosano requiere de una solución ácida para disolverse al protonar los grupos amino, la adición de grupos acetyl en los grupos amino (N-acetilación) del quitosano puede aumentar considerablemente su solubilidad en agua si alcanza el 50% de N-acetilación (Kurita et al., 1991). En nuestro caso, se utilizó un quitosano derivado de quitina con una desacetilación superior al 75% (Merk, 2023). Por lo que, el quitosano utilizado en nuestra investigación requirió de un solvente ácido como el ácido acético 0.5 M.

Acorde con las soluciones más transparentes y homogéneas, solamente se realizaron las mezclas con Gaa, Qaa, Apbs, Gpbs y Qpbs. En esta investigación, los tubos Eppendorf (Figura 14) que mostraron transparencia fueron solamente las mezclas de gelatina y quitosano en ácido acético. Las otras mostraron precipitación y turbidez. Acorde con estas observaciones, se continuó trabajando solo con mezclas de gelatina y quitosano en ácido acético.

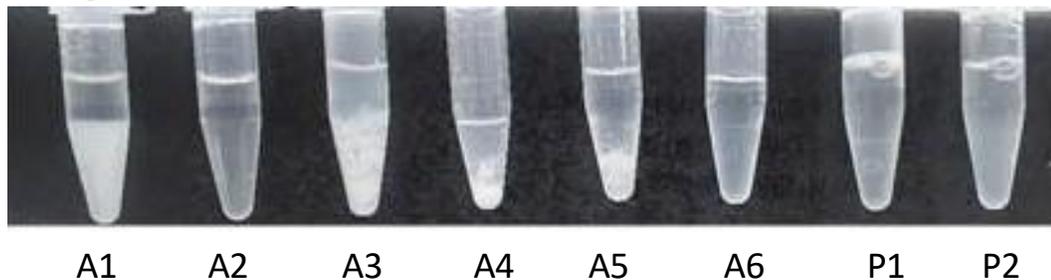


Figura 14. Fotografía de mezclas, prueba complementaria. Elaboración propia.

Por su parte, los ensayos de reticulación de quitosano utilizando glutaraldehído, se realizaron utilizando el proceso descrito por Farris et al. para la gelatina, pero, con modificaciones en las concentraciones utilizadas (Farris et al., 2010). La Figura 15 contiene una fotografía que captura la coloración que se obtuvo al reticular el quitosano con varias concentraciones de glutaraldehído.

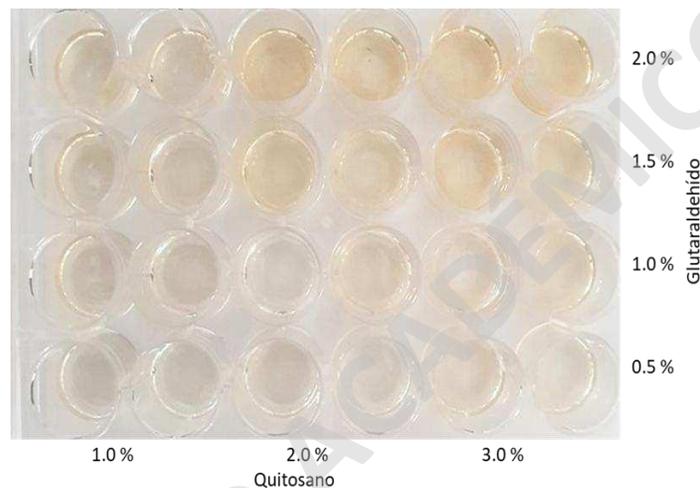


Figura 15. Fotografía de la reticulación de quitosano con glutaraldehído. En la placa de cultivo se han agregado distintas concentraciones de quitosano y glutaraldehído. Elaboración propia.

El incremento en la concentración de glutaraldehído también dio lugar a un aumento de la viscosidad en menos de una hora tras la adición de glutaraldehído. Estos hallazgos son consistentes con los publicados por Ou et al., quienes indicaron que la viscosidad incrementa durante los primeros 30 minutos después de añadir el glutaraldehído a las soluciones de quitosano y que dicho incremento es proporcional a la cantidad de glutaraldehído añadido (Ou & Bo, 2017). Esta elevación en la viscosidad puede ser atribuida al número de grupos amino disponibles para la reticulación, pues mientras más grupos amino interactúen con el glutaraldehído, mayor será la viscosidad resultante.

La reticulación con riboflavina se realizó acorde a los protocolos de CXL oftálmicos para formar enlaces covalentes entre moléculas de colágeno en el tratamiento del queratocono. En esos protocolos, no se supera el 0.10% de

riboflavina aplicada, y exposición a radiación UV de 370 nm y 5.4 J/cm² en 30 minutos (Galvis et al., 2017; Yung, 2020). Si bien, el mecanismo de reticulación por medio de la riboflavina no es conocido del todo, Rich et al. quienes, trabajaron en la fabricación de fibras y andamios de colágeno utilizando riboflavina como fotoiniciador de la reticulación fotoquímica, describen en su texto que hay dos posibles mecanismos de fotosensibilización que explicarían el efecto reticulador de la riboflavina: el mecanismo directo (tipo I), donde la riboflavina activada por la luz interactúa directamente con la molécula de colágeno por abstracción de hidrógeno de las aminas para estabilizar sus propios enlaces dobles de carbono, lo que permite la formación de enlaces covalentes intermoleculares en el colágeno; o el mecanismo indirecto (tipo II), donde las moléculas de oxígeno reactivas individuales forman peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radicales libres (por ejemplo, anión superóxido O²⁻) que, a su vez, oxidan la molécula de colágeno y, por lo tanto, permiten la formación de enlaces covalentes (Rich et al., 2014). Balasubramanian et al. dan soporte al fenómeno reticulador de la riboflavina explicando que el oxígeno singlete interactúa con las proteínas, y en específico en triptófano (Balasubramanian et al., 1990). Sin embargo, se indica que hay ciertos aminoácidos más vulnerables como la tirosina, histidina, cisteína y metionina a la reticulación con riboflavina. De los aminoácidos mencionados al menos 2 de ellos (metionina y tirosina) fueron hallados por Hafidz et al. en la composición 15 aminoácidos de la gelatina de piel de cerdo, que es la utilizada en nuestra investigación (Hafidz et al., 2011).

En nuestro trabajo, realizamos la fotosensibilización con diodos led de 365 nm. Este valor fue seleccionado a partir del espectro de absorbancia UV-vis de la riboflavina graficado en la Figura 16, donde se pueden observar 4 picos, uno en el espectro visible y tres en el UV. De ellos seleccionamos los de menor energía 364 nm y 446 nm para irradiar las muestras¹. Esta decisión, se tomó

¹ Nota del autor: En este trabajo solo se exponen los resultados obtenidos de la reticulación con led de 365 nm. El led de 440 nm sufrió desperfectos por lo que se prescindió su uso.

en base a los utilizados en la práctica clínica CXL de 370 nm y reducir los riesgos asociados a las radiaciones ionizantes de mayor energía. Pensando en una aplicación ocular es necesario saber que, la exposición a la radiación UV puede causar daño a retina, particularmente a fotorreceptores y epitelio pigmentario (Saßmannshausen & Ach, 2022).

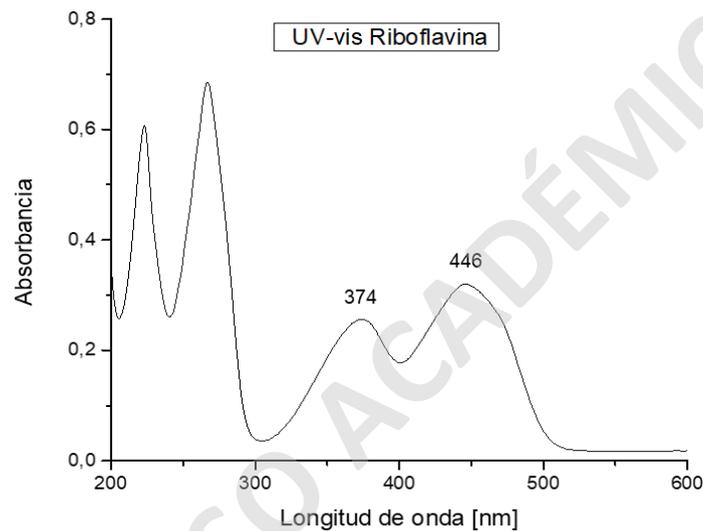


Figura 16. Espectrograma de absorbancia UV-vis de riboflavina. Elaboración propia.

La placa de cultivo de la Figura 17A muestra el efecto en la coloración luego del proceso realizado a distintas concentraciones de quitosano y riboflavina. En ella, es posible ver como el color de la riboflavina aumenta su intensidad junto al aumento de su concentración testada. Esto nos condujo a eliminar de las pruebas las concentraciones por sobre los 0.10% tal como fue descrito por Galvis et al para los tratamientos de CXL (Galvis et al., 2017).

Adicionalmente, se reticularon las mezclas A2 y A6 con glutaraldehído en concentraciones de 0.5%, 1.0%, 3.0% y 6.0% v/v. En ellas, el color amarillo también aumentaba con el incremento en la concentración de glutaraldehído (Figura 17B).

La coloración de las soluciones de glutaraldehído ha sido descrita previamente (Rasmussen & Albrechtsen, 1974) y se podría asociar a los cambios espectrales dependientes del tiempo y la temperatura (Matei et al., 2020). El glutaraldehído en solución acuosa tiende a polimerizar en diversas estructura (Waldron, 2004) de las cuales, es posible que alguna de ellas posea propiedades en su configuración electrónica, que le permita absorber la parte azul del espectro visible.

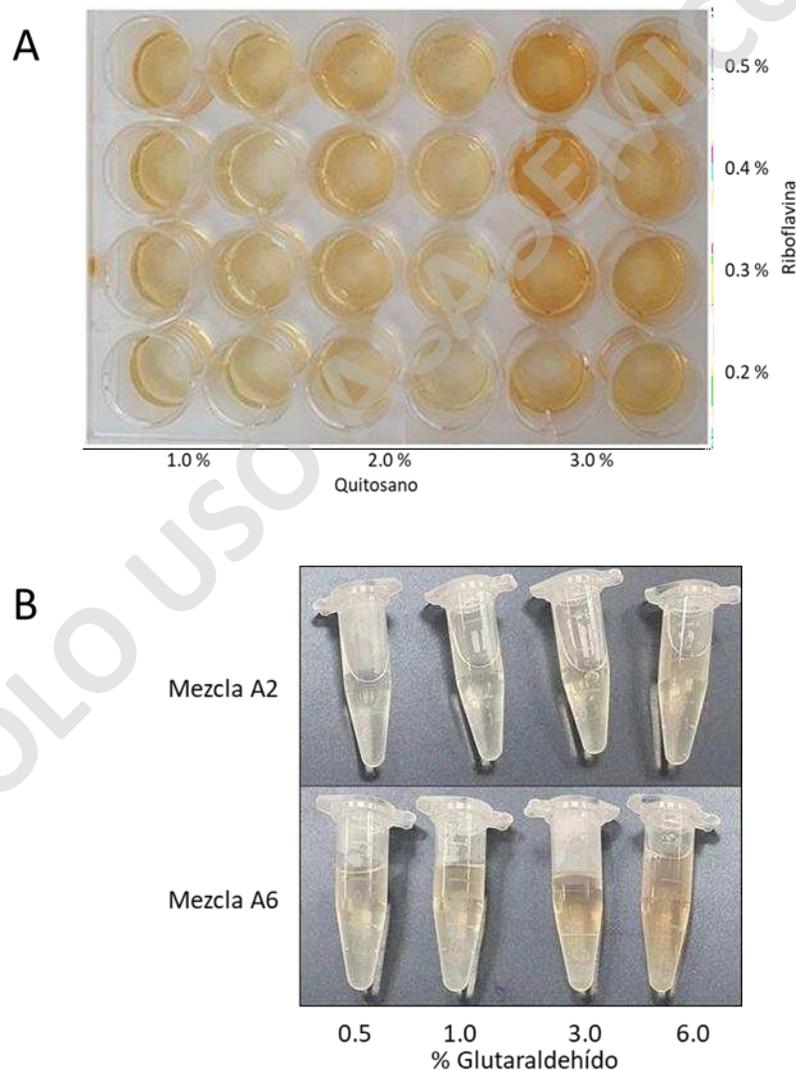


Figura 17. Fotografías de la coloración asociada a la reticulación. Quitosano con riboflavina en A y mezclas A2 y A6 con glutaraldehído en B. elaboración propia.

La reticulación con la copla EDC-NHS resulto en una serie de muestras sin aspecto de hidrogel y completamente opaco como se pueden ver en la Figura 18. Esto debido a la precipitación de sales presentes en PBS como NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄. Por ello, resulta importante la utilización de columnas de desalinización como sugiere el instructivo para NHS de Thermo Scientific (Thermo Scientific, 2023) y que, no fue considerado en este trabajo.



Figura 18. Fotografía de la reticulación de gelatina y quitosano con EDC-NHS. Elaboración propia.

En vista de las observaciones cualitativas a los resultados ya expuestos, se decidió por continuar el desarrollo de esta investigación con un total de 6 mezclas como base, utilizando gelatina (G), quitosano (Q) y Poli-D-lisina (P)². Ellas se reticularon con glutaraldehído (glut) en concentraciones de 0.02%, 0.05% y 0.10% v/v. También se realizó la reticulación con riboflavina (rib) en concentraciones de 0.02% y 0.04% m/v. La Tabla 3 reúne e identifica alfanuméricamente cada formulación con su composición (G, Q y P), y su concentración con 1 para 1.0% y 2 para 2.0%. Le sigue la identificación del reticulador (glut o rib) y sus concentraciones testeadas. A modo de ejemplo, la formulación 20 tiene 2.0% de gelatina, 1.0% de Poli-D-lisina reticulada con 0.02% de glutaraldehído (G2P1-glut002).

² Nota del autor: La Poli-D-lisina tardó en llegar al laboratorio por ello no fue mencionado en los ensayos previos.

Tabla 3. Conjunto de formulaciones testeadas.

Formulación	Mezcla	Formulación	Mezcla	Formulación	Mezcla
1	G1Q1	13	G2Q1	25	G1Q1P1
2	G1Q1-glut002	14	G2Q1-glut002	26	G1Q1P1-glut002
3	G1Q1-glut005	15	G2Q1-glut005	27	G1Q1P1-glut005
4	G1Q1-glut010	16	G2Q1-glut010	28	G1Q1P1-glut010
5	G1Q1-rib002	17	G2Q1-rib002	29	G1Q1P1-rib002
6	G1Q1-rib004	18	G2Q1-rib004	30	G1Q1P1-rib004
7	G1P1	19	G2P1	31	G2Q1P1
8	G1P1-glut002	20	G2P1-glut002	32	G2Q1P1-glut002
9	G1P1-glut005	21	G2P1-glut005	33	G2Q1P1-glut005
10	G1P1-glut010	22	G2P1-glut010	34	G2Q1P1-glut010
11	G1P1-rib002	23	G2P1-rib002	35	G2Q1P1-rib002
12	G1P1-rib004	24	G2P1-rib004	36	G2Q1P1-rib004

Con el propósito de obtener láminas comparables entre sí y facilitar su desprendimiento, se utilizaron moldes cilíndricos de PLA (como el molde blanco de la Figura 18) adheridos a las placas de Petri o de policarbonato con una fina capa de solución de PLA en cloroformo.

Para el conjunto de 36 formulaciones, se realizaron pruebas de hinchamiento en búsqueda de aquellos hidrogeles que posean una hidratación similar a la córnea. La Figura 19 muestra las gráficas del porcentaje de masa seca de las 36 formulaciones. En ellas se observó que las formulaciones 4 (35%), 10 (34%), 28 (32%) y 34 (29%) obtuvieron valores comparables a corneas humanas, cuya masa seca se encuentra entre un 22% y 34% (Adler et al., 2011).

Para esta investigación, la cantidad de agua que puede contener el hidrogel es importante para su transparencia. Naturalmente, los glicosoaminoglicanos estromales llevan agua pasivamente hacia la córnea, mientras que los mecanismos activos de las células del endotelio impulsan el fluido que lo contrarresta y preserva la hidratación estromal constante para mantener la transparencia óptica (Bonanno & Srinivas, 2010). El desbalance hídrico entre la córnea nativa y el biomaterial podría causar gradientes osmóticos, provocar edema y pérdida de transparencia por dicho desbalance (Costagliola et al., 2013).

Igualmente, como nuestro trabajo de investigación está enfocado al tratamiento quirúrgico de la opacidad corneal, no se debe pasar por alto que las cirugías pueden tener complicaciones. Entre ellas se encuentra el daño y pérdida de células endoteliales y consecuente la alteración de la hidratación estromal (Costagliola et al., 2013).

Adicionalmente, el agua intracorneal también influye en las propiedades mecánicas de la córnea. Cuando la córnea se encuentra deshidratada presenta mayor rigidez que hidratada (Seiler et al., 2018).

A su vez, las respuestas corneales a la presión o histéresis son útiles en el diagnóstico de algunas patologías. Por ejemplo, la alteración de la histéresis corneal puede conducir a un falso aumento de la presión intraocular, lo cual es, un signo considerado en el diagnóstico del glaucoma (K. B. Lee et al., 2016).

Finalmente. se cumple el primer objetivo que pretendía identificar las formulaciones de hidrogel que contienen agua en similar cantidad a la corneal. Siendo estas las número 4, 10, 28 y 34 las matrices candidatas a la construcción del material trilaminar.

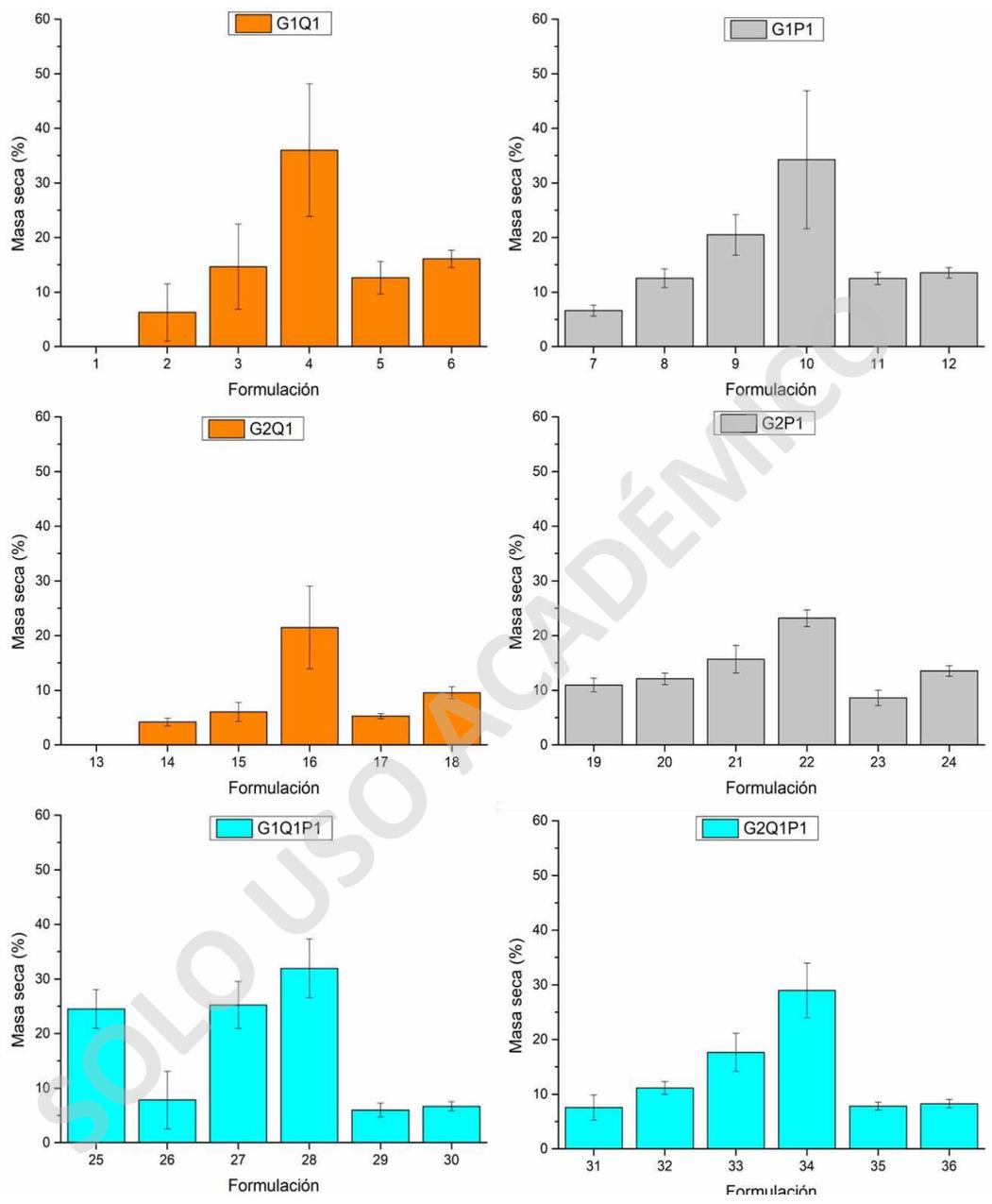


Figura 19. Graficas del porcentaje de masa seca de las formulaciones testeadas. Elaboración propia.

2. Resultados y discusión del segundo objetivo específico

2.1. La evaluación espectroscópica por infrarrojo (FTIR)

Se evaluaron gelatina, quitosano y Poli-D-lisina por separado en la Figura 20. Para los tres espectros se observaron principalmente los picos característicos de las aminas entre 1700 y 1600 cm^{-1} para el estiramiento N-H (amida I) y entre 1600 y 1500 cm^{-1} para la flexión N-H (amida II) por ser los grupos funcionales diana de la reticulación con glutaraldehído.

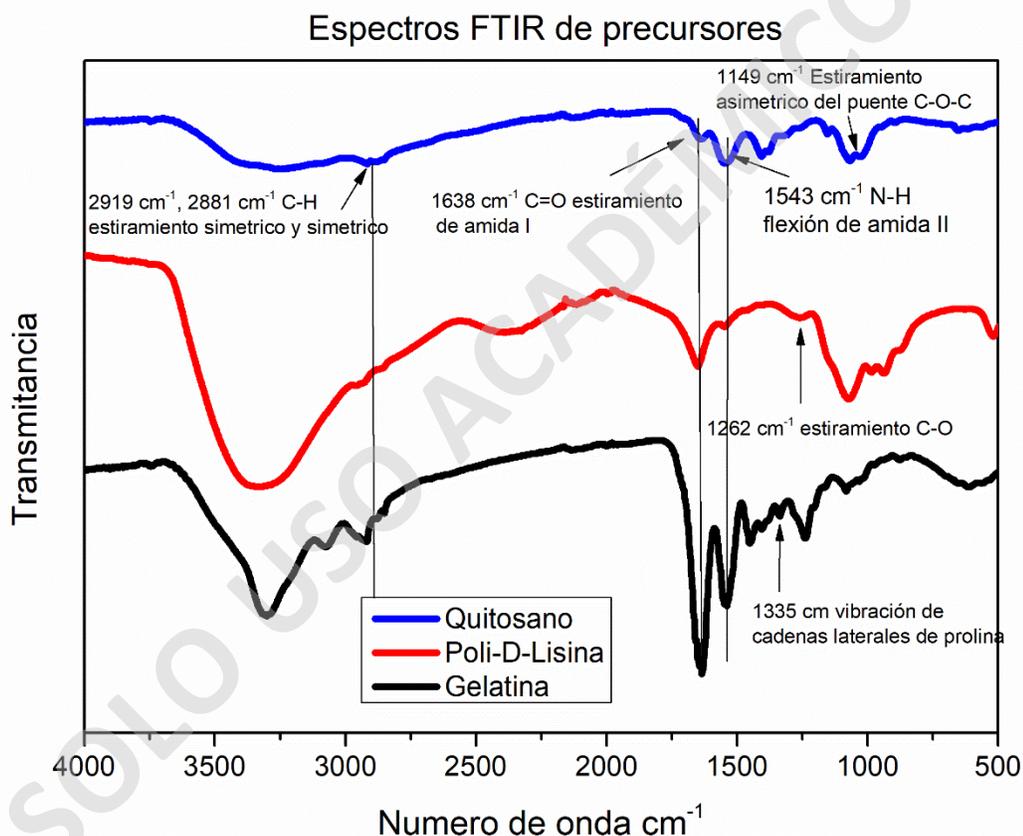


Figura 20. Espectrogramas de absorción FTIR de los precursores Poli-D-lisina, gelatina y quitosano. Elaboración propia.

En el espectro de la Poli-D-lisina se observa en 1546 cm^{-1} la tensión N-H. Entre 1600 y 1700 cm^{-1} hay una región donde se solapan las señales del estiramiento C=O de grupo carboxilo con la flexión N-H. Entre los 3350 y 3180 cm^{-1} es posible diferenciar un pico ancho con reducida intensidad en 3276 cm^{-1}

¹ asociado a la tensión N-H. Estas señales concuerdan con las reportadas por Merhie et al. (El Merhie et al., 2020).

Para la gelatina, las señales de las aminas fueron las más intensas de los tres espectros. Se observaron en 1638 y 1543 cm^{-1} los picos de las amidas I y amidas II respectivamente. Cebi et al. analizaron varios tipos de gelatina, donde notaron la presencia de las señales mencionadas (Cebi et al., 2016).

Para el espectro del quitosano las señales correspondientes a las amidas I y II se hallaron en 1645 y 1553 cm^{-1} . Otras señales que se logran identificar son 2918 cm^{-1} se corresponde a la vibración de C-H, 1150 y 893 cm^{-1} correspondientes a su estructura sacárida, 1060 cm^{-1} al estiramiento CO. Las señales mostradas en este espectro se corresponden con los hallados por Anicuta et al. (Anicuta et al., 2010). Los valores presentados, fueron corroborados también, por las tablas publicadas en el sitio web www.químicaorgánica.org (Fernández, 2022).

También se realizaron espectroscopías para evaluar la reticulación con glutaraldehído de las 4 formulaciones seleccionadas, mediante la búsqueda de la señal correspondiente a la formación de la imina (-C=N-) construida por la adición nucleofílica entre los aldehídos y las aminas de quitosano, Poli-D-lisina y gelatina (Carey & Robert, 2011).

La Figura 21 muestra los espectrogramas de las 4 formulaciones realizadas antes y después de usar glutaraldehído. En ellas los cambios son casi imperceptibles. Esto también fue observado por Farris et al. (Farris et al., 2010) quien, reticuló gelatina con glutaraldehído y en sus espectros observó la presencia de un pequeño hombro que relacionó al estiramiento de los grupos -OH cerca de 3500 cm^{-1} para gelatina sin reticular y que permanecía en sus gráficas reticuladas. Dichos autores, también reconocen la banda en 1630 cm^{-1} para amida I y asociada al estiramiento C=O presente en todas las gráficas (con y sin reticular) porque, los grupos carboxilos no se involucran en la reticulación química. Lo anterior, concuerda con las gráficas de la Figura 21.

Otra observación realizada por los autores es que, las bandas cercanas al 1540 de las amidas II presentaron muy pequeños desplazamientos (2 cm^{-1}) que relacionó con la reticulación al formar las bases de Schiff (Farris et al., 2010). Ishak et al. por su parte, observaron cambios en dos regiones al aumentar la concentración de glutaraldehído cuando reticuló quitosano. La primera de ellas se encontró entre 3800 y 3200 cm^{-1} y la segunda entre 1750 y 1300 cm^{-1} . En la primera indica una disminución de la intensidad de señal en 3431 cm^{-1} y para la segunda región de igual forma, asoció los cambios de intensidad en 1630 cm^{-1} con la reticulación de las proteínas y la formación de la imina -C=N- (Ishak et al., 2020).

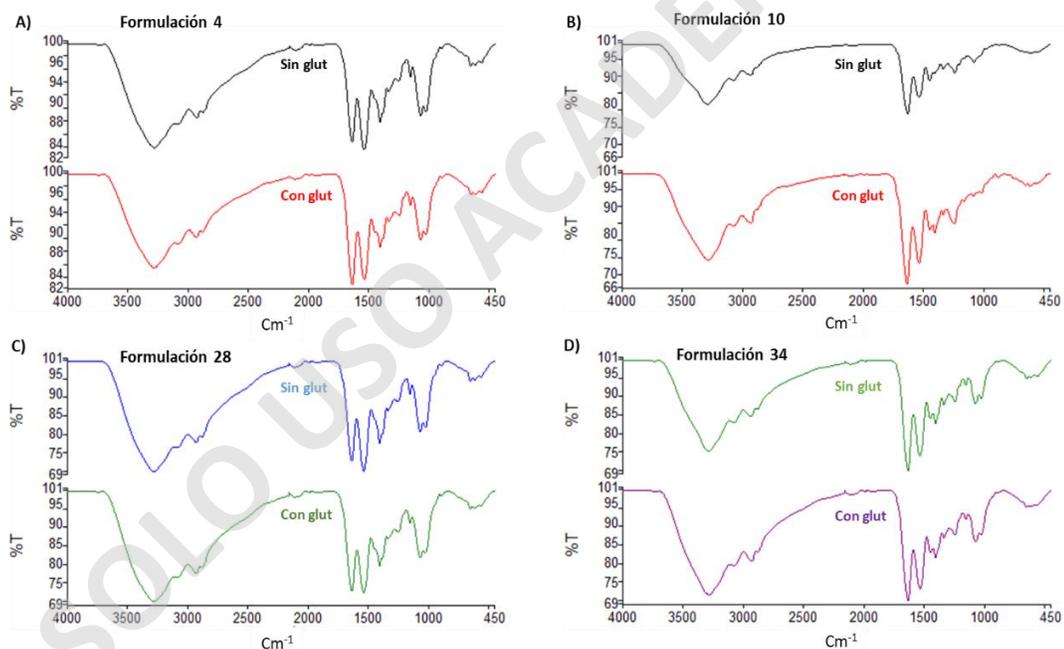


Figura 21. Espectrogramas FTIR de las formulaciones seleccionadas antes y después de reticular con glutaraldehído.

Para buscar mayor evidencia en los espectrogramas FTIR de la reticulación, se realizaron pruebas adicionales modificando la concentración de glutaraldehído como lo realizaron Ishak et al (Ishak et al., 2020). Así, se muestran en la Figura 22 los espectrogramas para las formulación G1P1 Glut(x.xx%), donde x.xx son las concentraciones 0.02%, 0.05% y 0.10% v/v

evaluadas. En el recuadro de la Figura 22 se puede ver la formación de un “hombro” a 1653 cm^{-1} cuando la concentración de glutaraldehído es del 0.10% asignado al estiramiento del doble enlace de la imina -C=N- (Heras-Mozos et al., 2023).

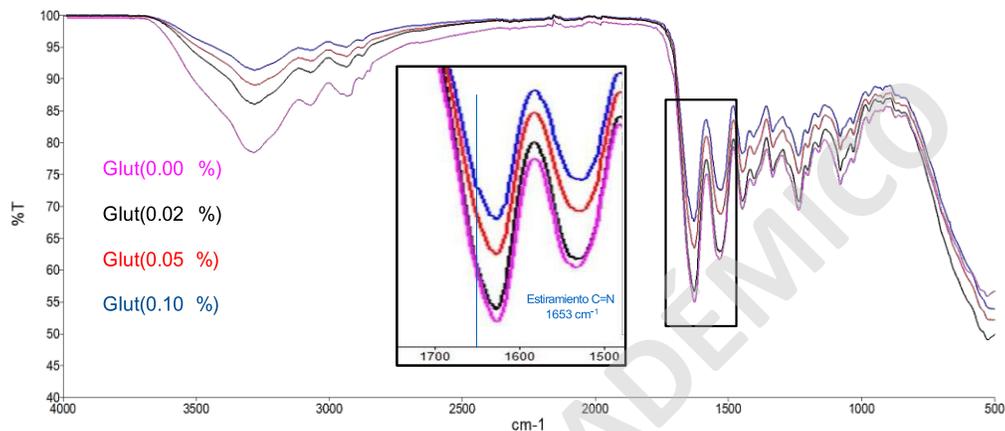


Figura 22. Espectrograma FTIR para varias concentraciones de glutaraldehído. Elaboración propia.

La formación de la imina mencionada previamente está gobernada por la formación de bases de Schiff (Carey & Robert, 2011; Farris et al., 2010; Waldron, 2004), esta es una reacción que comienza por un ataque nucleofílico de la amina sobre el carbonilo y la formación de un enlace covalente entre ellos. Esto continúa con dos transferencias de protones y la formación del ion iminio. La última parte de esta reacción es la deshidratación y deprotonación dando forma a la imina con su característico enlace doble -N=C- . El esquema de esta reacción se encuentra en la Figura del anexo A2.

2.2. Evaluación de transmitancia

La transparencia del tejido corneal es esencial para la visión, por ello la importancia de construir un material con esta propiedad y los espectrogramas UV-vis nos permiten evaluar dicha característica en un amplio espectro de las radiaciones electromagnéticas.

Las espectrofotometrías obtenidas se muestran en la Figura 23A junto con los obtenidos experimentalmente por Boettner & Wolter y los estimados por Peris-Martínez (Peris-Martínez et al, 2021) en la Figura 23B. En ellos, es fácil observar concordancias como, el rápido incremento de la transmitancia entre los 300 nm y 400 nm alcanzando el 70% de transmitancia a los 500 nm en las 4 formulaciones. Hay que reconocer que nuestras formulaciones pueden absorber gran parte de la radiación UV de forma similar a como es absorbida por el tejido corneal, es un gran hallazgo. La radiación UV puede causar daños

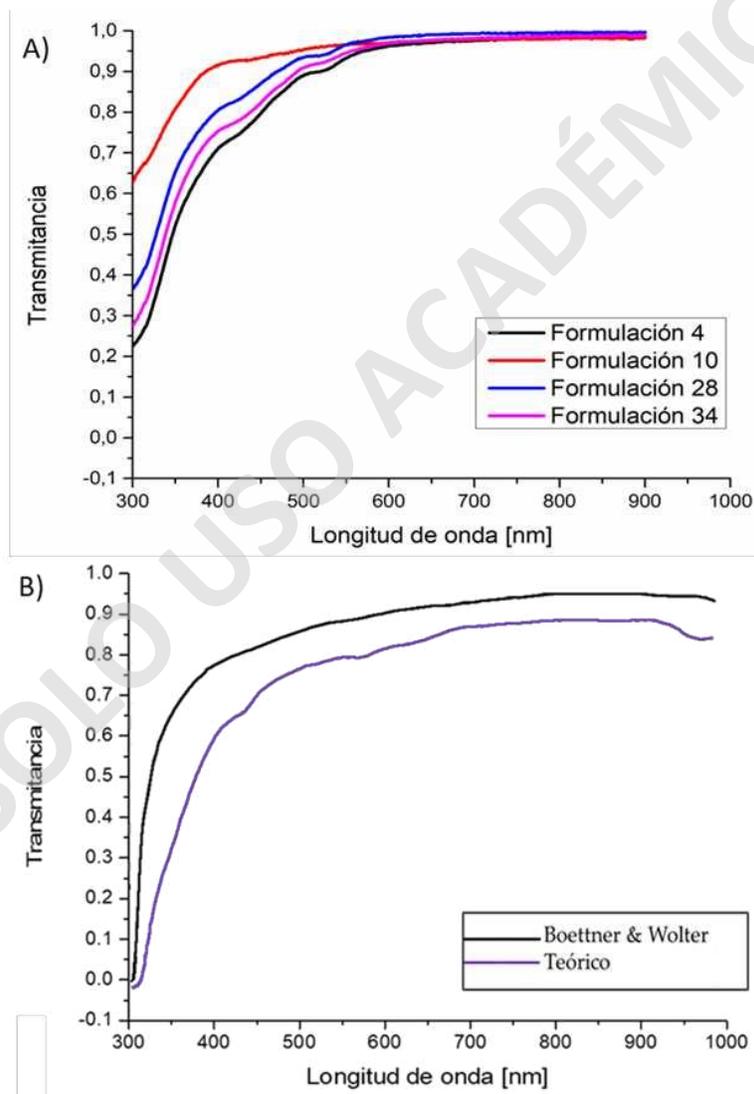


Figura 23. Espectrogramas de absorbancia UV-vis de formulaciones y córnea. En A las 4 formulaciones y en B el corneal. Elaboración propia y modificado de Spectral transmission of the human corneal layers de Peris-Martínez, *Journal of Clinical Medicine*, 2021;10,4490

en el cristalino y desarrollo de cataratas. En animales se demostró que altas dosis de irradiación UV pueden provocar cataratas (Hockwin et al., 1999). En particular, las células epiteliales del cristalino son las más afectadas y se ha descrito que la radiación UVB puede dañar su ADN alterar su síntesis de proteínas (Andley et al., 2011) y la retina es susceptible de una agresión fotoquímica por el aumento en la intensidad y en un pequeño punto, donde las radiaciones son concentradas por el sistema óptico y aumentan su densidad de potencia (Zuclich, 1989).

2.3. Ensayos térmicos

En el área de las ciencias de materiales, conocer las propiedades térmicas de un material, mediante termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido es fundamental porque, nos permiten estudiar cómo un material responde a cambios de temperatura como, por ejemplo, indicar procesos de descomposición térmica o desorción de agua, y conocer los cambios de fase que pueden experimentar los materiales a distintas temperaturas. Al respecto, no limitarnos a evaluar nuestros materiales a temperaturas cercanas a la fisiológica humana tiene ventajas, por ejemplo, conocer la estabilidad térmica fuera del rango de aplicación nos permite prever posibles cambios en el material durante su fabricación, almacenamiento y manipulación. En particular, hay que notar que los biomateriales a menudo son sometidos a procesos agresivos de esterilización que incluyen procedimientos a altas temperaturas y se debe garantizar su estabilidad en cualquier punto de su producción, almacenaje y aplicación.

2.3.1. Termogravimetría

Los ensayos se realizaron sobre muestras hidratadas (Figura 24A), secas (Figura 24B), sobre las materias primas gelatina y quitosano secas (Figura 24C) y utilizando una córnea humana (Figura 24D). En el termograma de la Figura 24A), se logra evidenciar una rápida pérdida de masa que ronda el 75% al llegar a los 100 °C, lo que es, concordante con el porcentaje de agua y materia seca en la selección de las formulaciones que bordeaba el 70%. Esto

concuerta con lo previamente publicado por Salles et al. quienes asociaron esta pérdida al agua separada del material (Salles et al., 2015). Acorde aumenta la temperatura, las pérdidas de masa para las formulaciones hidratadas resultan ser semejantes a las presentes en los termogramas de las formulaciones secas en B, donde las masas se reducen muy ligeramente entre los 100 °C y 250 °C. El termograma B muestra que, las formulaciones 4, 28 y 34 han perdido el 20% de su masa entre los 200 °C y 210 °C mientras que, la formulación 10 lo hace a los 236 °C. Estas son asociadas desprendimiento de los grupos laterales de las cadenas principales (Gutiérrez-Gutiérrez et al., 2015), para posteriormente, comenzar un proceso de descomposición muy similar entre todas ellas. En comparación a las curvas termogravimétricas de la Figura 24C, la diferencia entre las pendientes y la mayor resistencia a la degradación de las curvas en la Figura 24B son atribuibles a la acción reticuladora del glutaraldehído entre los componentes (Dash et al., 2013; Tian et al., 2016). Al observar las gráficas de las formulaciones secas y compararlas a la degradación térmica corneal (Figura 24D), nuestros hidrogeles presentan mayor resistencia a la degradación. Sin perjuicio de lo anterior, es importante notar que, las degradaciones térmicas comenzaron a temperaturas superiores a las que se expondrían nuestros hidrogeles si fueran utilizados como implantes corneales cercanas a los 37 °C.

La estabilidad térmica de los biomateriales no debe pasarse por alto, nuestras formulaciones como implantes vendrían a reemplazar la matriz extracelular del estroma corneal y acorde a He et al. la estabilidad de un material como la matriz extracelular, está relacionada con su funcionalidad y así con las células que se encuentran incrustadas en ella. Si la matriz extracelular se desnatura, por ejemplo, producto de cambios en la temperatura perdiendo su estructura y función, afectaría la funcionalidad celular (X. He, 2011). Por ello, es positivo ver que nuestras formulaciones tienen una resistencia a la degradación térmica comparable a la corneal.

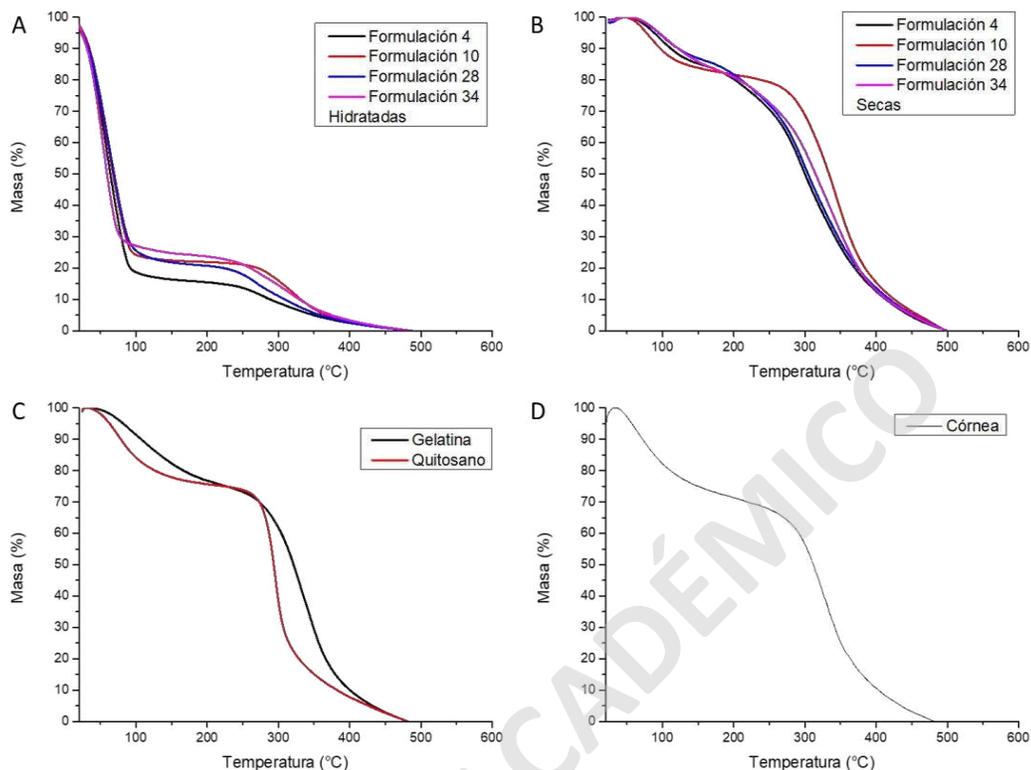
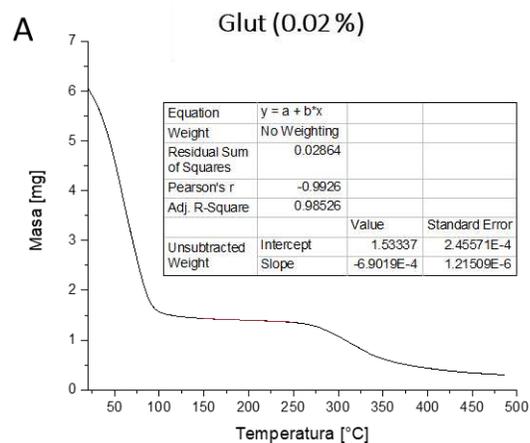


Figura 24. Termogravimetrías de formulaciones. Seleccionadas hidratadas en A; seleccionadas secas en B; de gelatina y quitosano en C; y de córnea humana en D. Elaboración propia.

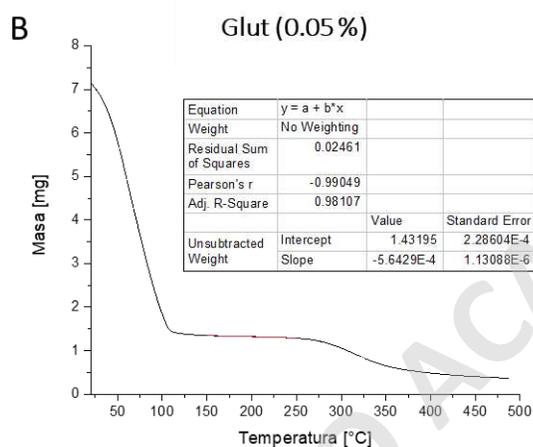
Las termogravimetrías evaluadas en un amplio rango de temperatura nos permitieron relacionar de manera indirecta el grado de reticulación con glutaraldehído y la resistencia a la degradación de los hidrogeles, así como también conocer y compararlas con las propiedades de las corneas humanas. La resistencia a la degradación térmica de un material suele estar relacionada con el número de enlaces covalentes entre sus grupos funcionales. En este contexto, Tian et al. demostraron que, a mayor número de grupos, capaces de formar enlaces covalentes con otros, mayor debiese ser la resistencia a su degradación. El autor, demostró que un hidrogel de colágeno reticulado con glutaraldehído tenía mayor resistencia a la degradación térmica (Tian et al., 2016). Esperaríamos entonces que la reticulación aumentará la resistencia a la degradación de los hidrogeles, reduciendo la pérdida de masa con el aumento de la temperatura. Esta hipótesis fue confirmada en nuestras pruebas

con tres mezclas de gelatina al 1.0% y poli-D-lisina al 1.0%, reticuladas con tres diferentes concentraciones de glutaraldehído: 0.02% (Figura 25A), 0.05% (Figura 25B), y 0.10% (Figura 25C). La pendiente, que representa la tasa de pérdida de masa, se obtuvo utilizando la herramienta “*linear fit*” del software OriginPro en el rango de 150 °C a 250 °C. Los resultados mostraron que los valores de la pendiente se redujeron a medida que aumentó la concentración de glutaraldehído, indicando una reducción en la tasa de pérdida de masa y validando así nuestra hipótesis.

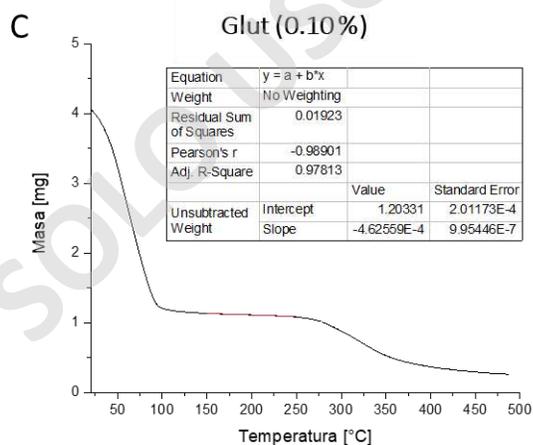
SOLO USO ACADÉMICO



	Value	S
Intercept	1.53337	
Slope	-6.9019E-4	



	Value	S
Intercept	1.43195	
Slope	-5.6429E-4	



	Value	S
Intercept	1.20331	
Slope	-4.62559E-4	

Figura 25. Termogravimetrías a distintas concentraciones de glutaraldehído. Mezcla de gelatina y Poli-D-lisina reticulados con glutaraldehído al 0.02% en A; 0.05% en B y 0.10% en C. Los recuadros rojos a la derecha de cada gráfica muestra las pendientes de degradación térmica. Elaboración propia.

2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

En este ensayo, se pretendió observar la respuesta de los hidrogeles a cambios térmicos en un rango de temperaturas cercanos al fisiológico humano (37 °C) para ello se realizaron las mediciones de calorimetría diferencial de barrido y así, verificar que nuestro material no presenta cambios asociados a transiciones térmicas en el rango de temperaturas de 15 °C a 60 °C. De existir dichas transiciones estas se observarían como picos en los termogramas. Los picos en un gráfico de DSC representan cambios en la capacidad calorífica en función de la temperatura (Chiriac et al., 2023).

Las muestras seleccionadas, no evidenciaron cambios en el rango térmico de interés como se puede apreciar en las gráficas de la Figura 26. En las gráficas se puede apreciar la estabilidad térmica de las muestras, reflejadas en líneas horizontales. Esto significa que, las muestras no están experimentando degradación térmica, descomposición u otros cambios importantes en su estructura molecular, lo que es de vital importancia para la integridad estructural ligada a la función visual como se mencionó previamente.

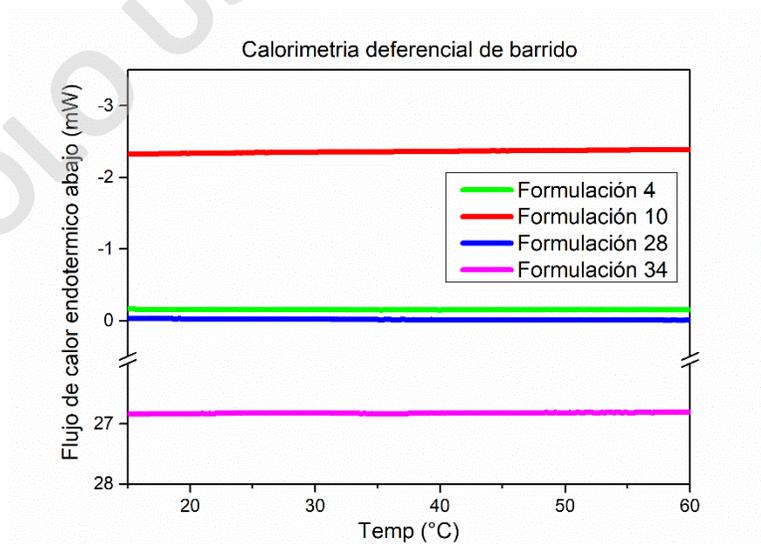


Figura 26. Calorimetría diferencial de barrido de formulaciones seleccionadas.

De este modo, y considerando los resultados de las termogravimetrías del apartado anterior, consideramos que las muestras cumplen con el criterio de mantener su estabilidad a temperatura fisiológica humana.

2.4. Índice de refracción

Como se espera que las formulaciones posean características similares a las corneales, medir su índice de refracción se considera importante, ya que este se relaciona con la refracción ocular. En la literatura oftalmológica estima que el índice de refracción corneal en 1.3375 (Adler et al., 2011; Myron Yanoff & Jay S. Duker, 2014), hallar valores cercanos a esta cifra permitiría la construcción de implantes ópticamente funcionales.

Los índices de refracción de nuestras formulaciones se encuentran en la Tabla 4. Entre ellos, el de menor valor corresponde a la formulación 10 (1.33610) y el mayor a la formulación 34 (1.33900), mientras que, para la córnea se han reportado varios valores como indica Patel et al. (Patel & Tutchenko, 2019), quien en una revisión publicó que el menor índice corresponde a 1.335 publicado por Chossat en el año 1818 y el mayor 1.4391 publicado por Engel en 1855. Sin embargo, en la publicación más reciente del año 2018, Tutchenko et al. (Tutchenko et al., 2018) lo estableció en 1.432 para el complejo formado por la córnea y la película lagrimal. Su valor se encuentra 0.10 unidades más elevado al encontrado en nuestras formulaciones. Pero, el valor reportado corresponde a un complejo de estructuras, mientras que nuestras formulaciones se midieron de forma individual. En este punto, es importante destacar que Patel et al. encontraron variaciones en el índice de refracción de la lágrima y de la córnea acorde a su profundidad y composición (Patel & Tutchenko, 2019), la lágrima es un fluido complejo compuesto por tres capas diferentes: capa de mucina, capa acuosa y capa lipídica. La capa mucínica en contacto directo con el epitelio es asociada al sistema inmune ocular, seguida de una capa acuosa con índice de 1.337 y suprayacente a esta, se encuentra la capa lipídica, con el mayor índice de refracción observado y que alcanza un valor de 1.482. Para la córnea hallaron que los valores varían desde el epitelio

con un índice de 1.400, pasando por la membrana de Bowman con 1.380, luego, un índice de 1.373 en el centro del estroma y finalmente a nivel del endotelio un índice de refracción de 1.373 (de Paiva et al., 2022; Patel & Tutchenko, 2019). Con nuestros resultados y los valores reportados en la bibliografía oftalmológica, podemos afirmar que nuestras formulaciones tienen índices de refracción comparables entre ellos. Sin embargo, solo se aproximan a los valores más bajos de índice de refracción para el estroma corneal reportados en la literatura. Debido a lo anterior, es imprescindible que, en el desarrollo de nuestro material, sea considerado el índice de refracción en la construcción del sistema óptico, pues, es sabido que la refracción no solo depende del índice de refracción, sino que también depende de la longitud de camino óptico y la geometría superficial del material (Montés-Micó, 2011).

Tabla 4. Índice de refracción de formulaciones, valores publicados para córnea y agua. Entre parentesis la desviación estandar.

Formulaciones	Índice de refracción (SD)
4	1.33759 (0.00029)
10	1.33610 (0.00133)
28	1.33751 (0.00070)
34	1.33900 (0.00065)
Córnea	1.335 -1.432
Agua	1.333

2.5. Ángulo de contacto

Como lo estableció Menzies et al. la interacción de un biomaterial con su entorno biológico requiere que se cumplan una serie de condiciones para su correcta implementación, entre ellas, la interacción con el entorno acuoso juega un rol importante (Menzies & Jones, 2010). Esta relación se conoce como humectabilidad y se mide por medio del ángulo de contacto. Acorde a

Zhao et al. el ángulo de contacto se define como el ángulo entre la tangente en el punto trifásico y la superficie sólida. Generalmente, los ángulos menores a 90° se considera hidrófila, mientras mayores a 90° se consideran hidrófobas (Zhao & Jiang, 2018). Pero, hay autores que consideran ese límite en 65° (Guo et al., 2008). Tiffany et al. midió el ángulo de contacto del epitelio corneal en córneas de conejos asumiendo que tendrían resultados similares a las corneas humanas. Comprobó que el ángulo de contacto cambia con el tiempo, reflejando la humectabilidad intrínseca de la superficie. Los valores hallados por Tiffany et al. de las córneas tienden a alcanzar los 60°. Nuestras mediciones (Tabla 5 y Figura 27) arrojaron valores superiores a 80°, denotando una tendencia hidrofóbica de nuestros materiales, al menos al comienzo. Luego de un momento, el ángulo comenzó a decrecer a medida que la gota de agua comenzaba a ser absorbida por el material.

Tabla 5. *Ángulo de contacto de las 4 formulaciones*

Formulaciones	Ángulo de contacto (SD)
4	82.3 (6.9)
10	85.7 (2.0)
28	92.1 (3.9)
34	97.8 (4.8)

Esto no es un mal resultado, considerando que el material desarrollado debe absorber y contener agua para mantener sus propiedades ópticas, como se mencionó previamente. Hay que considerar también que, en la superficie de nuestro material debiese crecer una población significativa de células epiteliales y sobre estas, una capa de mucina que aportara a la humectabilidad corneal (Tiffany, 2009; Yáñez-Soto et al., 2015).

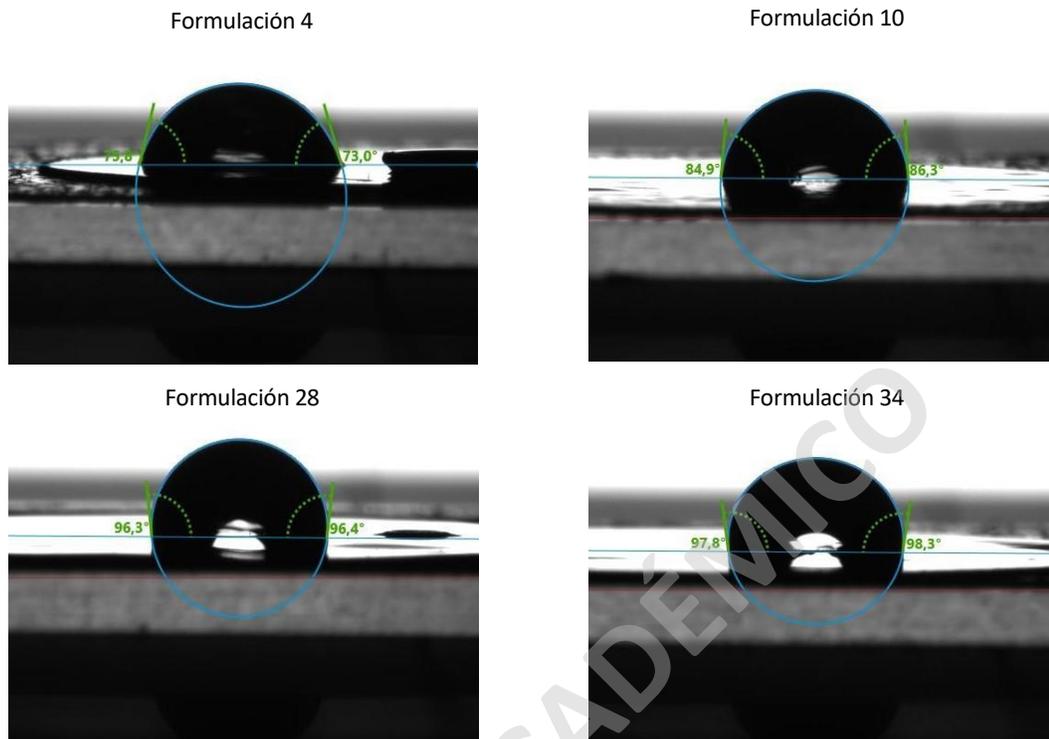


Figura 27. Fotografías del ángulo de contacto a formulaciones seleccionadas. Elaboración propia.

El ángulo de contacto y humectabilidad de las células epiteliales fue estudiado por Yáñez et al. *in vitro* con cultivos de células epiteliales inmortalizadas. Encontraron un alto valor de histéresis de ángulo de contacto en sus cultivos (la histéresis refiere a la diferencia entre los ángulos de contacto de avance y retracción para una gota sobre una superficie inclinada). A su vez, indicó que la misma histéresis dio cuenta de la heterogeneidad superficial de la expresión de mucina por parte de las células epiteliales y una distribución espacial con la diferenciación de dichas células (Yáñez-Soto et al., 2015) ya que, se asocia la humectabilidad corneal, principalmente a las células epiteliales, los valores de obtenidos en nuestros materiales no son comparables a los corneales reportados por ser medidos sobre el material y no sobre una población de células epiteliales. Sin perjuicio de lo anterior, al realizar un análisis estadístico entre las diferentes formulaciones, solamente se encontró una diferencia

significativa entre las formulaciones 4 y 34 con un valor de $p = 0.165$ como se puede observar en la gráfica de la Figura 28.

ángulo de contacto y significancia estadística

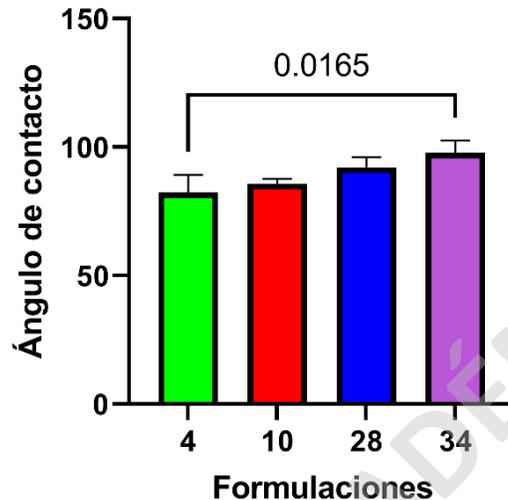


Figura 28. Gráfica de los ángulos de contacto con significancia estadística.

2.6. Ensayos de degradación

La degradación juega un papel crucial en el diseño de biomateriales destinados a la regeneración corneal. Idealmente, el biomaterial implantado debe degradarse a un ritmo que se ajuste a la regeneración del tejido corneal. Además, la velocidad de degradación tiene un impacto directo en la estabilidad dimensional de los hidrogeles: un material que se degrada rápidamente perderá su estabilidad dimensional de la misma forma (M. Li et al., 2023).

En nuestra investigación, se realizaron pruebas de degradación hidrolítica a las formulaciones seleccionadas utilizando soluciones con 3 valores de pH. Sus etiquetas MES, PBS y Tris están en función del buffer utilizado en la elaboración de cada solución, siendo MES la solución ácida (pH 4.0), PBS la solución neutra (pH 7.0) y Tris la solución alcalina (pH 10.0).

Al cabo de tres semanas todas las formulaciones perdieron masa como se puede observar en la gráfica de la Figura 29. En ella es posible advertir que la formulación 34 es la más degradada. Esto, posiblemente se deba a que en su elaboración se utiliza el doble de gelatina que en las otras formulaciones utilizando el mismo volumen de reticulador, de este modo, una buena parte de la gelatina no se encontraría reticulada y sus cadenas estarían expuestas a la acción disolvente e hidrolítica de medio.

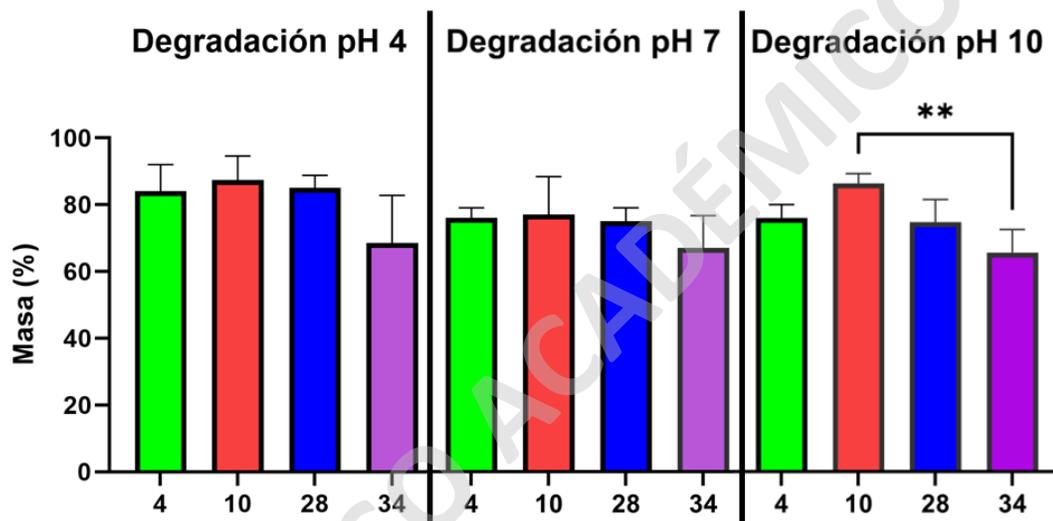


Figura 29. Gráfico de la degradación hidrolítica de las formulaciones. porcentaje de masa a las tres semanas de estar en solución ácida (MES), neutra (PBS) y alcalina (Tris).

La gelatina como se discutió previamente se disuelve en medios ácidos y básicos (Benjakul & Kittiphattanabawon, 2019), lo que podría explicar la mayor tasa de degradación observada en la formulación 34. Por otra parte, la formulación 10 es la menos afectada por la degradación. Posiblemente asociado también a su composición (gelatina y Poli-D-lisina) y la afinidad electrostática entre los grupos carboxilo (ácidos aspártico y glutámico) de la gelatina (Hafidz et al., 2011) que pueden llevar una carga negativa a pH neutro y alcalino. Mientras que la Poli-D-lisina es un polipéptido de lisina, tiene grupos amino que son básicos y por lo tanto pueden llevar una carga positiva a pH neutro y básico (Carey & Robert, 2011, pp. 1032–1033). Es importante notar que el estroma corneal tiene un pH neutro y variaciones en su pH provocan

alteraciones en su morfología y transparencia (Huang & Meek, 1999; Kostyuk et al., 2002), siendo así, las formulaciones 4, 10 y 28 tienen tasas de degradación similares a pH neutro conservando el 75% de su masa inicial a las 3 semanas, lo que nos permitiría trabajar con ellas a plazos mayores.

Al realizar el análisis estadístico entre las formulaciones, solo se observaron diferencias significativas entre las formulaciones 10 que presentó la mayor resistencia a la degradación en las tres disoluciones y 34 a pH alcalino.

Otro parámetro importante en la degradación de los biomateriales es su resistencia a la acción enzimática. En nuestro caso, un implante corneal se encontraría expuesto a la acción de las colagenasas y las lisozimas. Las colagenasas son enzimas que descomponen el colágeno en sus enlaces peptídicos y están relacionadas con las lesiones tisulares (Asociación Argentina de Dermatología. & Cevallos, 2015) y las lisozimas presentes en la lágrima y responsables de la degradación de la pared de algunas bacterias al romper sus enlaces glucosídicos (Rennie & Parsons, 1981; Tanaka et al., 2021) y también de la degradación del quitosano (Lončarević et al., 2017).

Romo et al. comparó la degradación por colagenasa sobre películas de gelatina reticulada y sobre películas de colágeno, demostraron que la gelatina presenta mayor resistencia a la acción de la enzima colagenasa manteniendo porcentajes de masa cercanos al 80% a las 24 h, que el autor asoció al grado de reticulación con lactosa (Romo-Valera et al., 2021).

En nuestra investigación, solo se evaluó la degradación con lisozima. Este resultado ser muy agresiva con las formulaciones que contenían quitosano impidiendo su manipulación en menos de 14 días en muchos de los casos. La gráfica de la Figura 30 muestra el promedio de masas recuperadas al cabo de 2 semanas en solución enzimática.

Degradación Enzimática a 14 días

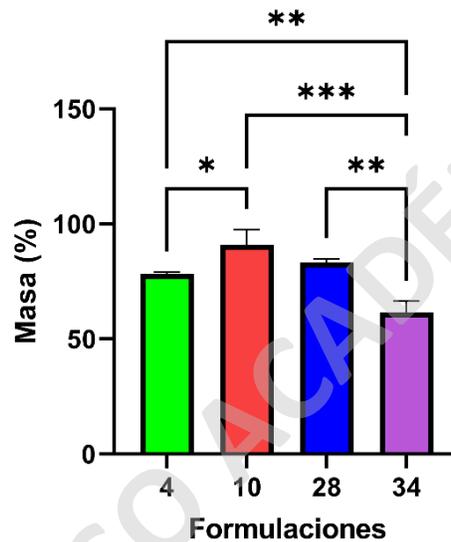


Figura 30. Gráfica de la degradación enzimática. Porcentaje de masa al cabo de 14 días para las 4 formulaciones desarrolladas. Elaboración propia.

Acorde al párrafo anterior, la lisozima no tendría el potencial de participar en la degradación de la gelatina ni de la Poli-D-lisina. Esto explicaría que la formulación 10 compuesta solo por gelatina y Poli-D-lisina lograban conservar más masa que las otras tres formulaciones. Entre los valores obtenidos, solo los pares de formulaciones 4-28 y 10-28 no presentaron diferencias significativas a un valor de $p \leq 0.05$. La degradación de nuestras formulaciones presenta a su vez una diferencias significativas entre la formulación 34 y las otras tres con valores de p inferiores a 0.001.

En resumen, la formulación 34 es la que presenta mayores diferencias con las otras formulaciones, ya sea en la degradación hidrolítica en función del pH

(particularmente en pH alcalino) como en la degradación enzimática. Siendo la principal diferencia entre su composición poseer el doble de la cantidad de gelatina que el resto de las formulaciones. Siendo así, es posible que gran parte de la masa perdida corresponda a parte de la gelatina que no logro reticular e inmerso en las soluciones degradantes se desprendería con facilidad del constructo.

2.7. Citocompatibilidad

Cuando un material, sin importar su origen natural o sintético, está destinado a interactuar con sistemas biológicos se le denomina biomaterial (Biswas & Datta, 2021). Los biomateriales son diversos, siendo la piedra angular de la ingeniería de tejidos y medicina regenerativa por su potencial para imitar la matriz extracelular y promover la regeneración tisular acorde a sus diseños y propiedades químicas, físicas, mecánicas y biológicas, permitiendo su uso en la creación de tejidos biológicamente funcionales, utilizando andamios, células y factores bioactivos (Dharadhar & Majumdar, 2019) para la reparación y fijación ósea (Saraswathy et al., 2021), creación de dispositivos médicos (Festas et al., 2020) y para el tratamiento y reparación de heridas cutáneas (Wei et al., 2022), entre otros (X. B. Chen et al., 2023; Han et al., 2022). Entre las características con las que deben contar los biomateriales, se encuentra la citocompatibilidad. Este es un concepto particularmente importante en el contexto del crecimiento celular y la regeneración corneal (Romo-Valera et al., 2021). Es de esperar que un biomaterial candidato pueda interactuar con su entorno biológico sin provocar una respuesta inmune, proporcionar un microambiente tridimensional para contener células vivas y apoyar la diferenciación guiada, permitir la secreción de matriz extracelular y la regeneración tisular (Reis & Gilsonkhangg, 2019).

Evaluar la interacción entre nuestras formulaciones y un entorno biológico *in vitro* nos da información relativa su citocompatibilidad y una primera aproximación a su biocompatibilidad. Nosotros evaluamos nuestras 4 formulaciones seleccionadas de hidrogel utilizando fibroblastos. En la córnea,

los fibroblastos son un tipo celular diferenciado de los queratocitos del estroma y están implicados en la respuesta inmune, diferenciación y cicatrización de heridas (S. E. Wilson, 2020).

Nuestros resultados evidenciaron una reducida adhesión de fibroblastos sobre la formulación 4, resultado que contrastó con una alta adhesión celular de las otras 3 formulaciones. La principal diferencia entre la formulación 4 y las otras, radica en uno de los precursores reticulado junto a la gelatina. La formulación 4 es la única que no tiene Poli-D-lisina entre sus componentes y como se mencionó previamente, la Poli-D-lisina se relaciona con la adhesión celular y su ausencia en la formulación 4 sería la responsable de su baja adhesión celular. Si bien, se desconoce el motivo por el cual ocurre dicha adhesión, es asumido que se encuentra relacionada con la atracción electrostática entre las cargas eléctricas negativa de la membrana celular y la positiva de la Poli-D-lisina a pH fisiológico. La carga negativa de la membrana se fundamenta en la distribución heterogénea de sus fosfolípidos. Los fosfolípidos neutros como la esfingomielina y la fosfatidilcolina se encuentran en su mayoría en la capa externa de la membrana plasmática. Los fosfolípidos aniónicos como el ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol bi y tri fosfato se localizan principalmente en la capa interna de la membrana plasmática. Los grupos fosfato del grupo de cabeza lipídica tienen valores bajos de constante de disociación ácida (pKa), lo que significa que tienen una carga negativa a pH fisiológico. Esta carga negativa de fosfolípidos aniónicos es responsable de la carga de la capa interna de la membrana plasmática. Esta capa, atrae y une iones cargados positivamente, proteínas y motivos peptídicos (Bogdanov et al., 2020; Y. Ma et al., 2017). Como prueba de lo anterior, al medir la proliferación de fibroblastos sobre las 4 formulaciones, la número 4 no cubrió el 20% de la superficie observada. Por el contrario, en las formulaciones 10 y 28 los fibroblastos continuaron poblando la superficie hasta las 72 h. Similarmente, la tasa de sobrevida de fibroblastos fue nula en la formulación 4 mientras que, en las otras 3 formulaciones, superó el 80% de sobrevida.

Respecto a nuestros resultados y al compararlos con los previamente obtenidos por Ratanavaraporn et al., quien comparó el cultivo de fibroblastos en andamios de colágeno y gelatina reticulados por el método de deshidratación térmica, encontraron que ambos andamios poseían propiedades de biocompatibilidad y fisicoquímicas comparables entre sí. Sin embargo, los de gelatina se degradaban con mayor rapidez y, por ello, requieren modificarse adicionalmente mezclándose con otros materiales o mejorando la técnica de reticulación para disminuir su velocidad de degradación (Ratanavaraporn et al., 2006). Por otra parte, Romo et al. evaluó células corneales epiteliales y fibroblastos en películas de colágeno de soja y gelatina reticulada con lactosa, comprobando que sus formulaciones de gelatina con ácido láctico poseían mejor viabilidad a las 72 h que aquellas de colágeno para ambas líneas celulares al igual que sus propiedades ópticas, que, según el autor se debió a los métodos de preparación y entrecruzamiento del material (Romo-Valera et al., 2021). En particular, las conclusiones de Romo et al. potencian la idea principal de nuestro trabajo de investigación que es reducir el costo de los biomateriales utilizados para el tratamiento de la ceguera corneal, al confirmar que la gelatina puede competir con el colágeno en la investigación relativa a sustitutos y regeneración corneal.

En la Figura 31, el panel A contiene las fotografías de campo claro tomadas a las formulaciones durante tres días consecutivos. En ellas es evidente la gran diferencia que existió entre los hidrogeles y la cantidad de células observables en sus superficies. En la Figura 31B, se presentan las gráficas y análisis de significancia estadística del área cubierta por células de cada formulación (del panel A), Es posible advertir que, al cabo de las 72 horas, la formulaciones 4 y 34 son las que tienen mayores diferencias respecto del control con valores de $p < 0.0001$. Por su parte, el panel C de la Figura 31 muestra solamente las fotografías de fluorescencia con un color azul para las células marcadas con DAPI. Solo se muestran las formulaciones con adhesión celular, estas fueron la 10, 28 y 34.

La gráfica de la Figura 31D representa la tasa de supervivencia celular determinada a las 72 h. Entre las referencias consultadas no se indican valores buenos o malos para en la evaluación de la citocompatibilidad ya que, no es un valor binario, más bien son variables que se pueden modular en función de una aplicación específica y al respecto, nuestros resultados evidencian el potencial que tiene la Poli-D-lisina para ser considerada como parte de las formulaciones y un posible modulador de la citocompatibilidad.

De esta forma damos por completado el segundo objetivo específico, donde se ha demostrado que las 4 formulaciones cuentan con propiedades ópticas, térmicas e hidratación comparables a las del tejido corneal y al menos 3 de ellas permitieron la adhesión de fibroblastos en su superficie.

SOLO USO ACADÉMICO

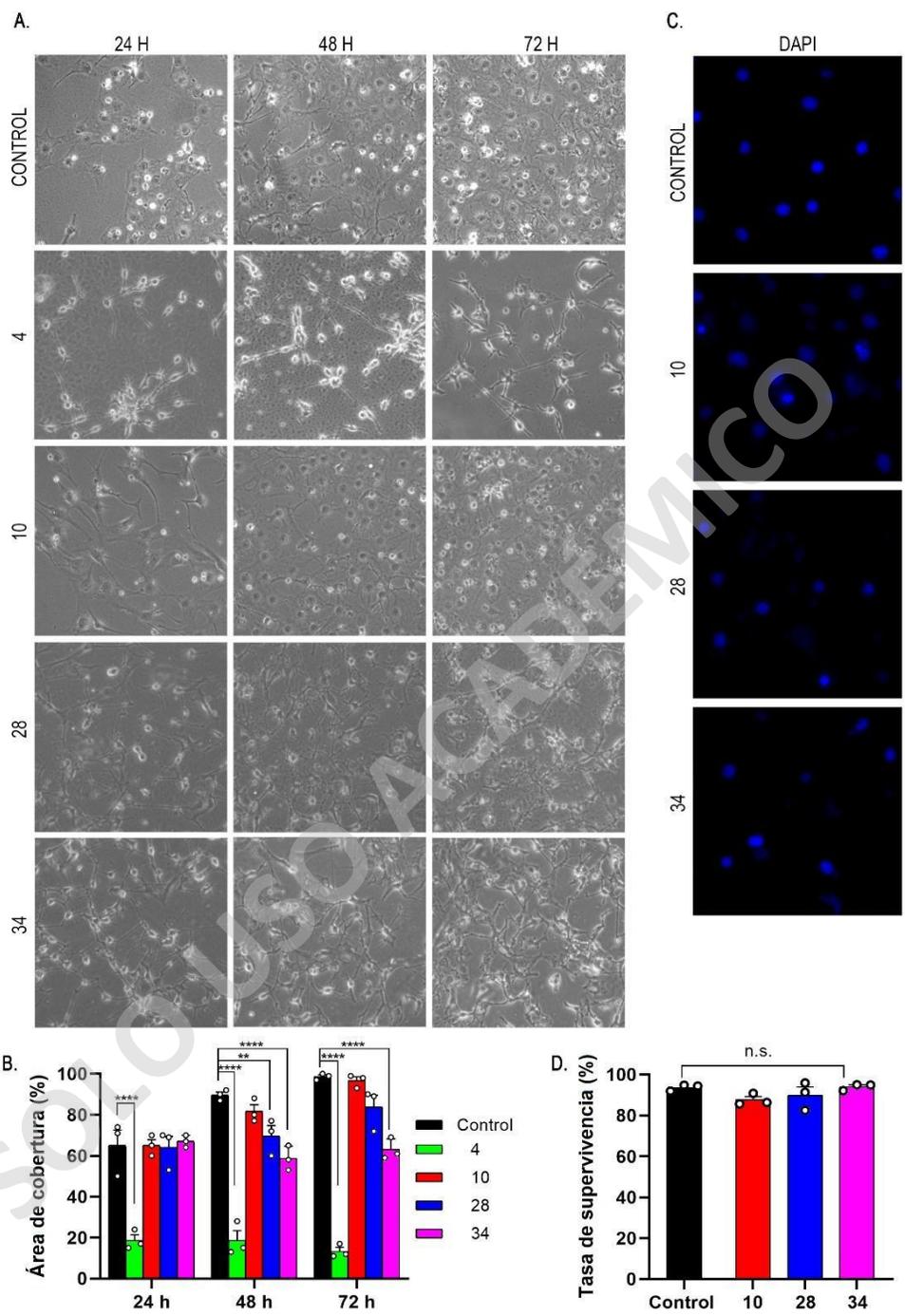


Figura 31. Citocompatibilidad de formulaciones. En A, imágenes de campo claro de las formulaciones; en B, gráfica del área porcentual ocupada por las células; en C imágenes con tinción DAPI para evaluar la sobrevivencia celular; y en D, las gráficas de sobrevivencia celular. Elaboración propia.

3. Resultados y discusión del tercer objetivo específico

Una de las ventajas de trabajar con materiales multilaminados es que el conjunto de láminas apiladas puede contener distintas concentraciones de un elemento con alguna actividad particular. De tal modo, se puede crear un gradiente espacial dentro del andamio, como lo sugirió Niu et al. en su investigación sobre andamios con gradiente integrado para la regeneración simultánea de hueso subcondral y cartílago (Niu et al., 2023). Esta idea de aplicar gradientes al apilamiento laminar en la regeneración corneal nos permitiría crear ambientes idóneos para la reestructuración tisular, acorde a los cambios morfológicos mencionados previamente en el estroma corneal. Similar a lo realizado por He et al., quienes desarrollaron estructuras bilaminadas para la regeneración corneal compuestas por diacrilato de polietilenglicol (PEGDA) y metacrilato de gelatina (GelMA). Este último es un polímero fotocurable, junto a un fotoiniciador como el fenil-2,4,6-trimetilbencenoil fosfinato, utilizado por He. El constructo bilaminar se realizó con una bioimpresora 3D del tipo de procesamiento digital de la luz. Esta bioimpresora permitió fotocurar la mezcla de hidrogeles en forma de domo. Si bien no crearon las láminas de forma individual (como en nuestro caso), en su bioimpresión utilizaron dos biotintas con una mezcla de los polímeros mencionados, diferenciados por las líneas celulares destinadas a regenerar el estroma y al epitelio. Por lo tanto, la unión de las capas que formaron su constructo bilaminar fue la propia reticulación *in situ* de sus polímeros (B. He et al., 2022). Esta forma de crear sistemas bilaminados sobre un sustrato único tiene cierta aproximación con la construcción de nuestro hidrogel trilaminar, el cual construimos al sumergir y apilar las láminas en solución de hidrogel con la cual se entrecruzaron *in situ*.

Varios años antes, Pérez et al. también crearon un material bilaminar para la regeneración corneal. Unieron secciones de tejido corneal de conejo a un hidrogel de poli(óxido de etileno), entrecruzados covalentemente por radiación de haces de electrones (Perez et al., 1995). La reticulación por radiación de

haces de electrones es una técnica mediante la cual un material es bombardeado por electrones de alta energía que, al interactuar con la materia, pueden romper los enlaces más susceptibles (como los enlaces de hidrógeno) y formar radicales libres y con ellos nuevos enlaces. El poli(óxido de etileno) es un polímero biocompatible, reticulable por este método en sus grupos terminales -OH (Mahdy et al., 2022).

En nuestro caso, los adherentes fueron las láminas de cada formulación y como adhesivo utilizamos una solución basada en la formulación 10 por tener la mayor transmitancia en el espectro UV-vis (Figura 23). Cuando el adhesivo se introdujo entre las láminas hidratadas en agua, estas no lograron una buena adhesión, separándose algunas de ellas con facilidad al ser manipuladas como se puede ver en la Figura 30A. Una mejor adhesión interlaminar se presentó cuando las láminas eran hidratadas en la formulación cemento (Figura 30B).



Figura 32. Fotografías de los constructos trilaminares liofilizados. En A se observa la baja adhesión interlaminar obtenida al hidratar las láminas en agua. En B sistemas trilaminares bien adheridos cuando sus láminas son hidratadas en el adhesivo

La Figura del anexo A3 muestra fotografías por microscopías de campo claro de un constructo trilaminar hidratado y luego de ser liofilizado.

En la construcción de los hidrogeles multilaminados, la forma en que se unen sus láminas es un factor crucial y determinante en sus propiedades. La elección de la química de unión depende de la aplicación específica y de las propiedades deseadas del adhesivo, como resistencia, reversibilidad, estabilidad y respuesta a estímulos externos sin dejar de lado que los

hidrogeles tienen superficies húmedas, deformables y una reducida cantidad de grupos funcionales disponibles (Bovone et al., 2021). Conforme a lo anterior, es muy probable que la baja densidad de grupos funcionales expuestos en las superficies de los hidrogeles hidratados en agua no logró crear una cantidad adecuada de enlaces covalentes entre las láminas adheridas. Esto no sucedió en el conjunto de láminas que se hidrataron en el adhesivo. En estas últimas, el adhesivo penetra e hidrata completamente las láminas. De este modo, nuestro adhesivo cubre una mayor superficie de contacto de los adherentes y por consecuencia, tiene una mayor probabilidad de crear enlaces covalentes y así la adhesión pudo sostenerse. La Figura del anexo A4 tiene una imagen de microscopía SEM en la cual se destaca con colores el adherente y el adhesivo de un constructo trilaminar.

La Figura 31 tiene imágenes de microscopía SEM de los constructos creados con la formulación 4. En ellas, los sistemas trilaminares para la formulación 4 en la imagen SEM de la Figura 31A se ve con claridad extensas separaciones interlaminares cuando son hidratadas en agua. Mientras que, en la imagen

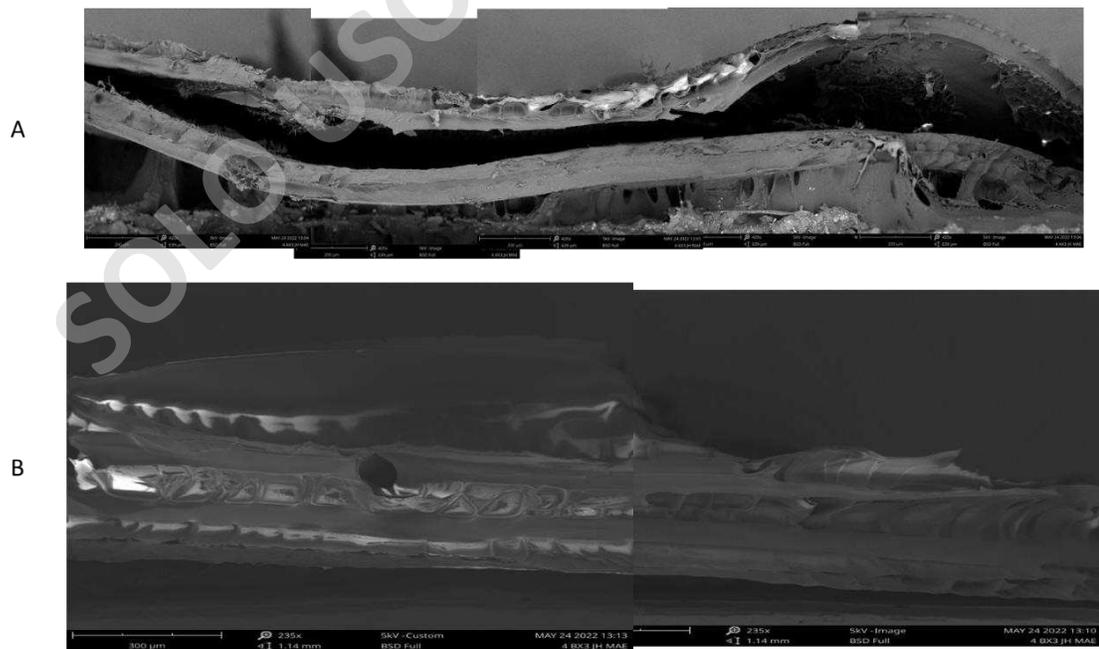


Figura 33. Microscopías SEM de sistemas trilaminares de la formulación 4. En A hidratados en agua, en B hidratados en adhesivo.

SEM de la Figura 31B, el sistema trilaminar construido hidratando las láminas en el adhesivo muestra sus láminas firmemente unidas.

Otro conjunto de imágenes SEM de los sistemas trilaminares se encuentran en la Figura 32. En ella se muestran estructuras trilaminares construidas por láminas hidratadas en agua Figuras 32B-E y las construidas con láminas hidratadas en el adhesivo en las Figuras F32F-I. Al observar con detención dichas imágenes de los hidrogeles, no fueron muy similares a la imagen SEM corneal de la Figura 32A. Resultó evidente como el método por el cual fueron hidratadas, nos permitió modificar sus estructuras, algo importante cuando se requiera construir estructuras personalizadas modificando el número y espesor laminar.

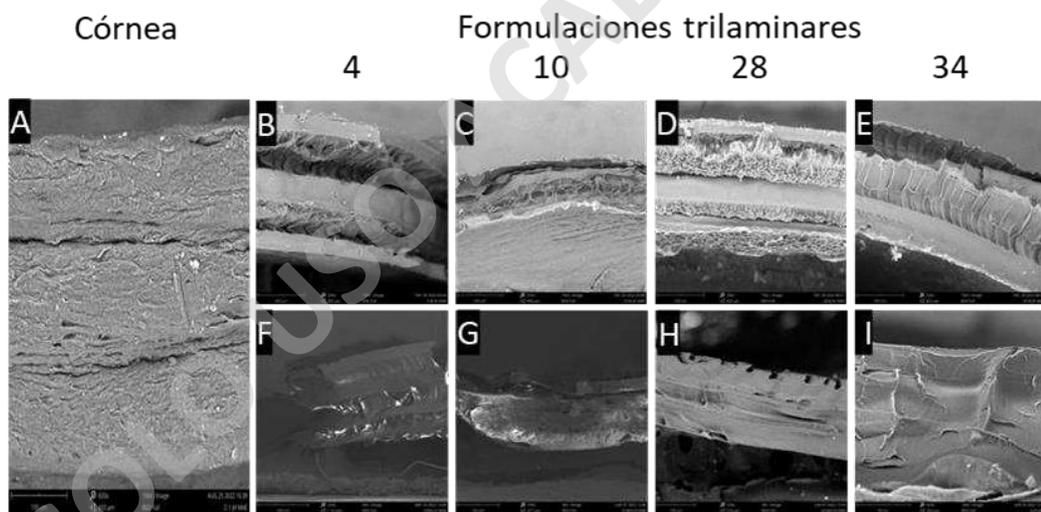


Figura 34. Microscopías SEM de córnea y formulaciones trilaminares. En A una sección transversal corneal; B-E estructuras a partir de láminas hidratadas en agua; F-I estructuras a partir de láminas hidratadas en adhesivo. Elaboración propia.

Profundizando en el tema de la adhesión, esta se orienta principalmente a la descripción de las interacciones que permiten unir un material a otro. En el caso de los hidrogeles con fines regenerativos, Bovone y Taboada las describen como 4 "uniones de adhesión" o interacciones por las que un hidrogel se puede unir a otra superficie, sea o no otro hidrogel. Estas

interacciones son las covalentes, covalentes dinámicas, electrostáticas y "otras interacciones" (Bovone et al., 2021; Taboada et al., 2020). Brevemente, los enlaces covalentes permanentes C-C, C-N, Si-O-Si proporcionan uniones de adhesión fuertes e irreversibles. Dichos enlaces requieren que los adherentes posean grupos funcionales complementarios o que sean modificados químicamente para que los tengan (Yang et al., 2020). De forma similar realizamos la construcción de nuestros sistemas trilaminares, donde utilizamos una mezcla de hidrogeles (gelatina y Poli-D-lisina) y un agente de reticulación (el glutaraldehído) como adhesivo. Este adhesivo se reticulaba *in situ*, formando enlaces covalentes entre los grupos amino disponibles en las láminas de las formulaciones, los grupos amino de la Poli-D-lisina y la gelatina disueltas del adhesivo con los grupos aldehídos del glutaraldehído.

Otro valor con importancia es la porosidad. La Figura 33 tiene las gráficas que donde fue posible comparar los valores obtenidos, luego del procesamiento de imágenes con el software ImageJ. Vimos en dicho gráfico, que el tamaño de los poros corneales ($31.8 \mu\text{m}^2$) no se alejaba de los obtenidos en los hidrogeles trilaminares 4 ($23.0 \mu\text{m}^2$), 10 ($28.5 \mu\text{m}^2$) y 34 ($24.5 \mu\text{m}^2$). Por el contrario, el hidrogel trilaminar de la formulación 28 tuvo poros con un tamaño en promedio cercano al doble del corneal ($59.5 \mu\text{m}^2$). Estadísticamente solo la formulación 28 presentó una diferencia estadísticamente significativa respecto de la porosidad corneal. Esta diferencia, posiblemente esté relacionada a la presencia de microburbujas de aire contenidas entre las láminas al ser adheridas y a la sección analizada.

Los poros de los hidrogeles tienen influencia en la viabilidad y migración celular (Hori et al., 2018; Pezeshkpour et al., 2021). A nivel ocular, también se ha reportado la implicancia de los poros de los hidrogeles y utilizados en el estudio de la regeneración corneal. Al respecto, Khosravimelal et al, realizaron una revisión de varios hidrogeles para la regeneración corneal, en su revisión indico que hidrogeles porosos a base de ácido hialurónico, PEG y poloxámero, y HEMA tienen estructuras porosas que potenciaron la viabilidad celular

Porosidad de hidrogeles

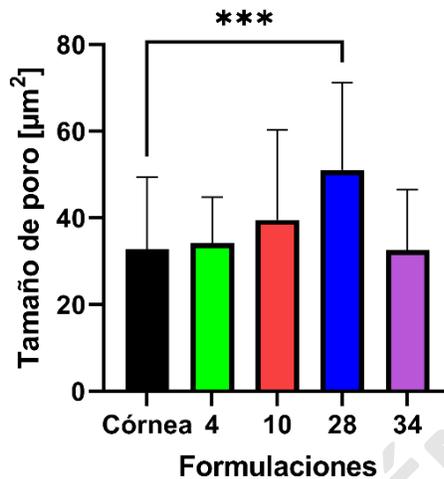


Figura 35. Gráfico del tamaño de poro de córnea y los hidrogeles trilaminares.

corneal (Khosravimelal et al., 2021). Es importante notar que la porosidad de los hidrogeles está condicionada al método de producción y su reticulado (Annabi et al., 2009; Xiao et al., 2011). Acorde a nuestros hallazgos y la bibliografía, creemos que es posible optimizar la estructura tridimensional y tamaño el de los poros de nuestros hidrogeles y así, optimizar la citocompatibilidad tanto con los fibroblastos utilizados en esta investigación, como también en otros modelos celulares, especialmente de origen corneal como las epiteliales, queratocitos estromales y las células madre del limbo esclerocorneal.

De forma complementaria, a las estructuras trilaminares se evaluó su transmitancia. Debido al aumento de espesor del material, se asumió una reducción de sus transmitancias acorde a la ley de Lambert-Beer que establece la directa dependencia de la absorbancia con la longitud del camino óptico y la concentración de los constituyentes del espécimen estudiado (L. Li et al., 2022). Dicha suposición, se plasmó cuando comparamos las transmitancias de las 4 formulaciones mono y trilaminares graficadas en la

Figura 34. En dichas gráficas, fue evidente la disminución de la transmitancia entre los hidrogeles monolaminares y los trilaminares. Entre los 300 nm y 400 nm la transmitancia de las formulaciones trilaminares tuvo disminuciones, que van desde un 96% en la formulación 4 hasta un 8% en la formulación 10 respecto de sus valores monolaminares. En el rango visible (450 nm-700 nm), en promedio la transmitancia disminuyó en un 6.9%. Si bien, sería provechoso obtener los coeficientes de absorción de nuestros materiales, por ser útiles en

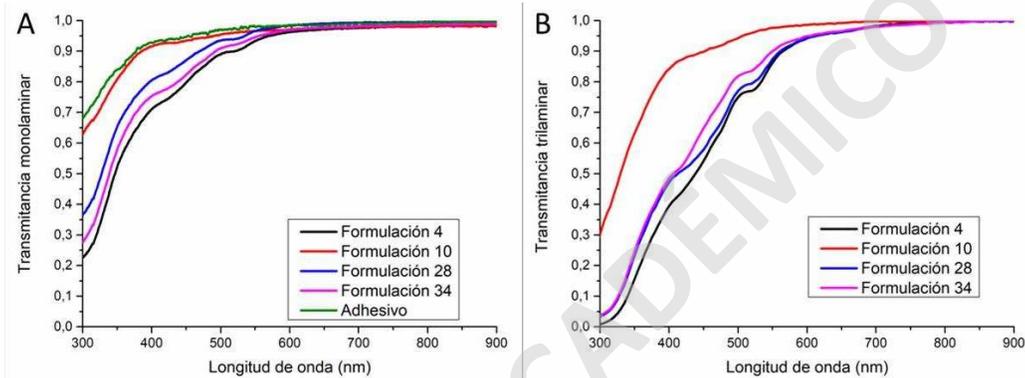


Figura 36. Gráficas de transmitancia para hidrogeles monolaminares y trilaminares. En A las transmitancias monolaminares y en B transmitancias trilaminares. Elaboración propia.

la personalización de las propiedades ópticas y geométricas en la elaboración de nuestros materiales, este no era el objetivo del presente trabajo. Sin embargo, creemos que es indispensable abordar esto posteriormente, puesto que, conocer esos coeficientes nos permitiría, diseñar la geometría de hidrogeles multilaminares de forma personalizada.

Adicionalmente, nuestro material demostró tener la flexibilidad necesaria para adoptar la forma de un domo, imitando la curvatura corneal, cuando se construyó el material trilaminar sobre un molde convexo con una curvatura similar al corneal. Estos hidrogeles trilaminares con forma de domo fueron analizados por tomografía de coherencia óptica y sus imágenes se pueden observar en la Figura 35. Con esta herramienta, fue posible evaluar el espesor central de cada constructo cuando están completamente hidratados, siendo los siguientes valores obtenidos para los hidrogeles trilaminares de la

formulación 4: 429 μm (Figuras 35A); de la formulación 10: 534 μm (Figura 35B); de la formulación 28: 494 μm (Figura 35C) y de la formulación 34: 797 μm (Figura 35D). Estos valores se encuentran cercanos a los de córneas humanas cuyos valores rondan las 526 μm (Annamary Stanislaus et al., 2021). Para nuestro interés, es importante señalar que el espesor del hidrogel podría ser personalizado variando los volúmenes utilizados en la creación de las láminas. La superficie de los constructos eran lisas y transparentes como una cornea natural en la tomografía de coherencia óptica. También se pueden apreciar líneas de hiperreflectancia óptica que recorren toda la extensión de los hidrogeles y que, corresponde a las interfaces de las láminas apiladas. Estas son completamente esperables, pues, como ya se había mencionado previamente, las láminas y el adhesivo tienen distinto índice de refracción y, además, como se vio en las imágenes SEM, los hidrogeles trilaminares presentan cambios morfológicos a lo amplio de su espesor.

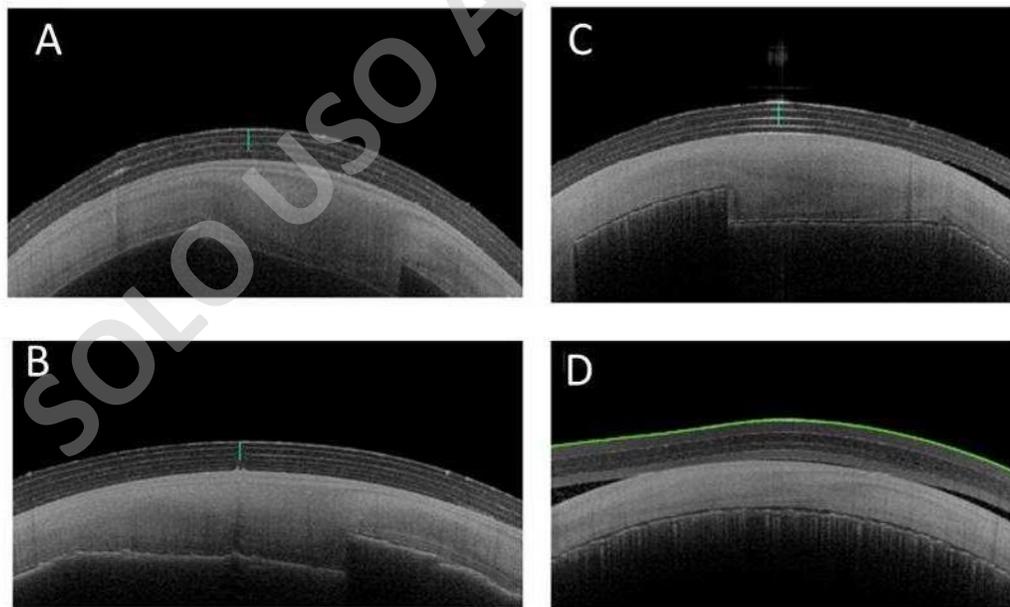


Figura 37. Tomografías de coherencia óptica de hidrogeles trilaminares con forma de córnea. en A la formulación 4; en B la formulación 10; en C la formulación 28 y en D la formulación 34.

Con lo anterior en mente, podemos inferir que es posible construir nuestros hidrogeles trilaminares con geometrías personalizables.

Para finalizar la sección de resultados, es importante advertir a los lectores que nuestro trabajo presento limitaciones que mermaron, pero no impidieron la ejecución de los objetivos planteados. Entre estas limitaciones, encontramos los acontecimientos sanitarios y revueltas sociales vividas en país mientras se desarrollaba esta trabajo. Estas impidieron la ejecución de varias de las pruebas y ensayos que se harían por colaboración fuera de la Universidad y en el extranjero. Debido a lo anterior, fue necesario realizar una serie de cambios en la estructura y ejecución del proyecto original y de esta forma poder desarrollar una investigación algo reducida, pero sólida en su forma y ejecución sin perder su foco, que era la búsqueda de materiales asequibles que puedan reemplazar los costosos biomateriales actuales destinados a la regeneración y tratamiento de la ceguera corneal. Así, aportar con nuestros materiales a mejorar la accesibilidad e impulsar la innovación y el progreso en este ámbito crítico de la medicina regenerativa. A modo de proyección de la investigación realizada, creemos que incorporar a la investigación parámetros como la difusión de gases, optimización e implicancia de los espesores y número de láminas en la construcción de los hidrogeles y sin dejar de considerar los coeficientes de absorbancia de la ley de Lambert Beer de nuestros materiales. Sumar a estos, evaluar la citocompatibilidad con otras células corneales (epiteliales, endoteliales y estromales) y finalizar con la incorporación de la bioimpresión, una nueva e innovadora herramienta que nos permitirá crear los constructos multilaminares con una distribución y control espacial de sus constituyentes, pensando en la aplicación personalizada de nuestros modelos a las necesidades específicas de los pacientes.

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

VI. CONCLUSIONES

Las propiedades fisicoquímicas evaluadas a los constructos laminares seleccionados a partir de gelatina, quitosano y Poli-D-lisina tienen el potencial de ser utilizados en modelos para el desarrollo de materiales destinados a imitar propiedades corneales utilizando una pequeña fracción del costo de los materiales actuales como el colágeno.

De las formulaciones seleccionadas, las que contenían Poli-D-lisina presentaron adhesión y proliferación celular con fibroblastos y dándoles el potencial para ser utilizadas como plataformas para el cultivo de células corneales en ingeniería de tejidos.

La mezcla de gelatina y Poli-D-lisina puede ser utilizada como agente hidratante y adhesivo entre láminas de las formulaciones seleccionadas para la construcción de estructuras multilaminares con geometrías que pueden asemejar la curvatura corneal.

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, F., Levin, L., Kaufman, P., & Alm, A. (2011). Chapter 4: Cornea and Sclera. In O. Elsevier Books (Ed.), *Adler's Physiology of the Eye: Vol. 11th Edition* (11th ed., pp. 70–125). Elsevier, Saunders. www.elsevierhealth.com
- Al Zubi, K., Albakar, Y., & Nasser, R. (2019). Transepithelial versus Epithelium off Crosslinking for Treating Keratoconus among Jordanians. *The Open Ophthalmology Journal*, 13(1), 8–14. <https://doi.org/10.2174/1874364101913010008>
- Andley, U. P., Malone, J. P., & Townsend, R. R. (2011). Inhibition of Lens Photodamage by UV-Absorbing Contact Lenses. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(11), 8330. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7633>
- Anicuta, S.-G., Dobre, L., Stroescu, M., & Jipa, I. (2010). *FOURIER TRANSFORM INFRARED (FTIR) SPECTROSCOPY FOR CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL FILMS CONTAINING CHITOSAN.*
- Annabi, N., Mithieux, S. M., Boughton, E. A., Ruys, A. J., Weiss, A. S., & Dehghani, F. (2009). Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 30(27), 4550–4557. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.014>
- Annamary Stanislaus, Ntsilane Susan Mosenene, Celina Mhina, John Stanislaus Kisimbi, Frederick Robert Burgess, Milka Madaha Mafwiri, Dilawar Padhan, & Anna John Sanyiwa. (2021). The pattern of central corneal thickness in patients attending a Tertiary Hospital in Dar-Es-Salaam. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 9(2), 127–133. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2021.9.2.0056>
- Asociación Argentina de Dermatología., R., & Cevallos, M. (2015). Revista argentina de dermatología. In *Revista argentina de dermatología* (Vol. 96,

Issue 3). Asociación Argentina de Dermatología.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2015000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Balasubramanian, D., Du, X., & Zigler, J. S. (1990). THE REACTION OF SINGLET OXYGEN WITH PROTEINS, WITH SPECIAL REFERENCE TO CRYSTALLINS. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 5, Issue 4).

Barbucci, R. (2009). *Hydrogels Biological Properties and Applications* (R. Barbucci, Ed.). Springer-Verlag.

Barrientez, B., Nicholas, S. E., Whelchel, A., Sharif, R., Hjortdal, J., & Karamichos, D. (2019). Corneal injury: Clinical and molecular aspects. *Experimental Eye Research*, 186, 107709. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107709>

Benatti, A., Castillo, R., Velasco, J., de Wit Carter, G., Hernández, E., & Sánchez, V. (2022). *Tipos de Crosslinking y riboflavinas*. Asociación Para Evitar La Ceguera En México. <https://oftalmologoaldia.com/tipos-de-crosslinking-y-riboflavinas/>

Benjakul, S., & Kittiphattanabawon, P. (2019). Gelatin. In *Encyclopedia of Food Chemistry* (pp. 121–127). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21588-6>

Biswas, J., & Datta, B. (2021). *Biomaterials: An Introduction to Materials for Biomedical Applications* (pp. 43–53). https://doi.org/10.1007/978-981-15-8307-0_2

Bogdanov, M., Pyrshev, K., Yesylevskyy, S., Ryabichko, S., Boiko, V., Ivanchenko, P., Kiyamova, R., Guan, Z., Ramseyer, C., & Dowhan, W. (2020). Phospholipid distribution in the cytoplasmic membrane of Gram-negative bacteria is highly asymmetric, dynamic, and cell shape-dependent. *Science Advances*, 6(23). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz6333>

- Bonanno, J. A., & Srinivas, S. P. (2010). Regulation of Corneal Endothelial Function. In *Encyclopedia of the Eye* (pp. 21–27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00075-0>
- Bottos, K. M., Oliveira, A. G., Bersanetti, P. A., Nogueira, R. F., Lima-Filho, A. A. S., Cardillo, J. A., Schor, P., & Chamon, W. (2013). Corneal Absorption of a New Riboflavin-Nanostructured System for Transepithelial Collagen Cross-Linking. *PLoS ONE*, 8(6), e66408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066408>
- Boulze Pankert, M., Goyer, B., Zaguia, F., Bareille, M., Perron, M. C., Liu, X., Cameron, J. D., Proulx, S., & Brunette, I. (2014). Biocompatibility and functionality of a tissue-engineered living corneal stroma transplanted in the feline eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55(10), 6908–6920. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-14720>
- Bovone, G., Dudaryeva, O. Y., Marco-Dufort, B., & Tibbitt, M. W. (2021). Engineering Hydrogel Adhesion for Biomedical Applications via Chemical Design of the Junction. In *ACS Biomaterials Science and Engineering* (Vol. 7, Issue 9, pp. 4048–4076). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.0c01677>
- Boyd, B. F. (2000). *Atlas de cirugía refractiva* (1st ed.). Highlights Of Ophthalmology.
- Bray, L. J., George, K. A., Ainscough, S. L., Hutmacher, D. W., Chirila, T. V., & Harkin, D. G. (2011). Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes. *Biomaterials*, 32(22), 5086–5091. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.03.068>
- Bray, L. J., George, K. A., Hutmacher, D. W., Chirila, T. V., & Harkin, D. G. (2012). A dual-layer silk fibroin scaffold for reconstructing the human corneal limbus. *Biomaterials*, 33(13), 3529–3538. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.045>

- Campo, H., Santamaria, X., Cervelló, I., & Simón, C. (2019). Scaffolds for bioengineered uterus. In *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume Two* (pp. 283–316). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102561-1.00011-7>
- Carey, F. A., & Robert, M. G. (2011). Organic Chemistry BT - Organic Chemistry. In *Organic Chemistry*. papers3://publication/uuid/8E594D36-E3E2-4619-B977-6E8AFFBE2355
- Cebi, N., Durak, M. Z., Toker, O. S., Sagdic, O., & Arici, M. (2016). An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. *Food Chemistry*, *190*, 1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.065>
- Centro Oftalmológico Láser. (2018, June 5). *Aranceles Centro Oftalmológico Láser*. <https://www.centrooftalmologicolaser.cl/wp-content/uploads/2018/05/Aranceles-Centro-Oftalmologico-Laser.pdf>
- Charoenrook de la Fuente, V. (2015). *RESULTADOS CLÍNICOS DE QUERATOPRÓTESIS CON TEJIDO AUTÓLOGO*. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Chen, J., Li, Q., Xu, J., Huang, Y., Ding, Y., Deng, H., Zhao, S., & Chen, R. (2005). Study on Biocompatibility of Complexes of Collagen-Chitosan-Sodium Hyaluronate and Cornea. *Artificial Organs*, *29*(2), 104–113. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2005.29021.x>
- Chen, M., Ng, S. M., Akpek, E. K., & Ahmad, S. (2020). Artificial corneas versus donor corneas for repeat corneal transplants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *2020*(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009561.pub3>
- Chen, X. B., Fazel Anvari-Yazdi, A., Duan, X., Zimmerling, A., Gharraei, R., Sharma, N. K., Sweilem, S., & Ning, L. (2023). Biomaterials / bioinks and

- extrusion bioprinting. *Bioactive Materials*, 28, 511–536.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.06.006>
- Chen, Y. (2019). Properties and development of hydrogels. In *Hydrogels Based on Natural Polymers*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816421-1.00001-X>
- Chiriac, R., Toche, F., & Boyron, O. (2023). Chapter 8. Calorimetry and thermal analysis for the study of polymer properties. In Aline Auroux & Ljiljana Damjanović-Vasilić (Eds.), *Thermal Analysis and Calorimetry* (pp. 245–292). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110590449-008>
- Chuck, R. S., Jacobs, D. S., Lee, J. K., Afshari, N. A., Vitale, S., Shen, T. T., & Keenan, J. D. (2018). Refractive Errors & Refractive Surgery Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*, 125(1), P1–P104.
<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.10.003>
- Clínica Alemana. (2023). *Arancel Clínica Alemana*.
<https://www.alemana.cl/wls/arancel/buscarListadoPabellones.htm?pagina=6>
- Cohen, E. (2009). Chitin. In *Encyclopedia of Insects* (pp. 156–157). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00052-7>
- Colin, J., Cochener, B., Savary, G., & Malet, F. (2000). Correcting keratoconus with intracorneal rings. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 26(8), 1117–1122. [https://doi.org/10.1016/S0886-3350\(00\)00451-X](https://doi.org/10.1016/S0886-3350(00)00451-X)
- Costagliola, C., Romano, V., Forbice, E., Angi, M., Pascotto, A., Boccia, T., & Semeraro, F. (2013). Corneal oedema and its medical treatment. *Clinical and Experimental Optometry*, 96(6), 529–535.
<https://doi.org/10.1111/cxo.12060>
- Couture, C., Zaniolo, K., Carrier, P., Lake, J., Patenaude, J., Germain, L., & Guérin, S. L. (2016). The tissue-engineered human cornea as a model to

- study expression of matrix metalloproteinases during corneal wound healing. *Biomaterials*, 78, 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.11.006>
- Crabb, R. A. B., Chau, E. P., Decoteau, D. M., & Hubel, A. (2006). Microstructural Characteristics of Extracellular Matrix Produced by Stromal Fibroblasts. *Annals of Biomedical Engineering*, 34(10), 1615–1627. <https://doi.org/10.1007/s10439-006-9181-x>
- Crabb, R. A. B., & Hubel, A. (2008). Influence of Matrix Processing on the Optical and Biomechanical Properties of a Corneal Stroma Equivalent. *Tissue Engineering Part A*, 14(1), 173–182. <https://doi.org/10.1089/ten.a.2007.0139>
- Dash, R., Foston, M., & Ragauskas, A. J. (2013). Improving the mechanical and thermal properties of gelatin hydrogels cross-linked by cellulose nanowhiskers. *Carbohydrate Polymers*, 91(2), 638–645. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.08.080>
- de Paiva, C. S., St. Leger, A. J., & Caspi, R. R. (2022). Mucosal immunology of the ocular surface. *Mucosal Immunology*, 15(6), 1143–1157. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00551-6>
- del Buey Sayas, M. A., & Peris Martinez, C. (2014). *Biomecánica y arquitectura corneal* (1st ed.). Elsevier España.
- Dharadhar, S., & Majumdar, A. (2019). Biomaterials and Its Medical Applications. In *Application of Biomedical Engineering in Neuroscience* (pp. 355–380). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7142-4_18
- Dhawan, S., Rao, K., & Natrajan, S. (2011). Complications of Corneal Collagen Cross-Linking. *Journal of Ophthalmology*, 2011, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2011/869015>

- Doillon, C. J., Watsky, M. A., Hakim, M., Wang, J., Munger, R., Laycock, N., Osborne, R., & Griffith, M. (2003). A Collagen-Based Scaffold for a Tissue Engineered Human Cornea: Physical and Physiological Properties. *The International Journal of Artificial Organs*, 26(8), 764–773. <https://doi.org/10.1177/039139880302600810>
- Doillon, C. J., Whyne, C. F., Brandwein, S., & Silver, F. H. (1986). Collagen-based wound dressings: Control of the pore structure and morphology. *Journal of Biomedical Materials Research*, 20(8), 1219–1228. <https://doi.org/10.1002/jbm.820200811>
- Downie, L. E., & Lindsay, R. G. (2015). Contact lens management of keratoconus. *Clinical and Experimental Optometry*, 98(4), 299–311. <https://doi.org/10.1111/cxo.12300>
- Dua, H. S., Faraj, L. A., Said, D. G., Gray, T., & Lowe, J. (2013). Human corneal anatomy redefined: A novel pre-descemet's layer (Dua's Layer). *Ophthalmology*, 120(9), 1778–1785. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.01.018>
- Duan, X., & Sheardown, H. (2006). Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: Mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials*, 27(26), 4608–4617. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.022>
- Eckert, K. A., Carter, M. J., Lansingh, V. C., Wilson, D. A., Furtado, J. M., Frick, K. D., & Resnikoff, S. (2015). A Simple Method for Estimating the Economic Cost of Productivity Loss Due to Blindness and Moderate to Severe Visual Impairment. *Ophthalmic Epidemiology*, 22(5), 349–355. <https://doi.org/10.3109/09286586.2015.1066394>
- El Merhie, A., Salerno, M., Heredia-Guerrero, J. A., & Dante, S. (2020). Graphene-enhanced differentiation of neuroblastoma mouse cells

mediated by poly-D-lysine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 191. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110991>

Fagerholm, P., Lagali, N. S., Carlsson, D. J., Merrett, K., & Griffith, M. (2009). Corneal regeneration following implantation of a biomimetic tissue-engineered substitute. *Clinical and Translational Science*, 2(2), 162–164. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2008.00083.x>

Fagerholm, P., Lagali, N. S., Merrett, K., Jackson, W. B., Munger, R., Liu, Y., Polarek, J. W., Söderqvist, M., & Griffith, M. (2010). A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-Month follow-up of a phase 1 clinical study. *Science Translational Medicine*, 2(46). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001022>

Fagerholm, P., Lagali, N. S., Ong, J. A., Merrett, K., Jackson, W. B., Polarek, J. W., Suuronen, E. J., Liu, Y., Brunette, I., & Griffith, M. (2014). Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials*, 35(8), 2420–2427. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.11.079>

Farris, S., Song, J., & Huang, Q. (2010). Alternative Reaction Mechanism for the Cross-Linking of Gelatin with Glutaraldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 998–1003. <https://doi.org/10.1021/jf9031603>

Fernández, G. (2022). *Espectroscopia infrarroja*. <https://www.quimicaorganica.org/espectroscopia-infrarroja.html>

Festas, A., Ramos, A., & Davim, J. (2020). Medical devices biomaterials A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications*, 234(1), 218–228. <https://doi.org/10.1177/1464420719882458>

FONASA. (2023, May 30). *Conoce el valor de tu bono en la MLE*. Conoce El Valor de Tu Bono En La MLE. <https://www.fonasa.cl/sites/fonasa/beneficiarios/tramites/valor-bono>

- Furlan, W., García Monreal, J., & Escrivá Muñoz, L. (2009). *Fundamentos de optometría*. Universitat de València.
- Gain, P., Jullienne, R., He, Z., Aldossary, M., Acquart, S., Cognasse, F., & Thuret, G. (2016). Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmology*, *134*(2), 167–173. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2015.4776>
- Galvis, V., Tello, A., Ortiz, A. I., & Escaf, L. C. (2017). Patient selection for corneal collagen cross-linking: an updated review. *Clinical Ophthalmology*, *Volume 11*, 657–668. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S101386>
- Guo, C., Wang, S., Liu, H., Feng, L., Song, Y., & Jiang, L. (2008). Wettability Alteration of Polymer Surfaces Produced by Scraping. *Journal of Adhesion Science and Technology*, *22*(3–4), 395–402. <https://doi.org/10.1163/156856108X304832>
- Gupta, N., & Ganger, A. (2016). Keratoglobus: a close entity to megalophthalmos. *SpringerPlus*, *5*(1), 4–6. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2307-1>
- Gupta, N., Vashist, P., Ganger, A., Tandon, R., & Gupta, S. (2018). Eye donation and eye banking in India. *The National Medical Journal of India*, *31*(5), 283. <https://doi.org/10.4103/0970-258X.261189>
- Gutiérrez-Gutiérrez, M. I., Morales-Mendivelso, D. F., Muvdi-Nova, C. J., & Chaves-Guerrero, A. (2015). Síntesis y caracterización de membranas híbridas a partir de quitosán, polivinil alcohol y sílice para su aplicación en deshidratación de gases. *Iteckne*, *12*(1), 33–43. <https://doi.org/10.15332/iteckne.v12i1.819>
- Hafidz, M., Yaakob, C. M., Amin, I., & Noorfaizan, A. (2011). Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin. *International Food Research Journal*, *18*, 813–817.

- Han, X., Alu, A., Liu, H., Shi, Y., Wei, X., Cai, L., & Wei, Y. (2022). Biomaterial-assisted biotherapy: A brief review of biomaterials used in drug delivery, vaccine development, gene therapy, and stem cell therapy. *Bioactive Materials*, 17, 29–48. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.011>
- Hashemi, H., Khabazkhoob, M., Emamian, M., Shariati, M., Miraftab, M., Yekta, A., Ostadimoghaddam, H., & Fotouhi, A. (2015). Association between refractive errors and ocular biometry in Iranian adults. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, 10(3), 214. <https://doi.org/10.4103/2008-322X.170340>
- Hashemi, H., Seyedian, M. A., Miraftab, M., Fotouhi, A., & Asgari, S. (2013). Corneal Collagen Cross-linking with Riboflavin and Ultraviolet A Irradiation for Keratoconus. *Ophthalmology*, 120(8), 1515–1520. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2013.01.012>
- Hashimoto, Y., Hattori, S., Sasaki, S., Honda, T., Kimura, T., Funamoto, S., Kobayashi, H., & Kishida, A. (2016). Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model. *Scientific Reports*, 6(May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep27734>
- Haugh, M. G., Jaasma, M. J., & O'Brien, F. J. (2009). The effect of dehydrothermal treatment on the mechanical and structural properties of collagen-GAG scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 89A(2), 363–369. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31955>
- He, B., Wang, J., Xie, M., Xu, M., Zhang, Y., Hao, H., Xing, X., Lu, W., Han, Q., & Liu, W. (2022). 3D printed biomimetic epithelium/stroma bilayer hydrogel implant for corneal regeneration. *Bioactive Materials*, 17, 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.034>

- He, X. (2011). Thermostability of Biological Systems: Fundamentals, Challenges, and Quantification. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 5(1), 47–73. <https://doi.org/10.2174/1874120701105010047>
- Henein, C., & Nanavaty, M. A. (2017). Systematic review comparing penetrating keratoplasty and deep anterior lamellar keratoplasty for management of keratoconus. *Contact Lens and Anterior Eye*, 40(1), 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2016.10.001>
- Heras-Mozos, R., López-Carballo, G., Hernández, R., Gavara, R., & Hernández Muñoz, P. (2023). pH modulates antibacterial activity of hydroxybenzaldehyde derivatives immobilized in chitosan films via reversible Schiff bases and its application to preserve freshly-squeezed juice. *Food Chemistry*, 403, 134292. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134292>
- Hockwin, O., Kojima, M., Sakamoto, Y., Wegener, A., Shui, Y. B., & Sasaki, K. (1999). UV DAMAGE TO THE EYE LENS: Further Results from Animal Model Studies: A review. *Journal of Epidemiology*, 9(6sup), 39–47. https://doi.org/10.2188/jea.9.6sup_39
- Hori, A., Watabe, Y., Yajima, Y., Utoh, R., Yamada, M., & Seki, M. (2018). Preparation of Microvasculature-Embedding Porous Hydrogels for 3D Cell Culture. *2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS)*, 1–3. <https://doi.org/10.1109/MHS.2018.8886981>
- Huang, Y., & Meek, K. M. (1999). Swelling Studies on the Cornea and Sclera: The Effects of pH and Ionic Strength. *Biophysical Journal*, 77(3), 1655–1665. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77013-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77013-X)
- Hudson, S. M., & Jenkins, D. W. (2001). Chitin and Chitosan. In *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471440264.pst052>

- Ishak, N. S., Thng, C. S., & Marsilla, K. I. K. (2020). The effect of crosslinking agent on protein-based bioplastic from fish waste. *AIP Conference Proceedings*, 2267. <https://doi.org/10.1063/5.0016189>
- Islam, M. M., Buznyk, O., Reddy, J. C., Pasychnikova, N., Alarcon, E. I., Hayes, S., Lewis, P., Fagerholm, P., He, C., Iakymenko, S., Liu, W., Meek, K. M., Sangwan, V. S., & Griffith, M. (2018). Biomaterials-enabled cornea regeneration in patients at high risk for rejection of donor tissue transplantation. *Npj Regenerative Medicine*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0038-8>
- Islam, M. M., Ravichandran, R., Olsen, D., Ljunggren, M. K., Fagerholm, P., Lee, C. J., Griffith, M., & Phopase, J. (2016). Self-assembled collagen-like-peptide implants as alternatives to human donor corneal transplantation. *RSC Advances*, 6(61), 55745–55749. <https://doi.org/10.1039/c6ra08895c>
- Iyer, G., Srinivasan, B., Agarwal, S., Talele, D., Rishi, E., Rishi, P., Krishnamurthy, S., Vijaya, L., Subramanian, N., & Somasundaram, S. (2018). Keratoprosthesis: Current global scenario and a broad Indian perspective. *Indian Journal of Ophthalmology*, 66(5), 620–629. https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_22_18
- James, S. L., Abate, D., Abate, K. H., Abay, S. M., Abbafati, C., Abbasi, N., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdela, J., Abdelalim, A., Abdollahpour, I., Abdulkader, R. S., Abebe, Z., Abera, S. F., Abil, O. Z., Abraha, H. N., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Accrombessi, M. M. K., ... Murray, C. J. L. (2018). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*, 392(10159), 1789–1858. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32279-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32279-7)

- Jester, J. V. (2008). Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(2), 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.09.015>
- Jhanji, V., Sharma, N., & Vajpayee, R. B. (2011). Management of keratoconus: current scenario. *British Journal of Ophthalmology*, 95(8), 1044–1050. <https://doi.org/10.1136/bjo.2010.185868>
- Karmakar, S., Manna, S., Kabiraj, S., & Jana, S. (2022). Recent progress in alginate-based carriers for ocular targeting of therapeutics. *Food Hydrocolloids for Health*, 2, 100071. <https://doi.org/10.1016/j.fhfh.2022.100071>
- Kato, M., Taguchi, T., & Kobayashi, H. (2007). An Attempt to Construct the Stroma of Cornea Using Primary Cultured Corneal Cells. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 748–751. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.518>
- Kaur, J. (2018). Osteo-odonto keratoprosthesis: Innovative dental and ophthalmic blending. *The Journal of Indian Prosthodontic Society*, 18(2), 89. https://doi.org/10.4103/jips.jips_283_17
- Khosravimelal, S., Mobaraki, M., Eftekhari, S., Ahearne, M., Seifalian, A. M., & Gholipourmalekabadi, M. (2021). Hydrogels as Emerging Materials for Cornea Wound Healing. *Small*, 17(30), 2006335. <https://doi.org/10.1002/smll.202006335>
- Kilic Bektas, C., & Hasirci, V. (2018). Mimicking corneal stroma using keratocyte-loaded photopolymerizable methacrylated gelatin hydrogels. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(4), e1899–e1910. <https://doi.org/10.1002/term.2621>
- Kim, Y. H., Baek, N. S., Han, Y. H., Chung, M.-A., & Jung, S.-D. (2011). Enhancement of neuronal cell adhesion by covalent binding of poly-d-

- lysine. *Journal of Neuroscience Methods*, 202(1), 38–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.08.036>
- Kling, S., & Hafezi, F. (2017). Corneal biomechanics – a review. *Ophthalmic and Physiological Optics*, 37(3), 240–252.
<https://doi.org/10.1111/opo.12345>
- Kostyuk, O., Nalovina, O., Mubard, T. M., Regini, J. W., Meek, K. M., Quantock, A. J., Elliott, G. F., & Hodson, S. A. (2002). Transparency of the bovine corneal stroma at physiological hydration and its dependence on concentration of the ambient anion. *Journal of Physiology*, 543(2), 633–642. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.021527>
- Kurita, K., Kamiya, M., & Nishimura, S.-I. (1991). Solubilization of a rigid polysaccharide: Controlled partial N-Acetylation of chitosan to develop solubility. *Carbohydrate Polymers*, 16(1), 83–92.
[https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90072-K](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90072-K)
- Lai, J.-Y. (2013). Corneal Stromal Cell Growth on Gelatin/Chondroitin Sulfate Scaffolds Modified at Different NHS/EDC Molar Ratios. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 2036–2055.
<https://doi.org/10.3390/ijms14012036>
- Langer, R., & Vacanti, J. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lee, K. B., Kim, M. K., Kim, M. J., Ahn, S. II, & Hwang, Y. H. (2016). The Path to Glaucoma Diagnosis. *Journal of the Korean Ophthalmological Society*, 57(5), 794. <https://doi.org/10.3341/jkos.2016.57.5.794>
- Lee, W., Miyagawa, Y., Long, C., Cooper, D. K. C., & Hara, H. (2014). A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity. *International Journal of Ophthalmology*, 7(4), 587–58793.
<https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2014.04.01>

- Lenk, J., Haustein, M., Terai, N., Spoerl, E., & Raiskup, F. (2016). Characterization of Ocular Biomechanics in Pellucid Marginal Degeneration. *Cornea*, 35(4), 506–509. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000781>
- Li, L., Zhao, H., Ni, N., Wang, Y., Gao, J., Gao, Q., Zhang, Y., & Zhang, Y. (2022). Study on the origin of linear deviation with the Beer-Lambert law in absorption spectroscopy by measuring sulfur dioxide. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 275, 121192. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121192>
- Li, M., Wei, R., Liu, C., Fang, H., Yang, W., Wang, Y., Xian, Y., Zhang, K., He, Y., & Zhou, X. (2023). A “T.E.S.T.” hydrogel bioadhesive assisted by corneal cross-linking for in situ sutureless corneal repair. *Bioactive Materials*, 25, 333–346. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.006>
- Lin, C. C., Ritch, R., Lin, S. M., Ni, M. H., Chang, Y. C., Lu, Y. L., Lai, H. J., & Lin, F. H. (2010). A new fish scale-derived scaffold for corneal regeneration. *European Cells and Materials*, 19, 50–57. <https://doi.org/10.22203/eCM.v019a06>
- Lončarević, A., Ivanković, M., & Rogina, A. (2017). Lysozyme-Induced Degradation of Chitosan: The Characterisation of Degraded Chitosan Scaffolds. *Journal of Tissue Repair and Regeneration*, 1(1), 12–22. <https://doi.org/10.14302/issn.2640-6403.jtrr-17-1840>
- Ma, J., Wang, Y., Wei, P., & Jhanji, V. (2018). Biomechanics and structure of the cornea: implications and association with corneal disorders. *Survey of Ophthalmology*, 63(6), 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2018.05.004>
- Ma, X. Y., Zhang, Y., Zhu, D., Lu, Y., Zhou, G., Liu, W., Cao, Y., Zhang, W. J., & Ljubimov, A. V. (2015). Corneal stroma regeneration with acellular corneal

- stroma sheets and keratocytes in a rabbit model. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132705>
- Ma, Y., Poole, K., Goyette, J., & Gaus, K. (2017). Introducing Membrane Charge and Membrane Potential to T Cell Signaling. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01513>
- Mahdy, A., Helal, R. H., Abdel Moneam, Y. K., & Senna, M. M. H. (2022). Electron beam radiation synthesis of hydrogel based on biodegradable starch/ poly(ethylene oxide) (ST/PEO) blend and its application in controlled release of parasitic worm's drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *74*, 103531. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103531>
- Maihemuti, A., Zhang, H., Lin, X., Wang, Y., Xu, Z., Zhang, D., & Jiang, Q. (2023). 3D-printed fish gelatin scaffolds for cartilage tissue engineering. *Bioactive Materials*, *26*, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.02.007>
- Mannis, M. J., & Holland, E. J. (2017). *Cornea Fundamentals, Diagnosis and Management* (4th ed.). Elsevier.
- Martínez-Plaza, E., López-Miguel, A., Holgueras, A., Barraquer, R. I., Alió, J. L., & Maldonado, M. J. (2020). Phakic intraocular lenses: Recent advances and innovations. *Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)*, *95*(4), 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.oftale.2020.02.001>
- Matei, A., Puscas, C., Patrascu, I., Lehene, M., Ziebro, J., Scurtu, F., Baia, M., Porumb, D., Totos, R., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2020). Stability of Glutaraldehyde in Biocide Compositions. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(9), 3372. <https://doi.org/10.3390/ijms21093372>
- Mathews, P. M., Lindsley, K., Aldave, A. J., & Akpek, E. K. (2018). Etiology of global corneal blindness and current practices of corneal transplantation:

- A focused review. *Cornea*, 37(9), 1198–1203.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001666>
- Matthyssen, S., Van den Bogerd, B., Dhubhghaill, S. N., Koppen, C., & Zakaria, N. (2018). Corneal regeneration: A review of stromal replacements. *Acta Biomaterialia*, 69, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.01.023>
- Meek, K. M., & Knupp, C. (2015). Corneal structure and transparency. *Progress in Retinal and Eye Research*, 49, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.001>
- Menzies, K. L., & Jones, L. (2010). The Impact of Contact Angle on the Biocompatibility of Biomaterials. *Optometry and Vision Science*, 87(6), 387–399. <https://doi.org/10.1097/OPX.0b013e3181da863e>
- Merk. (2023). *Productos Merck*. <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es>
- Mescher, A. L. (2018). *Junqueira's Basic Histology text and atlas* (M.-H. Education, Ed.; 15th ed.). McGraw-Hill Education.
- Mimura, T., Amano, S., Yokoo, S., Uchida, S., Yamagami, S., Usui, T., Kimura, Y., & Tabata, Y. (2008). Tissue engineering of corneal stroma with rabbit fibroblast precursors and gelatin hydrogels. *Molecular Vision*, 14, 1819–1828.
- Minsal. (2017). *Datos Donantes Órganos y Trasplantes Enero-Diciembre 2017*. <https://www.minsal.cl/donacion-y-trasplantes-de-organos-y-tejidos/>
- Montés-Micó, R. (2011). Estado refractivo del ojo y desarrollo de las ametropías. In *Optimetría Principios básicos y aplicación clínica* (pp. 3–19). Elsevier España.
- Moore, K. L., Dalley, A. F., & Agur, A. M. (2017). Cabeza. In *Anatomía con orientación clínica* (8th ed., pp. 1487–1756). Wolters Kluwer.
- Moshirfar, M., Desautels, J. D., Walker, B. D., Murri, M. S., Orry, ;, Birdsong, C., & Hoopes, P. C. (2018). Mechanisms of Optical Regression Following

- Corneal Laser Refractive Surgery: Epithelial and Stromal Responses. *Medical Hypothesis Discovery & Innovation Ophthalmology Journal*, 7(1).
- Myron Yanoff & Jay S. Duker. (2014). *Ophthalmology, Fourth Edition- Myron Yanoff & Jay S. Duker*.
- Naroo, S. A., & Bilkhu, P. S. (2016). Clinical utility of the KAMRA corneal inlay. *Clinical Ophthalmology*, 913. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S89132>
- Niu, X., Li, N., Du, Z., & Li, X. (2023). Integrated gradient tissue-engineered osteochondral scaffolds: Challenges, current efforts and future perspectives. In *Bioactive Materials* (Vol. 20, pp. 574–597). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.06.011>
- Nuijts, R. M. M. A., Doors, M., Tahzib, N. G., & Cruysberg, L. P. J. (2010). Refractive Surgery and Inlays. In *Encyclopedia of the Eye* (pp. 9–14). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374203-2.00064-6>
- OriGene Technologies Inc. (2023). *Collagen I (COL1A1) (NM_000088) Human Recombinant Protein*. https://www.origene.com/catalog/proteins/recombinant-proteins/tp790158/collagen-i-col1a1-nm_000088-human-recombinant-protein
- Orwin, E. J., Borene, M. L., & Hubel, A. (2003). Biomechanical and Optical Characteristics of a Corneal Stromal Equivalent¹. *Journal of Biomechanical Engineering*, 125(4), 439–444. <https://doi.org/10.1115/1.1589773>
- Ou, A., & Bo, I. (2017). Chitosan Hydrogels and their Glutaraldehyde-Crosslinked Counterparts as Potential Drug Release and Tissue Engineering Systems - Synthesis, Characterization, Swelling Kinetics and Mechanism. *Journal of Physical Chemistry & Biophysics*, 07(03). <https://doi.org/10.4172/2161-0398.1000256>

- Ozcelik, B., Brown, K. D., Blencowe, A., Daniell, M., Stevens, G. W., & Qiao, G. G. (2013). Ultrathin chitosan-poly(ethylene glycol) hydrogel films for corneal tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6594–6605. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.020>
- Paredes-Puerto. (2016). *Colágenas Recombinantes para Andamios de Ingeniería de Tejidos* [Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica]. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.7>
- Patel, S., & Tutchenko, L. (2019). The refractive index of the human cornea: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 42(5), 575–580. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2019.04.018>
- Perez, E. P., Merrill, E. W., Miller, D., & Cima, L. G. (1995). Corneal Epithelial Wound Healing on Bilayer Composite Hydrogels. *Tissue Engineering*, 1(3), 263–277. <https://doi.org/10.1089/ten.1995.1.263>
- Pérez Parra, Z., Jareño Ochoa, M., Fernández García, K., Casas Arias, X., Noriega Martínez, J., & Fuentes González, M. (2020). Seguridad de la queratoplastia lamelar anterior profunda versus queratoplastia penetrante en el tratamiento del queratocono. *Revista Cubana de Oftalmología*, 33(1), 1–10.
- Peris-Martínez, C., García-Domene, M. C., Penadés, M., Luque, M. J., Fernández-López, E., & Artigas, J. M. (2021). Spectral transmission of the human corneal layers. *Journal of Clinical Medicine*, 10(19), 1–11. <https://doi.org/10.3390/jcm10194490>
- Pezeshkpour, P., van der Wijngaart, W., & Herland, A. (2021). Multidirectional Lithography of Cell-Laden Hydrogels. *2021 21st International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers)*, 908–911. <https://doi.org/10.1109/Transducers50396.2021.9495694>
- Porcar, E., España, E., Montalt, J. C., Benlloch-Fornés, J. I., & Peris-Martínez, C. (2017). Post-LASIK Visual Quality With a Corneoscleral Contact Lens

- to Treat Irregular Corneas. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 43(1), 46–50. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000231>
- Porth, J. M., Deiotte, E., Dunn, M., & Bashshur, R. (2019). A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. *Cornea*, 38(12), 1602–1609. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002122>
- Rasmussen, K.-E., & Albrechtsen, J. (1974). Glutaraldehyde. The Influence of pH, Temperature, and Buffering on the Polymerization Rate. In *Histochemistry* (Vol. 38). Springer-Verlag.
- Ratanavaraporn, J., Damrongsakkul, S., Sanchavanakit, N., Banaprasert, T., & Kanokpanont, S. (2006). Comparison of Gelatin and Collagen Scaffolds for Fibroblast Cell Culture. In *Journal of Metals, Materials and Minerals* (Vol. 16).
- Reis, H. R., & Gilsonkhong, A. (2019). *Advances in Experimental Medicine and Biology 1250 Biomimicked Biomaterials Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <http://www.springer.com/series/5584>
- René Moreno, N., Miguel Srur, A., & Carlos Nieme, B. (2010). Cirugía refractiva: indicaciones, técnicas y resultados. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 21(6), 901–910. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70614-3](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70614-3)
- Rennie, I. G., & Parsons, M. A. (1981). Lysozyme Distribution in Human Lacrimal Glands and Other Ocular Adnexa. *Archives of Ophthalmology*, 99(10), 1850–1853. <https://doi.org/10.1001/archopht.1981.03930020724020>
- Rich, H., Odlyha, M., Cheema, U., Mudera, V., & Bozec, L. (2014). Effects of photochemical riboflavin-mediated crosslinks on the physical properties of collagen constructs and fibrils. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(1), 11–21. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-5038-7>

- Rinaudo, M., Pavlov, G., & Desbrières, J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40(25), 7029–7032. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(99\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(99)00056-7)
- Romo-Valera, C., Guerrero, P., Arluzea, J., Etxebarria, J., de la Caba, K., & Andollo, N. (2021). Cytocompatibility and Suitability of Protein-Based Biomaterials as Potential Candidates for Corneal Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3648. <https://doi.org/10.3390/ijms22073648>
- Sadler, T. W., & Langman, J. (2019). *Langman Embriología médica* (14th ed.). Wolters Kluwer.
- Salles, T. H. C., Lombello, C. B., & D'Ávila, M. A. (2015). Electrospinning of Gelatin/Poly (Vinyl Pyrrolidone) Blends from Water/Acetic Acid Solutions. *Materials Research*, 18(3), 509–518. <https://doi.org/10.1590/1516-1439.310114>
- Salmon, J. F. (2020). Kanski's Clinical Ophthalmology A Systematic approach. In *British Journal of Ophthalmology* (9th ed.). Elsevier Ltd.
- Saraswathy, M., Krishnaswami, V., & Ragini, D. D. (2021). Biomaterials for Hard Tissue Engineering: Concepts, Methods, and Applications. In *Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (pp. 347–380). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0002-9_10
- Saßmannshausen, M., & Ach, T. (2022). Einfluss von ultravioletter Strahlung auf die Netzhaut. *Der Ophthalmologe*, 119(3), 240–247. <https://doi.org/10.1007/s00347-021-01506-1>
- Scott McCall, A., Kraft, S., Edelhauser, H. F., Kidder, G. W., Lundquist, R. R., Bradshaw, H. E., Dedeic, Z., Dionne, M. J. C., Clement, E. M., & Conrad, G. W. (2010). Mechanisms of corneal tissue cross-linking in response to treatment with topical riboflavin and Long-Wavelength Ultraviolet

- Radiation (UVA). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(1), 129–138. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3738>
- Seiler, T. G., Shao, P., Frueh, B. E., Yun, S.-H., & Seiler, T. (2018). The influence of hydration on different mechanical moduli of the cornea. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 256(9), 1653–1660. <https://doi.org/10.1007/s00417-018-4069-7>
- Severinsky, B., Behrman, S., Frucht-Pery, J., & Solomon, A. (2014). Scleral contact lenses for visual rehabilitation after penetrating keratoplasty: Long term outcomes. *Contact Lens and Anterior Eye*, 37(3), 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.clae.2013.11.001>
- Sitterley, G. (2008). *Poly-lysine*.
- Spizzirri, G., Cirillo, G., Parisi, O., & Iemma, F. (2012). *HYDROGELS SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS* (F. V. Camara & L. J. Ferreira, Eds.; 1st ed., Vol. 1). Nova Science Publishers, Inc.
- Su, L., Huang, J., Li, H., Pan, Y., Zhu, B., Zhao, Y., & Liu, H. (2021). Chitosan-riboflavin composite film based on photodynamic inactivation technology for antibacterial food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 172, 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.056>
- Taboada, G. M., Yang, K., Pereira, M. J. N., Liu, S. S., Hu, Y., Karp, J. M., Artzi, N., & Lee, Y. (2020). Overcoming the translational barriers of tissue adhesives. *Nature Reviews Materials*, 5(4), 310–329. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0171-7>
- Tanaka, I., Nishinomiya, R., Goto, R., Shimazaki, S., & Chatake, T. (2021). Recent structural insights into the mechanism of lysozyme hydrolysis. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 77(3), 288–292. <https://doi.org/10.1107/S2059798321000346>

- Taneri, S., Kiessler, S., Rost, A., Schultz, T., & Dick, H. B. (2018). Flap Melting Over Corneal Inlay for Hyperopic Correction. *Journal of Refractive Surgery*, 34(11), 775–778. <https://doi.org/10.3928/1081597X-20180823-01>
- Tarsitano, M., Cristiano, M. C., Fresta, M., Paolino, D., & Rafaniello, C. (2022). *Alginate-Based Composites for Corneal Regeneration : The Optimization of a Biomaterial to Overcome Its Limits*. 1–23.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2023). *Poli-D-lisina*. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A3890401?SID=srch-srp-A3890401>
- Thermo Scientific. (2023). *Instructions NHS and Sulfo-NHS*. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0011309_NHS_SulfoNHS_UG.pdf
- Tian, Z., Liu, W., & Li, G. (2016). The microstructure and stability of collagen hydrogel cross-linked by glutaraldehyde. *Polymer Degradation and Stability*, 130, 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2016.06.015>
- Tiffany, J. M. (2009). Measurement of wettability of the corneal epithelium. *Acta Ophthalmologica*, 68(2), 182–187. <https://doi.org/10.1111/j.1755-3768.1990.tb01901.x>
- Tonsomboon, K., Strange, D. G. T., & Oyen, M. L. (2013). Gelatin nanofiber-reinforced alginate gel scaffolds for corneal tissue engineering. *2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC)*, 6671–6674. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6611086>
- Tutchenko, L., Patel, S., Horak, O., Sanin, V., & Kosuba, S. (2018). Effect of Cataract Surgery on the Refractive Index of the Cornea Estimated by

Optical Pachymetry. *Cornea*, 37(11), 1414–1420.
<https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001679>

Van Cruchten, S., Vrolyk, V., Perron Lepage, M. F., Baudon, M., Voute, H., Schoofs, S., Haruna, J., Benoit-Biancamano, M. O., Ruot, B., & Allegaert, K. (2017). Pre- and Postnatal Development of the Eye: A Species Comparison. *Birth Defects Research*, 109(19), 1540–1567.
<https://doi.org/10.1002/bdr2.1100>

Vance, T., & Gordon, M. (1994). Use of the Excimer Laser in Refractive Surgery. *Seminars in Ophthalmology*, 9(2), 91–96.
<https://doi.org/10.3109/08820539409060000>

Vijayaraghavan, K., & Seyed, M. (2018). Physicochemical Characterization and Bioactivity of an Improved Chitosan Scaffold Cross-Linked With Polyvinyl Alcohol for Corneal Tissue Engineering Applications. *Annual Research & Review in Biology*, 24(6), 1–16.
<https://doi.org/10.9734/arrb/2018/39648>

Vincent, S. J., & Fadel, D. (2019). Optical considerations for scleral contact lenses: A review. *Contact Lens and Anterior Eye*, 42(6), 598–613.
<https://doi.org/10.1016/j.clae.2019.04.012>

Waldron, K. C. (2004). *Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking*.
<https://doi.org/10.2144/3705A0790>

Wei, C., Feng, Y., Che, D., Zhang, J., Zhou, X., Shi, Y., & Wang, L. (2022). Biomaterials in skin tissue engineering. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 71(13), 993–1011.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2021.1933977>

Weisenthal, R., Daly, M., Freitas, D., Feder, R., Orlin, S., Tu, E., S., V., Verdier, D., & Ophthalmology, A. A. of. (2018). 2018-2019 Basic and Clinical

Science Course, Section 08: External Disease and Cornea. In *2018-2019 Basic and Clinical Science Course* (p. 335).

White, L. J., & Rose, F. R. A. J. (2014). Gelatin-Based Materials in Ocular Tissue Engineering. *Materials*, 7(4), 3106–3135. <https://doi.org/10.3390/ma7043106>

Willmann, D., Moshirfar, M., & Melanson, S. W. (2020). *Corneal Injury*. StatPearls Publishing. <https://europepmc.org/article/NBK/NBK459283#free-full-text>

Wilson, S. E. (2020a). Biology of keratorefractive surgery- PRK, PTK, LASIK, SMILE, inlays and other refractive procedures. *Experimental Eye Research*, 198, 108136. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108136>

Wilson, S. E. (2020b). Corneal wound healing. *Experimental Eye Research*, 197, 108089. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108089>

Wilson, S. L., Wimpenny, I., Ahearne, M., Rauz, S., El Haj, A. J., & Yang, Y. (2012). Chemical and topographical effects on cell differentiation and matrix elasticity in a corneal stromal layer model. *Advanced Functional Materials*, 22(17), 3641–3649. <https://doi.org/10.1002/adfm.201200655>

Wollensak, G., & Iomdina, E. (2009). Biomechanical and histological changes after corneal crosslinking with and without epithelial debridement. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 35(3), 540–546. <https://doi.org/10.1016/j.jcrs.2008.11.036>

World Health Organization. (2019). *Informe mundial sobre la visión*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331423/9789240000346-spa.pdf>

Wu, J., Du, Y., Mann, M. M., Yang, E., Funderburgh, J. L., & Wagner, W. R. (2013). Bioengineering Organized, Multilamellar Human Corneal Stromal Tissue by Growth Factor Supplementation on Highly Aligned Synthetic

- Substrates. *Tissue Engineering Part A*, 19(17–18), 2063–2075.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0545>
- Xiao, J., Duan, H., Liu, Z., Wu, Z., Lan, Y., Zhang, W., Li, C., Chen, F., Zhou, Q., Wang, X., Huang, J., & Wang, Z. (2011). Construction of the recellularized corneal stroma using porous acellular corneal scaffold. *Biomaterials*, 32(29), 6962–6971.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.084>
- Yáñez-Soto, B., Leonard, B. C., Raghunathan, V. K., Abbott, N. L., & Murphy, C. J. (2015). Effect of stratification on surface properties of corneal epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(13), 8340–8348. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17468>
- Yang, J., Bai, R., Chen, B., & Suo, Z. (2020). Hydrogel Adhesion: A Supramolecular Synergy of Chemistry, Topology, and Mechanics. *Advanced Functional Materials*, 30(2), 1901693.
<https://doi.org/10.1002/adfm.201901693>
- Yung, M. (2020). *Corneal Cross-Linking Protocols Made Easy: Tips for Ophthalmology Residents*. Eyes On Eyecare. <https://eyesoneyecare.com/resources/ophthalmology-corneal-crosslinking-protocols-made-easy/>
- Zagho, M. M., & Elzatahry, A. (2016). Recent Trends in Electrospinning of Polymer Nanofibers and their Applications as Templates for Metal Oxide Nanofibers Preparation. In *Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications*. InTech. <https://doi.org/10.5772/65900>
- Zhao, T., & Jiang, L. (2018). Contact angle measurement of natural materials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 161, 324–330.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.10.056>
- Zhong, S. P., Teo, W. E., Zhu, X., Beuerman, R., Ramakrishna, S., & Yung, L. Y. L. (2007). Development of a novel collagen–GAG nanofibrous scaffold

via electrospinning. *Materials Science and Engineering: C*, 27(2), 262–266. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2006.05.010>

Zhou, C., Heath, D. E., Sharif, A. R. M., Rayatpisheh, S., Oh, B. H. L., Rong, X., Beuerman, R., & Chan-Park, M. B. (2013). High Water Content Hydrogel With Super High Refractive Index. *Macromolecular Bioscience*, 13(11), 1485–1491. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300191>

Zuclich, J. A. (1989). Ultraviolet-induced Photochemical Damage in Ocular Tissues. *Health Physics*, 56(5), 671–682. <https://doi.org/10.1097/00004032-198905000-00012>

Zvorničanin, J., & Zvorničanin, E. (2018). Premium intraocular lenses: The past, present and future. *Journal of Current Ophthalmology*, 30(4), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.joco.2018.04.003>

SOLO USO ACADÉMICO

SOLO USO ACADÉMICO

Imágenes Complementarias

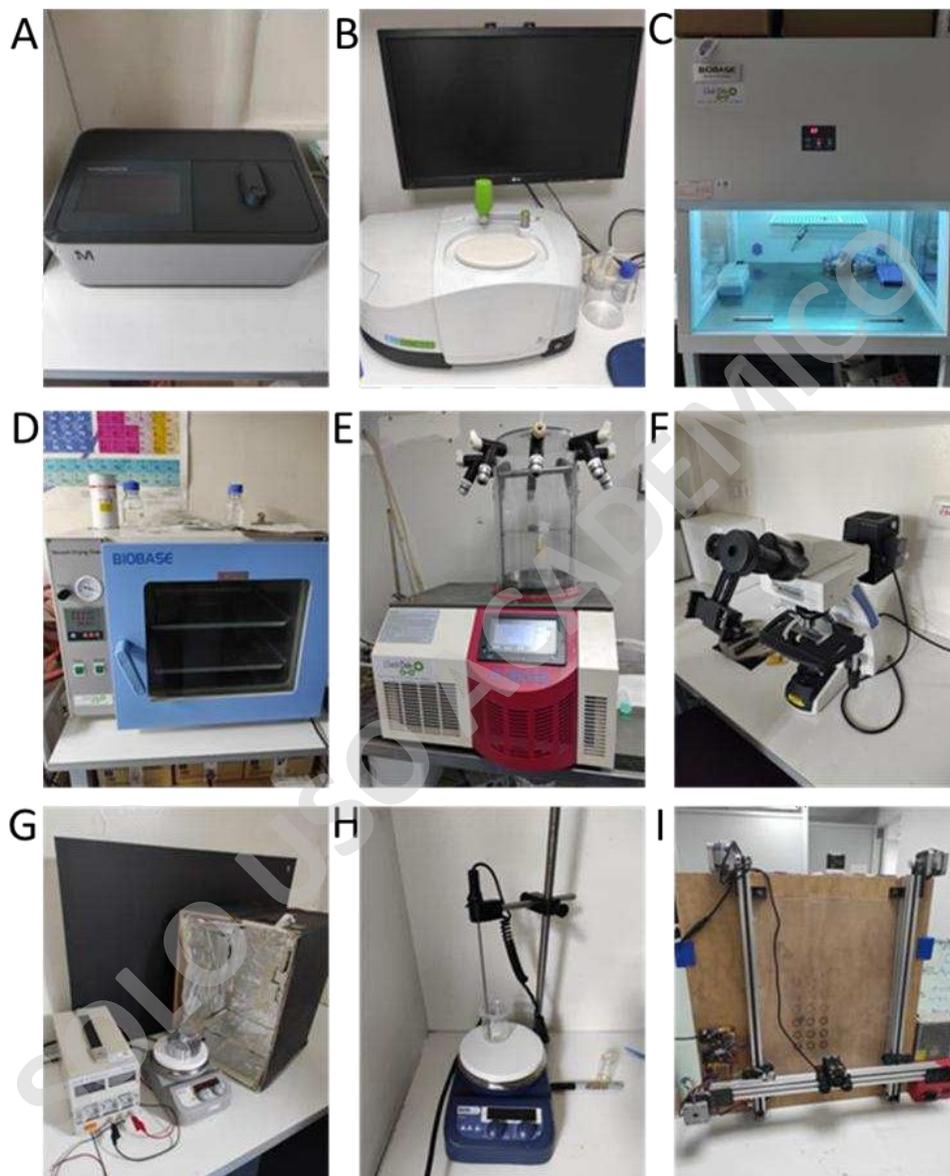
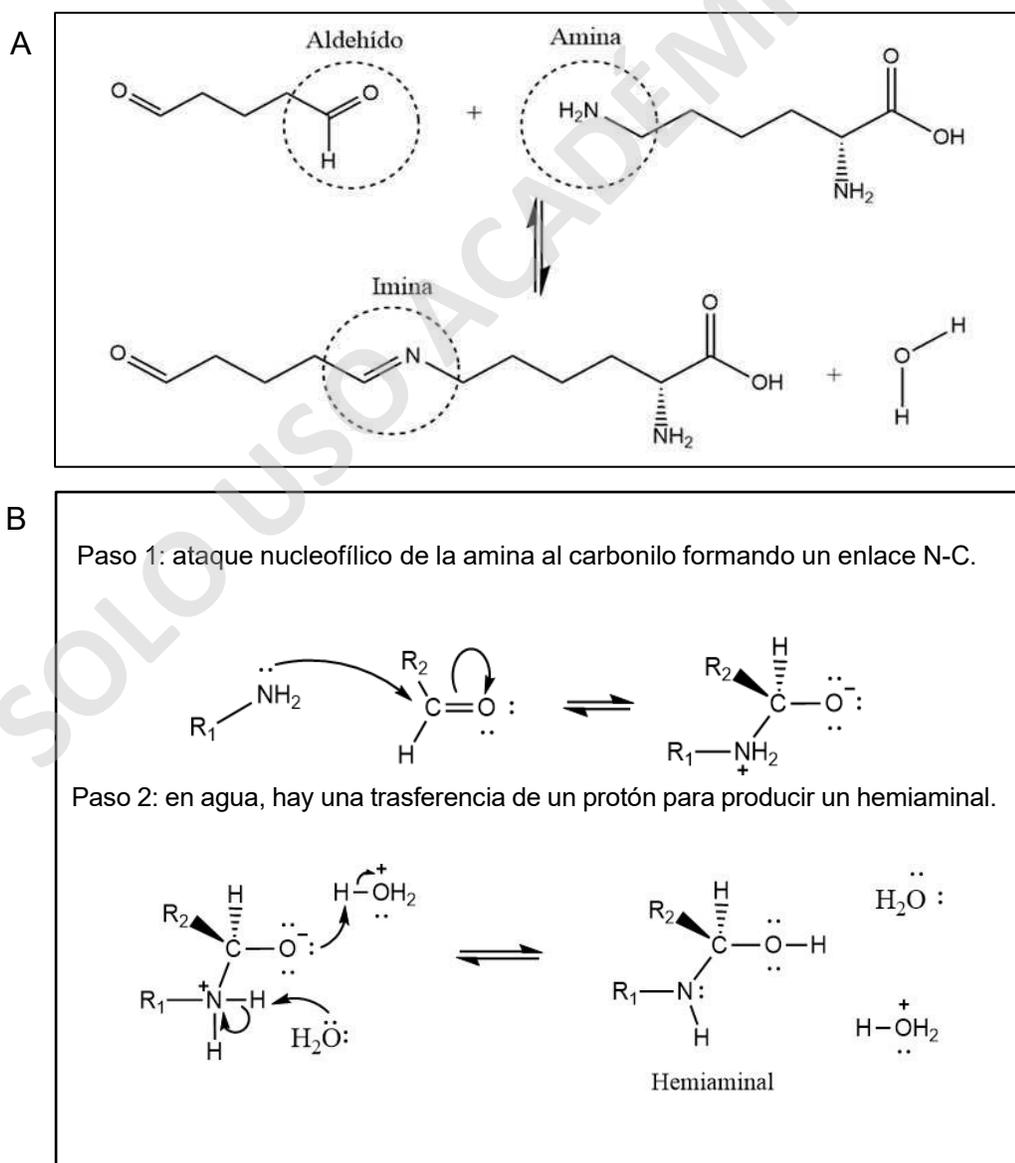


Figura A1. Equipamiento utilizado. A: eEspectrofotómetro UV-vis; B: espectrofotómetro IR; C: campana; D: estufa de vacío; E: liofilizador; F: microscopio de campo claro; G: Cámara de radiación UV; H: placa calefactora con agitador magnético; I: CNC láser. Elaboración propia.

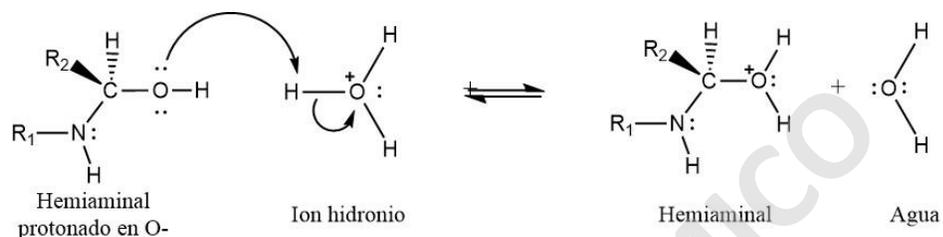
Esquema de la reticulación con glutaraldehído

La Figura A2 muestra el esquema que detalla los pasos involucrados en el proceso de reticulación con glutaraldehído con gelatina, quitosano y poli-D-lisina, utilizando como ejemplo la reacción entre, un grupo aldehído del glutaraldehído y la amina del péptido lisina.

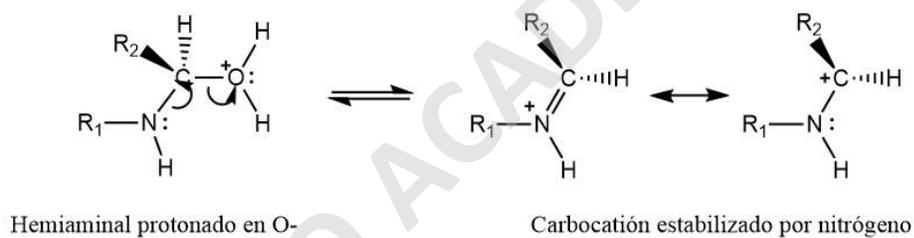
Figura A2. Esquema de la reacción entre las aminas y aldehídos. Esta reacción gobierna la reticulación de los precursores gelatina, quitosano y Poli-D-lisina por medio de glutaraldehído. En A un esquema resumido de la reacción y en B un esquema completo con los 5 pasos que involucran la reacción. Modificado de *Química Orgánica*, novena edición (p. 709) por Carey y Giuliano, Mc Graw Hill Education.



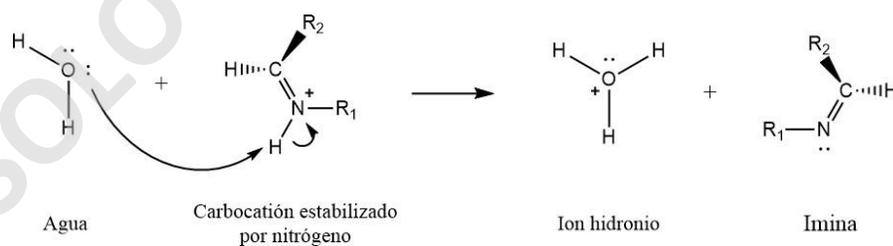
Paso 3: deshidratación que comienza con la protonación del hemiaminal en



Paso 4: el hemiaminal protonado pierde agua para formar un carbocatión.



Paso 5: el carbocatión es el ácido conjugado de la imina. La transferencia de un protón al agua forma la imina



Imágenes de los constructos trilaminares

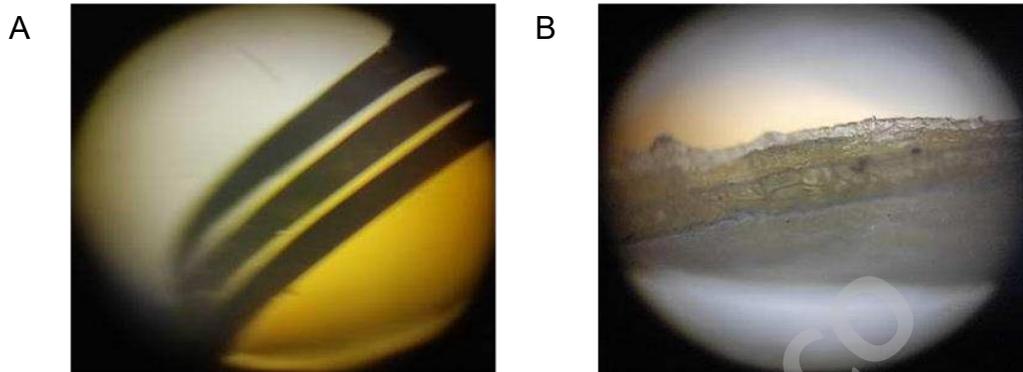


Figura A4. Microscopías de campo claro de hidrogel trilaminar. En la fotografía A un hidrogel trilaminar hidratado y en la fotografía B el mismo hidrogel trilaminar liofilizado. Elaboración propia.

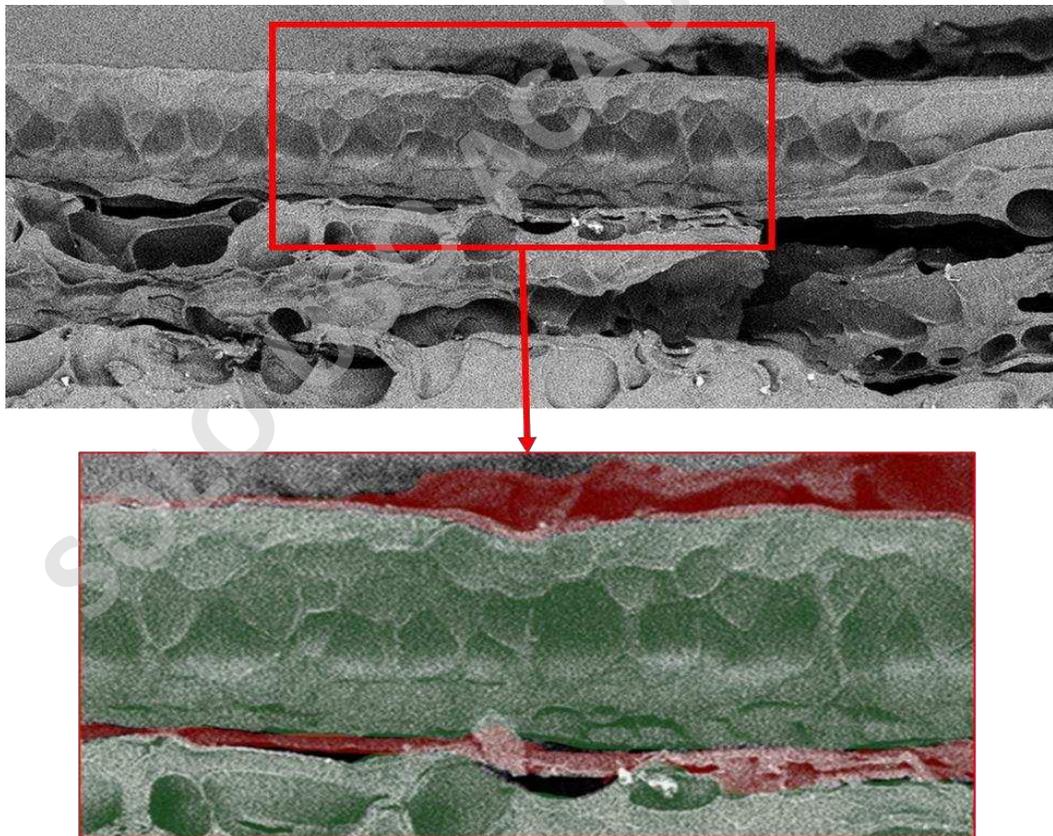


Figura A3. Microscopía SEM de hidrogel trilaminar destacando adhesivo y adherente. Arriba una sección transversal que muestra los detalles del hidrogel y el adhesivo. Abajo, el recuadro destaca en color rojo el adhesivo sobre y entre láminas (adherentes) de color verde. Elaboración propia.

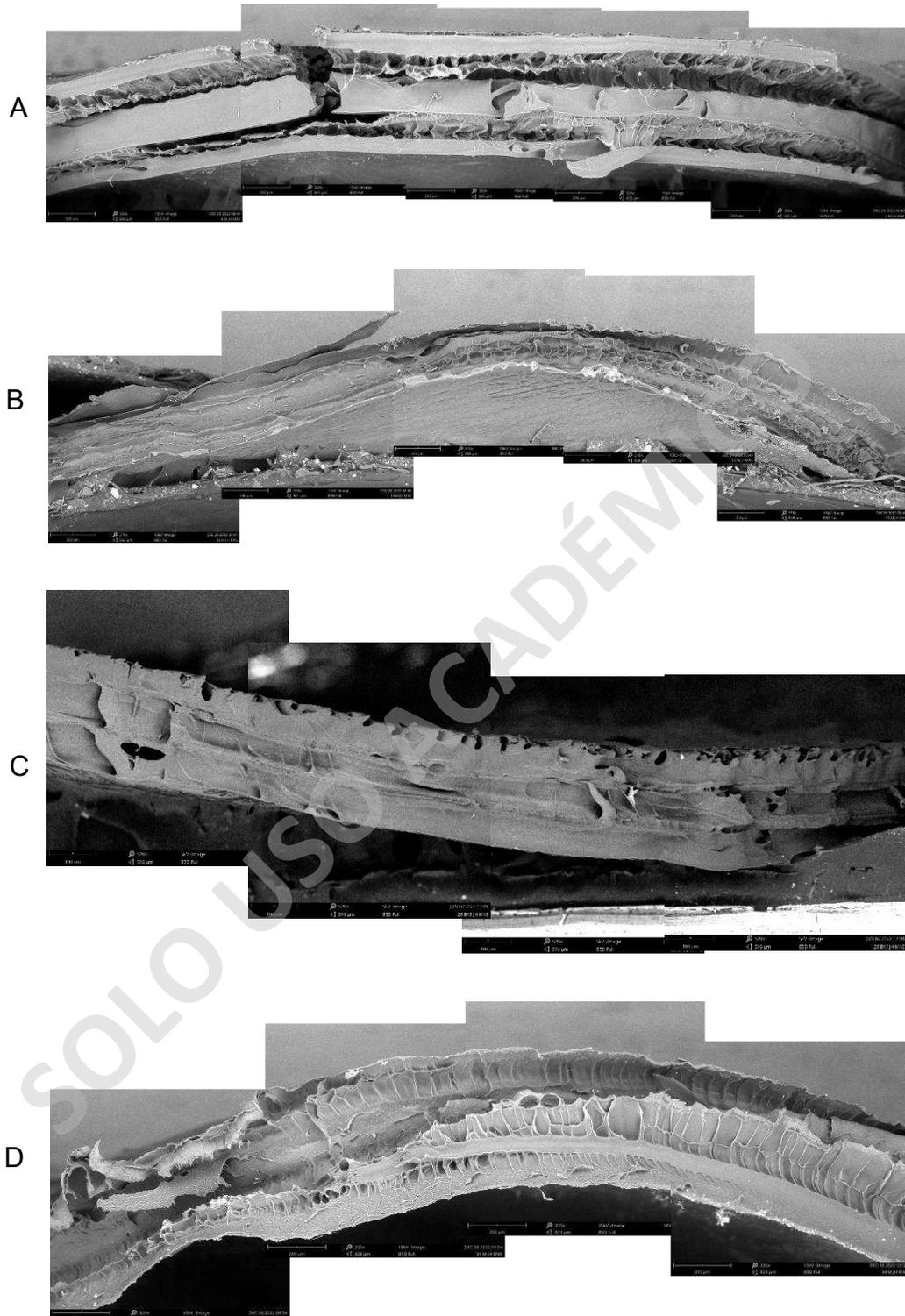


Figura A5. Microscopía SEM de hidrogel trilaterales elaborados. Formulación 4 en A; formulación 10 en B; formulación 28 en C y formulación 34 en D. Elaboración propia.

Estructuras moleculares, protonación y solubilidad de alginato y quitosano.

Las estructuras moleculares de los precursores alginato y quitosano fueron los polisacáridos pensados inicialmente para construir la estructura de nuestro material de interés. En las primeras disoluciones, el alginato y el quitosano se observaron precipitados; para el alginato en solución ácida y para el quitosano en solución neutra. Parte de la explicación de esos resultados se atribuyó al estado de protonación adquirido por el quitosano al abstraer un protón de un ion hidronio de la solución ácida. Para representar gráficamente esos cambios se utilizó el software MarvinSketch v.23.5. Este software, nos permitió mediante algoritmos de simulación preestablecidos, conocer los estados de protonación y crear una curva de solubilidad en función del pH para alginato y quitosano. Para el caso del alginato, su estructura muestra sus grupos carboxilo en su configuración de ion carboxilato (Figura A6 A) en solución acuosa a pH 7.4. Al reducir el valor del pH en la simulación a 2.2, algunos carboxilos se protonan al abstraer protones del hidronio circundante (Figura A6 B). La solubilidad del alginato en función del pH de la disolución es graficada en la Figura A6 C. En dicha gráfica la baja solubilidad alcanzada del alginato se corresponde con los precipitados hallados en la disolución de ácido acético. De igual forma, la Figura A7 contiene las estructuras para el quitosano a pH 7.4 (Figura A7 A), estructura protonada a pH 2.2 (Figura A7 B) junto a su curva de solubilidad (Figura A7 C).

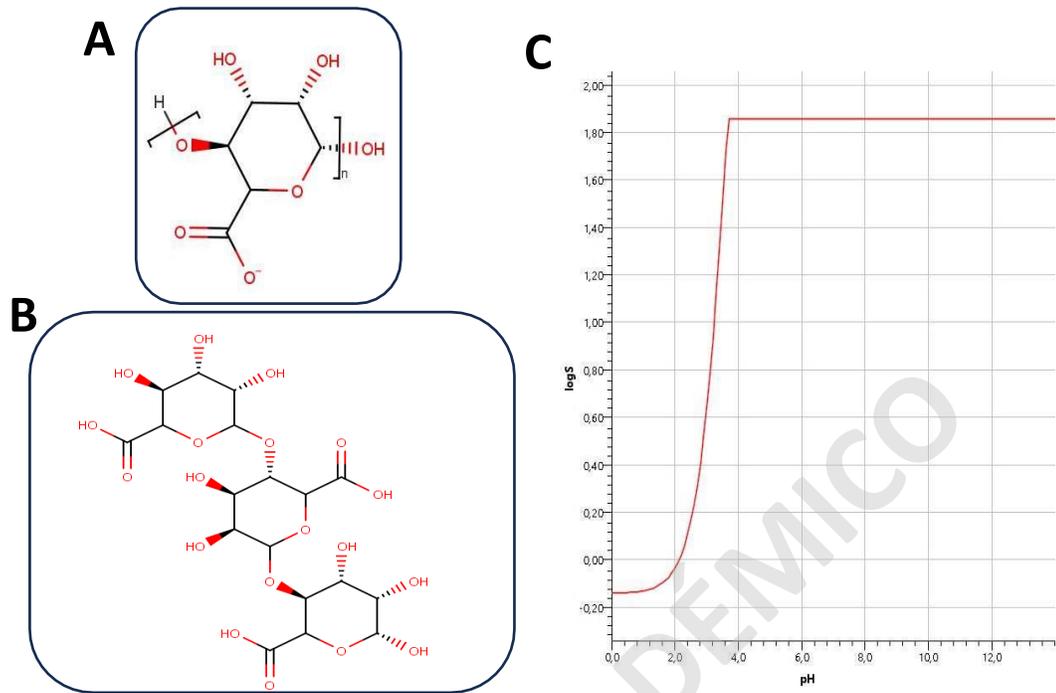


Figura A 6. Alginato, estructura (A), estado de protonación a pH 2.2 (B) y curva de solubilidad (C).

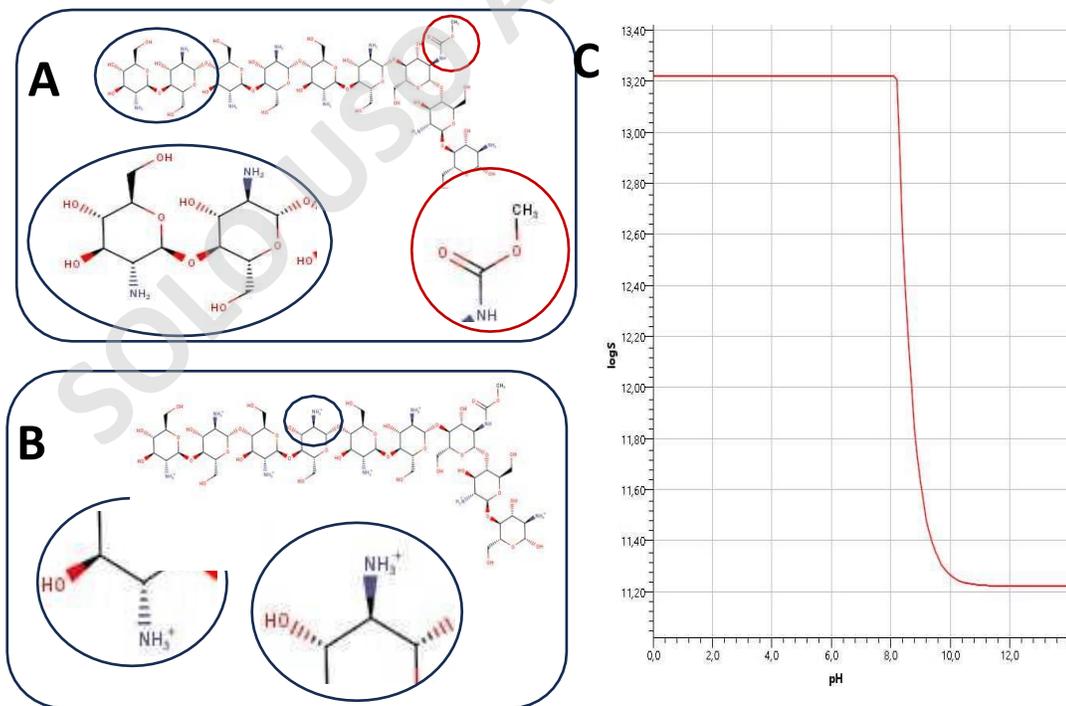


Figura A 7. Quitosano, estructura (A), estado de protonación a pH 2.2 (B) y curva de solubilidad (C)

Consentimiento informado

Por medio de una colaboración fue posible conseguir algunas caracterizaciones de tejido corneal humano. Este, correspondía a un remanente quirúrgico donado para investigación. La Figura A8 tiene la fotografía del Consentimiento Informado compartida por la colaboración de Fallon García, Magister Ciencias Médicas mención Biología Celular y Biología Molecular de la Universidad de Valparaíso.

ISV
RED OFTALMOLÓGICA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

En Viña Del Mar, Clínica Oftalmológica ISV a la fecha de 27 Julio del 2022.

1. Este estudio que se realizará se titula: "Caracterización de sustitutos corneales generados a partir de hidrogeles multilaminares".
2. El propósito de este estudio es proponer un protocolo de procesamiento morfométrico para la fabricación de sustitutos corneales.
3. Se solicita la donación de remanente corneal nativo para el estudio de este mediante técnicas histológicas a realizar en laboratorio de morfología de la Universidad de Valparaíso.

YO Cristina Rojas Velazquez Rut: 9.268347-8

Autorizo a los profesionales de la Clínica para utilizar remanente corneal para fines de investigación y/o análisis estadísticos.

[Firma] Firma paciente
[Firma] Firma Médico responsable
[Firma] Firma Tecnólogo Médico responsable

4 Norte # 1330, esq. 6 Oriente, Viña del Mar
Call Center (32) 238 0800 - www.redisv.cl

f i y t i n

Figura A 8 Consentimiento informado

SOLO USO ACADÉMICO