



**Universidad de Granada**  
*Facultad de Ciencias*  
*Departamento de Óptica*

# **Evaluación de las Propiedades Ópticas de un Modelo de Estroma Corneal Humano Artificial de Fibrina y Agarosa Generado por Ingeniería Tisular**

***Tesis Doctoral***

**Juan de la Cruz Cardona Pérez**  
*Diplomado en Óptica y Optometría*  
*Máster en Métodos y Técnicas Avanzadas en Física*

Granada, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Juan de la Cruz Cardona Pérez  
D.L.: GR 2963-2010  
ISBN: 978-84-693-2567-4





**Universidad de Granada**  
*Facultad de Ciencias*  
*Departamento de Óptica*

# **Evaluación de las Propiedades Ópticas de un Modelo de Estroma Corneal Humano Artificial de Fibrina y Agarosa Generado por Ingeniería Tisular**

Memoria que presenta el Diplomado en Óptica y Optometría  
y Máster en Métodos y Técnicas Avanzadas en Física

**Juan de la Cruz Cardona Pérez**  
para aspirar al título de Doctor.

***Fdo.: Juan de la Cruz Cardona Pérez***





**Universidad de Granada**  
*Facultad de Ciencias*  
*Departamento de Óptica*

## **Evaluación de las Propiedades Ópticas de un Modelo de Estroma Corneal Humano Artificial de Fibrina y Agarosa Generado por Ingeniería Tisular**

Los doctores María del Mar Pérez Gómez, Catedrática de Escuela Universitaria y perteneciente al Departamento de Óptica de la Universidad de Granada, y Miguel Alaminos Mingorance, Profesor Titular de Universidad y perteneciente al Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

Certifican:

Que el trabajo de investigación que recoge esta Memoria de Tesis Doctoral, titulada **“Evaluación de las Propiedades Ópticas de un Modelo de Estroma Corneal Humano Artificial de Fibrina y Agarosa Generado por Ingeniería Tisular”**, presentada por el Diplomado en Óptica y Optometría y Máster en Métodos y Técnicas Avanzadas en Física D. Juan de la Cruz Cardona Pérez, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Óptica y el Departamento de Histología de la Universidad de Granada.

**Vº Bº La Directora de Tesis**

**Vº Bº El Director de Tesis**

**Fdo. Dr. María del Mar Pérez Gómez**

*Catedrática de Escuela Univeritaria  
Departamento de Óptica  
Universidad de Granada*

**Fdo. Dr. Miguel Alaminos Mingorance**

*Titular de Universidad  
Departamento de Histología  
Universidad de Granada*



***A mi sobrino, Ignacio***

*A mis sobrinos, Gonzalo, Darío y...  
todos los que vendrán después.*



***“No hay Amor más grande que dar la vida por los demás” (Jn 15, 13)***

*Sirvan estas líneas de recuerdo y agradecimiento  
a todos los donantes de órganos y tejidos. Con  
su gran acto de bondad, regalan VIDA a  
completos desconocidos y permiten que se  
trabaje en investigación para conseguir que  
TODOS tengamos una vida mejor*



# Agradecimientos



Tras los buenos días transcurridos (y algún que otro malo) desde mi defensa de TIT y que, por casualidades de la vida, se cruzara en mi camino esta bellísima línea de trabajo, es un placer poder ahora agradecer cada mirada, sonrisa, gesto y palabra de ánimo y apoyo recibidas.

A mis directores de tesis. La profesora María del Mar Pérez Gómez, por todas las horas (y deshoras) de trabajo dedicadas y por permitirme ser uno más de su *Laboratorio de Óptica de Biomateriales*. Su consejo, apoyo, risas y confianza prestada hace que la considere mi “*Madre Física*”. El profesor Miguel Alaminos Mingorance, por su disponibilidad, entrega y sabios consejos. Su trabajo a todos los niveles en el desarrollo de esta Tesis dicen mucho de su valía como investigador y persona. El que me hayan abierto las puertas de sus laboratorios ha permitido que esa especie “rara” que todavía somos los ópticos-optometristas a los que nos interesa la investigación podamos desarrollar nuestro potencial, haciendo que multidisciplinariamente trabajemos áreas de conocimiento tan dispares como la Óptica, la Histología y la Oftalmología.

A todos los profesores y personal del Departamento de Óptica que me ha apoyado en todo momento, y en especial a su Director, el profesor Manuel Rubiño López, por su colaboración, asesoramiento, y cedernos las instalaciones e instrumentación del Departamento para parte de las medidas realizadas. De igual modo, agradecer a los anteriores directores del Departamento los profesores Enrique Hita Villaverde y Luís Jiménez del Barco Jaldo el permitirme colaborar y trabajar en diferentes investigaciones y proyectos llevados a cabo en el Departamento. También, mi reconocimiento y cariño a la profesora María Angustias Pérez Fernández, a la que considero mi “*Madre Optométrica*”. De ella he aprendido todo lo que sé de optometría y es la “simpática culpable” de introducirme en este mundo de la investigación. Finalmente, al profesor José Antonio Díaz Navas por el asesoramiento técnico recibido en todo momento.

A los componentes del *Laboratorio de Óptica de Biomateriales*, y especialmente a Ana M<sup>a</sup> Ionescu, “*Andutza*”, por tu ayuda y esa “cabecica” prodigiosa que tienes que tanto aporta. También a Razvan Ghinea, por venir de vuestra tierra para ayudarme en las últimas largas sesiones de medidas de 48 horas. A Laura Ugarte y Óscar Pecho, por acompañarme en alguna que otra sesión de toma de medidas hasta primeras horas de la madrugada. Y

cómo no, a la profesora Ana Yebra. No os olvidéis, *We do Science*, aquí o en cualquier otro sitio entre fogones, *“la Investigación da sed”*.

Al *Grupo de Investigación de Ingeniería Tisular*, en la persona del profesor Antonio Campos, por confiar en nuestro Grupo y en nuestro trabajo, y permitirnos hacer uso de sus laboratorios e instalaciones para esta Tesis Doctoral. A Ricardo (con el que hemos hecho pruebas de todo tipo a los constructos, excepto de su *saborcillo*), Deyanira, Renato, y en especial a Ingrid y Miguel “Chico”, por su contribución en el procesamiento de las muestras. He disfrutado y me he divertido cada día que subía a recoger y llevaros las muestras viendo lo bien que hacéis “esas cosas raras” que hacéis.

A mis amigos, Ángela y Mariano. Por esas llamadas, tapas y sobremesas, y en definitiva, hacerme partícipe de vuestra vida. Siempre habéis tenido en su momento una regañina constructiva o un amable consejo. A mis “políticos”, por interesarse en cada momento por mi trabajo, en especial a Raúl, que ha seguido mi andadura académica desde preescolar y yo su andadura mU2ical.

A mis hermanas. Serena, mi amiga. Espejo de lucha, tesón y superación. Violeta, por todas las noches de trabajos en las que me ayudaste que ahora han dado un “gran fruto”. Nazareth, que mal nos llevábamos, pero que bien hacemos *ciencia casera* ahora. Gracias por tan buenos ratos y por ser la madre del niño al que más quiero. A Venus M<sup>a</sup>, por protegernos siempre.

A mis padres, por darme la Vida y una educación basada en tantos valores. Sois un ejemplo difícil de igualar. Mamá, gracias por estar siempre ahí y perdona todos estos “pequeños malos ratos”. Papá, gracias por tus *“Está bien, pero...”*. Desde pequeño han hecho que me supere día a día y que trabaje para ser el mejor en cada cosa que emprendo.

# Índice



## ÍNDICE GENERAL

### CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 1

<b>1.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE LA CÓRNEA</b>	<b>3</b>
<b>1.2. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LA CÓRNEA HUMANA</b>	<b>12</b>
<b>1.3. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS TEJIDOS. FUNDAMENTOS</b>	<b>20</b>
1.3.1. Propiedades ópticas de los biomateriales	21
1.3.1.1. <i>Absorción</i>	21
1.3.1.2. <i>Scattering</i>	23
1.3.2. Ecuación de transporte radiativo	26
1.3.2.1. <i>Teoría de la Difusión</i>	26
1.3.2.2. <i>Método Adding-Doubling</i>	27
1.3.2.3. <i>Teoría de Kubelka-Munk</i>	28
1.3.2.4. <i>Relación entre los coeficientes de la ecuación de transporte radiativo y los coeficientes de Kubelka-Munk</i>	29
1.3.3. Medida de las propiedades ópticas	30
1.3.3.1. <i>Métodos directos.</i>	31
1.3.3.2. <i>Métodos indirectos no-iterativos</i>	32
1.3.3.3. <i>Métodos indirectos iterativos</i>	32
1.3.4. Fuentes de error	33
<b>1.4. ABERRACIONES OCULARES</b>	<b>35</b>
<b>1.5. INGENIERÍA TISULAR</b>	<b>41</b>
1.5.1. Conceptos generales de Ingeniería Tisular	41
1.5.1.1. <i>Tecnología celular.</i>	42
1.5.1.2. <i>Tecnología de constructos</i>	43
1.5.1.3. <i>Integración en un sistema vivo</i>	44
1.5.2. Aplicación de la Ingeniería Tisular a la construcción de córneas	45
1.5.3. Prótesis corneales biológicas (equivalentes corneales)	46
1.5.4. Biomateriales en la Ingeniería Tisular de la córnea	48

### CAPÍTULO 2. OBJETIVOS 55

<b>OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>57</b>
---	-----------

### CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO 59

<b>3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS DE ESTROMA CORNEAL HUMANO ARTIFICIAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR</b>	<b>61</b>
3.1.1. Obtención de limbos esclero-corneales humanos	61
3.1.1.1. <i>Extracción</i>	62
3.1.1.2. <i>Almacenamiento</i>	62
3.1.2. Desarrollo de los cultivos celulares primarios de queratocitos a partir de células procedentes de limbos esclero-corneales humanos	63

**CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO** *(continuación)*

<b>3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS DE ESTROMA CORNEAL HUMANO ARTIFICIAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR</b> <i>(continuación)</i>	
3.1.3. Subcultivo de los cultivos primarios de queratocitos humanos	64
3.1.4. Elaboración de los sustitutos de estroma corneal	65
3.1.5. Obtención de sustitutos estromales nanoestructurados	68
<b>3.2. DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES Y MÉTODO DE MEDIDA</b>	<b>71</b>
3.2.1. Medida del espesor.	71
3.2.2. Medidas por reflexión	73
3.2.3. Medidas por transmisión para la radiación UV	76
3.2.4. Medida del índice de refracción	79
3.2.5. Estimación de la calidad de la imagen retiniana	82
<b>3.3. PROCESAMIENTO PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO, RECUENTO CELULAR Y MEDIDA DEL ÁREA CELULAR</b>	<b>84</b>
3.3.1. Preparación de la muestra	84
3.3.2. Recuento celular y medida del área celular	85
<b>3.4. TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA</b>	<b>88</b>

**CAPÍTULO 4. RESULTADOS** **91**

<b>4.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LOS CONSTRUCTOS</b>	<b>94</b>
<b>4.2. PROPIEDADES ÓPTICAS EN EL ESPECTRO VISIBLE</b>	<b>96</b>
4.2.1. Coeficiente de <i>scattering</i> reducido ( $\mu_s'$ )	96
4.2.2. Coeficiente de absorción ( $\mu_a$ )	100
4.2.3. Albedo de transporte ( $\sigma'$ )	103
4.2.4. Transmitancia en el espectro visible	107
<b>4.3. TRANSMITANCIA ESPECTRAL PARA LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA</b>	<b>110</b>
<b>4.4. ÍNDICE DE REFRACCIÓN</b>	<b>113</b>

**CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN** **115**

<i>Sobre la construcción de modelos de estroma corneal humano artificial</i>	<b>117</b>
<i>Sobre la evaluación de las propiedades ópticas en el espectro visible</i>	<b>122</b>
<i>Sobre el comportamiento de los modelos de estroma corneal humano artificial expuestos a la radiación ultravioleta</i>	<b>131</b>
<i>Sobre el índice de refracción y la calidad de imagen retiniana</i>	<b>138</b>

**CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES** **143****CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA** **149****CAPÍTULO 8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA** **163**

# ÍNDICE DE FIGURAS

## CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1

<b>Figura 1.1.</b> Histología de la córnea humana. Imagen de microscopía óptica que muestra las capas corneales: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Tinción con hematoxilina-eosina.	4
<b>Figura 1.2.</b> Esquema del epitelio corneal representando las distintas capas celulares que lo componen: células superficiales, aladas y basales.	5
<b>Figura 1.3.</b> Representación esquemática de los mecanismos de adhesión del epitelio corneal a la membrana basal y a la membrana de Bowman.	6
<b>Figura 1.4.</b> Estroma corneal. Imagen microscópica de la córnea en la que se aprecian los queratocitos y la matriz extracelular. Tinción con hematoxilina-eosina.	7
<b>Figura 1.5.</b> Disposición de las capas de colágeno en el estroma corneal. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra la disposición de las láminas y de las fibras de colágeno	8
<b>Figura 1.6</b> Queratocitos estromales. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra una célula corneal estromal humana, situada entre varias fibras de colágeno del estroma corneal. Escala: 20 $\mu\text{m}$	9
<b>Figura 1.7.</b> Endotelio corneal. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la córnea humana en la que se aprecian las células endoteliales recubriendo toda la superficie interna de la córnea. Escala: 50 $\mu\text{m}$ .	10
<b>Figura 1.8.</b> Transmitancia de la córnea determinada mediante el método DSF, realizando la estimación con los datos de la Tabla 1.2.	16
<b>Figura 1.9.</b> Efectos teóricos de la variación de distintos parámetros individuales así como los predice el método DSF. Se representa la transmitancia de la córnea en función de la longitud de onda.	17
<b>Figura. 1.10.</b> Métodos de medida de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos	34
<b>Figura 1.11.</b> Representación de los polinomios de Zernike hasta el orden 5.	37
<b>Figura 1.12.</b> Representación de la imagen de un punto que reproduce un sistema óptico afectado solo de aberración esférica según se localice el punto de corte de los rayos con el eje óptico del sistema.	38
<b>Figura 1.13.</b> Representación gráfica de la imagen de un punto afectada solo de a) aberración de coma; b) aberración de astigmatismo.	38
<b>Figura 1.14.</b> Equivalente corneal, construido en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada, sobre un sustituto estromal a base de colágeno tipo I y empleando células corneales de conejo. Puede observarse la escasa transparencia del constructo.	49
<b>Figura 1.15.</b> Gel de fibrina humana con queratocitos en su interior preparado para su utilización como sustituto estromal.	51
<b>Figura 1.16.</b> Sustituto estromal de agarosa al 2% con queratocitos inmersos en su interior. Es apreciable la gran transparencia del sustituto estromal.	52
<b>Figura 1.17.</b> Equivalente corneal de espesor completo generado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada fabricado utilizando células epiteliales, estromales y endoteliales de conejo y empleando un gel de fibrina humana y agarosa al 0,1% como base del sustituto estromal. La transparencia del constructo permite apreciar los números de la guía de referencia.	53

**CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO****59**

<b>FIGURA 3.1.</b> 1. Fabricación de los geles de Fibrina y Agarosa. 2. Contenedores de cultivo donde se alicuotaron los geles dentro de la campana de convección de aire. 3. Contenedor utilizado para este estudio y posición de los constructos con las diferentes concentraciones de agarosa utilizadas.	<b>66</b>
<b>Figura 3.2.</b> Material utilizado para la nanoestructuración de los geles.	<b>68</b>
<b>Figura 3.3.</b> Proceso de nanoestructuración.	<b>69</b>
<b>Figura 3.4.</b> Microscopio Nikon Eclipse 90i utilizado para la medida del espesor de la muestra.	<b>72</b>
<b>Figura 3.5.</b> Dispositivo experimental de las medidas de reflexión por el método Kubelka-Munk.	<b>75</b>
<b>Figura 3.6.</b> Dispositivo experimental para las medidas de transmitancia de la radiación UV. A la izquierda, esquema de la disposición del soporte de la placa de Petri y los colimadores.	<b>78</b>
<b>Figura 3.7.</b> A. Dispositivo experimental de las medidas del índice de refracción con el espectrofotómetro. B. Incidencia en ángulo de Brewster y la proyección de intensidades reflejadas, siendo ésta nula en dicho ángulo. C. Incidencia sobre las muestras de los láseres de 532, 594 y 670nm utilizados.	<b>81</b>
<b>Figura 3.8.</b> Pantalla principal del programa Oslo LT, donde se muestran las diferentes ventanas de datos y representación, con los datos del modelo de ojo de Navarro-Escudero.	<b>83</b>
<b>Figura 3.9.</b> Procesamiento de la imagen para el recuento celular.	<b>87</b>

**CAPÍTULO 4. RESULTADOS****91**

<b>Figura 4.1.</b> Recuento celular. 1. Número de células por $\text{mm}^2$ . 2. Área celular. 3. Fracción de área que ocupan las células en cada uno de los tejidos.	<b>95</b>
<b>Figura 4.2.</b> Coeficiente de scattering reducido ( $\mu_s'$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal	<b>98</b>
<b>Figura 4.3.</b> Coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal.	<b>101</b>
<b>Figura 4.4.</b> Albedo de transporte ( $\alpha'$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal.	<b>105</b>
<b>Figura 4.5.</b> Transmitancia en el visible ( $T_{\text{vis}}$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal.	<b>108</b>
<b>Figura 4.6.</b> Transmitancia para la radiación UV ( $T_{\text{UV}}$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal	<b>111</b>
<b>Figura 4.7.</b> Índice de refracción ( $n$ ) para cada uno de los materiales, longitudes de onda y evolución temporal	<b>114</b>

**CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN****115**

<b>Figura 5.1.</b> Molde para la fabricación de una válvula cardiaca. El cilindro exterior está cubierto de una capa de silicona. La parte interior del molde da forma a la válvula. La distancia entre los moldes es variable. En la imagen de la derecha se puede observar el constructo generado.	<b>121</b>
<b>Figura 5.2.</b> Mapa de áreas de color correspondiente a la transmitancias obtenidas para todos los modelos de estroma corneal humano artificial estudiados.	<b>126</b>
<b>Figura 5.3.</b> Mapa de áreas de color correspondiente a los albedos de transporte obtenidos para todos los modelos de estroma corneal humano artificial estudiados.	<b>128</b>
<b>Figura 5.4.</b> Mapa de áreas de color correspondiente a los coeficientes de scattering (1) y absorción (2) obtenidos para todos los modelos de estroma corneal humano analizados.	<b>130</b>

**CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN** *(continuación)***115**

- Figura 5.5.** Mapa de áreas de color correspondiente a la transmitancia en el UV obtenida para todos los modelos de estroma corneal humano. **133**
- Figura 5.6.** Coeficiente de absorción en el UV para los constructos F, FA<sub>100</sub> y FA<sub>200</sub>. **135**
- Figura 5.7.** Coeficiente de absorción en el UV normalizado al modelo FA<sub>100</sub> para los constructos F y FA<sub>200</sub>. **135**
- Figura 5.8.** Absorbancia en el rango del UV para los constructos F, FA<sub>100</sub> y FA<sub>200</sub>. **137**
- Figura 5.9.** Variación de la aberración esférica para las distintas muestras, según el radio de curvatura. **140**
- Figura 5.10.** Variación de los “spots” en el eje óptico para un radio de 7,65 para cada uno de los modelos (llamamos “spots” a la imagen de un punto que se formaría en retina considerando el radio de curvatura y el índice de refracción utilizados). **140**
- Figura 5.11:** Variación de la aberración de coma según los radios de curvatura para las distintas muestras en estudio. **141**
- Figura 5.12.** Variación del astigmatismo para cada una de las muestras según el radio de curvatura. **142**

**ÍNDICE DE TABLAS****CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA****1**

<i>Tabla 1.1. Modelos sobre la transparencia corneal</i>	14
<i>Tabla 1.2. Datos de la córnea humana</i>	15
<i>Tabla 1.3. Principales tipos de constructos elaborados mediante Ingeniería Tisular.</i>	44

**CAPÍTULO 3. MATERIAL Y MÉTODO****59**

<i>Tabla 3.1. Características técnicas de las placas de crecimiento celular Corning® CellBIND®</i>	65
<i>Tabla 3.2. Cantidades utilizadas expresadas en mililitros para cada tipo de estroma corneal fabricado.</i>	67
<i>Tabla 3.3. Características técnicas del espectrómetro OSM-400 UV/VIS de Newport Corporation.</i>	76
<i>Tabla 3.4. Características técnicas de la fuente utilizada con el espectrómetro</i>	77
<i>Tabla 3.5. Datos correspondientes a los radios, índices y espesores de los diferentes componentes del modelo de ojo de Navarro-Escudero.</i>	83

**CAPÍTULO 4. RESULTADOS****91**

<i>Tabla 4.1. Promedios del coeficiente de scattering reducido para todos los modelos y semanas de cultivo y comparación estadística entre concentraciones.</i>	99
<i>Tabla 4.2. Promedios del coeficiente de absorción para todos los modelos y semanas de cultivo y comparación estadística entre concentraciones.</i>	102
<i>Tabla 4.3. Promedios del albedo de transporte para todos los modelos y semanas de cultivo y comparación estadística entre concentraciones.</i>	106
<i>Tabla 4.4. Promedios de la transmitancia en el visible para todos los modelos y semanas de cultivo y comparación estadística entre concentraciones.</i>	109
<i>Tabla 4.5. Promedios la transmitancia para la radiación UV para todos los modelos y semanas de cultivo y comparación estadística entre concentraciones.</i>	112

# Capítulo 1

## Revisión Bibliográfica

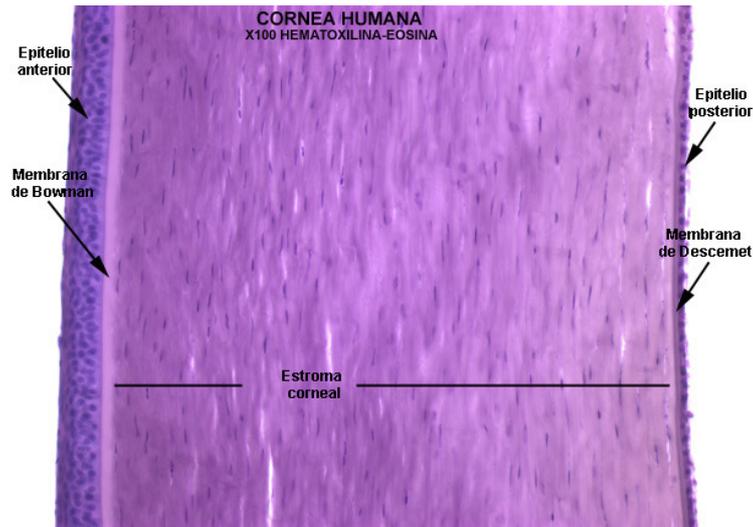


## 1.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE LA CÓRNEA

La córnea es una estructura fibrosa y avascular enclavada en la abertura anterior de la esclerótica, de la que se difiere por su gran transparencia. Es, a la vez, una envoltura resistente y un medio transparente, y estos dos aspectos condicionan su anatomía. Debido a su situación y sus funciones (protección y óptica), la córnea es uno de los componentes más importantes del ojo de cualquier ser vivo.

Concretando en el ojo de los humanos, su cara anterior está en contacto con la lágrima, mientras que la cara posterior está en contacto con el humor acuoso, siendo a partir de estos dos medios de donde la córnea obtiene sus requerimientos fisiológicos.

Histológicamente, la córnea consta de 5 capas, denominadas, desde el exterior hacia el interior: a) epitelio o epitelio anterior, b) membrana Bowman, c) estroma, d) membrana Descemet y e) endotelio o epitelio posterior. Las describimos, brevemente, a continuación:



**Figura 1.1.** Histología de la córnea humana. Imagen de microscopía óptica que muestra las capas corneales: epitelio, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio. Tinción con hematoxilina-eosina.

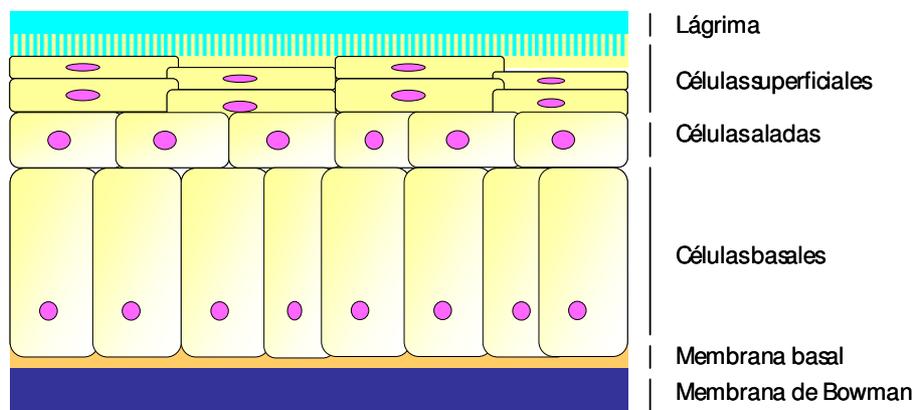
a) Epitelio corneal. La capa más externa de la córnea está constituida por un epitelio estratificado, escamoso y no queratinizado, cuyo espesor varía entre 50 y 56  $\mu\text{m}$ . En su zona central tiene entre 5 y 7 capas de células, mientras que en periferia tiene entre 8 y 10 capas, aunque solamente la capa más interna de estas células puede dividirse.

Las dos capas más superficiales del epitelio están formadas por las denominadas células de superficie, escamosas o apicales, que están en contacto directo con la lágrima. Durante el proceso de descamación fisiológica de la córnea, estas células superficiales acaban desprendiéndose a la lágrima, siendo rápidamente sustituidas por células de estratos inferiores. La superficie externa de las células epiteliales apicales está cubierta de pliegues y microvellosidades de entre 0,5 y 1,2  $\mu\text{m}$  cuya función es aumentar la superficie de contacto entre las células y el exterior (Pfister, 1973).

Las capas intermedias del epitelio corneal están constituidas por dos o tres filas de células que poseen prolongaciones en forma de alas, por lo que se denominan

células alares o aladas. Estas células tienden a aplanarse conforme se acercan a la superficie, siendo sus núcleos paralelos a ésta.

La capa basal está formada por células columnares o basales, perpendiculares a la superficie, que presentan un núcleo prominente en su polo basal. Las células basales proceden de las células amplificadoras transitorias que migran desde el limbo esclero-corneal, siendo éstas las únicas células epiteliales que poseen actividad mitótica y dan origen a las células intermedias (Lavker et al., 1991).

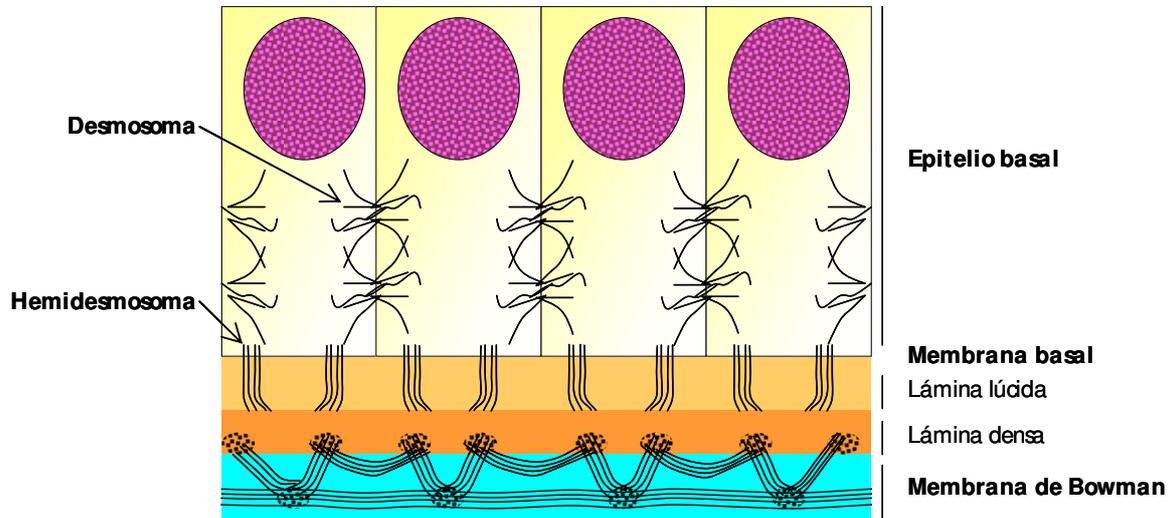


**Figura 1.2.** Esquema del epitelio corneal representando las distintas capas celulares que lo componen: células superficiales, aladas y basales.

Las células epiteliales expresan queratinas específicas de la córnea, en especial queratina 3 (codificada por el gen KRT3) y queratina 12 (codificada por el gen KRT12) (Moll et al., 1982), las cuales pueden utilizarse como marcadores de diferenciación epitelial corneal.

Bajo el epitelio encontramos una membrana basal (Figura 1.3.) de aproximadamente 75nm de espesor. Junto con los hemidesmosomas y las fibrillas de anclaje, la membrana basal juega un papel importante en la unión del epitelio corneal a la membrana Bowman. Al microscopio electrónico, la membrana basal está formada

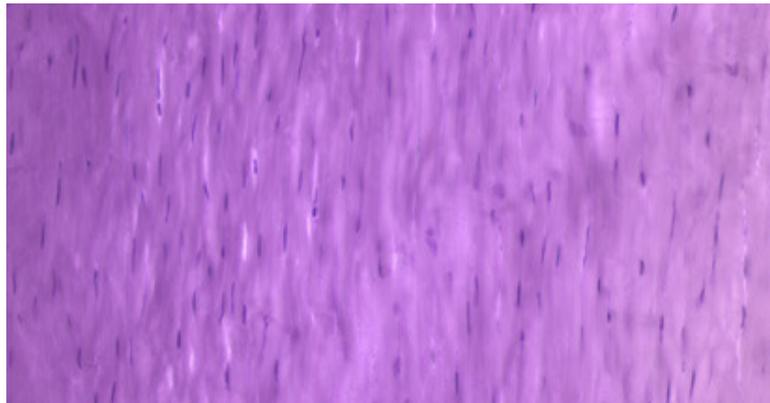
por una zona clara anterior de 25nm (lámina lúcida) y una zona oscura posterior de 50nm (lámina densa).



**Figura 1.3.** Representación esquemática de los mecanismos de adhesión del epitelio corneal a la membrana basal y a la membrana de Bowman.

b) Membrana de Bowman. Internamente al epitelio corneal encontramos una estructura denominada membrana de Bowman. Se trata de una capa acelular de 8 a 12 $\mu$ m de espesor, compuesta por fibras de colágeno tipo I y tipo III, que está fuertemente anclada al estroma corneal. La membrana de Bowman actúa como una importante barrera física al paso de sustancias desde y hacia el estroma. Debido a la ausencia de células, esta estructura corneal tiene muy limitada su capacidad regeneradora, por lo que cualquier daño a este nivel suele generar reacción cicatricial.

c) Estroma corneal. Con un espesor de 0,5–0,54mm en la zona central, y 0,7mm en la periferia, el estroma constituye el 90% del espesor corneal total. Histológicamente, el estroma corneal está formado por una matriz extracelular (constituida principalmente por colágeno tipo I y proteoglicanos) en la cual se localizan las células estromales denominadas queratocitos.

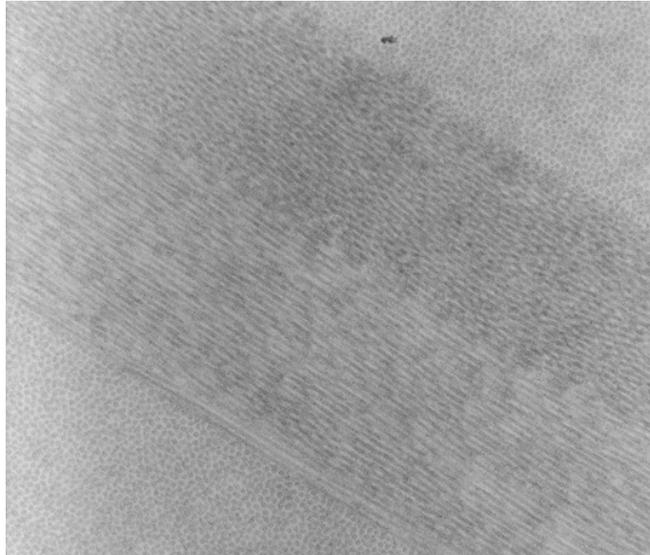


**Figura 1.4.** Estroma corneal. Imagen microscópica de la córnea en la que se aprecian los queratocitos y la matriz extracelular. Tinción con hematoxilina-eosina.

#### c.1) Matriz extracelular del estroma corneal.

- **Componente fibrilar.** La matriz extracelular está formada por una red tridimensional de fibras de colágeno cuya orientación es fundamental a la hora de permitir la correcta refracción de la luz hacia la retina, así como la resistencia mecánica de toda la estructura corneal. En su mayor parte, se trata de fibras de colágeno de tipo I (más del 98% del total), y colágeno tipo V (menos del 2%). Estas fibras se disponen tridimensionalmente para formar entre 200 y 250 láminas paralelas. Dentro de cada lámina, todas las fibras tienen la misma dirección, aunque la orientación entre una y otra lámina es oblicua. Esta disposición permite que el estroma sea transparente, dispersando menos del 10% de la luz que incide sobre él (Freegard, 1997; Freund et al., 1995; Maurice, 1957).
- **Proteoglicanos.** El estroma corneal es muy rico en este tipo de componentes, especialmente condroitín-sulfato y queratán sulfato. Los proteoglicanos corneales tienen una gran capacidad para atraer agua y cationes, lo cual hace que el estroma corneal tienda a edematizarse absorbiendo agua desde la cámara anterior. La bomba metabólica del endotelio y en menor medida la del epitelio, evitan la edematización del

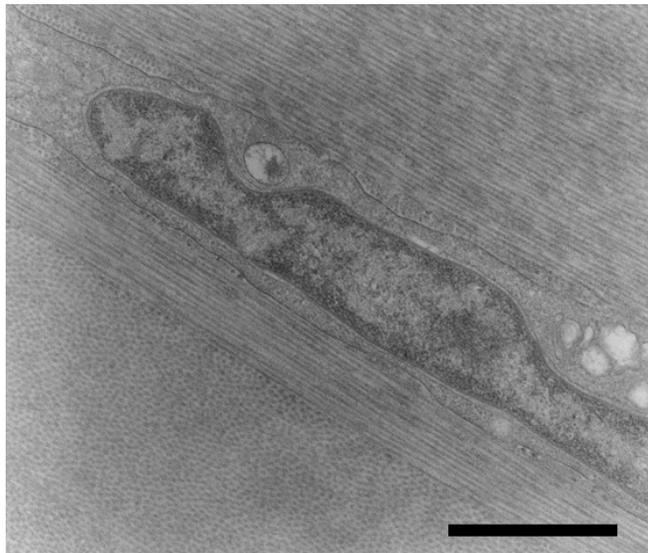
estroma. La distribución de proteoglicanos en el estroma no es uniforme, por lo que la cantidad de agua es menor en la región anterior que en la posterior (Castoro et al., 1998).



**Figura 1.5.** Disposición de las capas de colágeno en el estroma corneal. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra la disposición de las láminas y de las fibras de colágeno (Tomada de Muñoz-Ávila, 2006).

### c.2. Componente celular del estroma corneal:

- **Queratocitos.** Estas células conectivas podrían ser fibroblastos especializados que se encuentran entre las láminas del estroma y juegan un papel importante en la síntesis de proteoglicanos y colágeno. Los queratocitos son células grandes y planas, con prolongaciones que le confieren una forma estrellada. Ante una lesión los queratocitos migran a la zona dañada y tratan de repararla (Robb et al., 1962).
- **Polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos.** Estas células son poco abundantes en el estroma, y proceden de vasos sanguíneos periféricos a la córnea. En caso de inflamación, su número aumenta de forma importante.



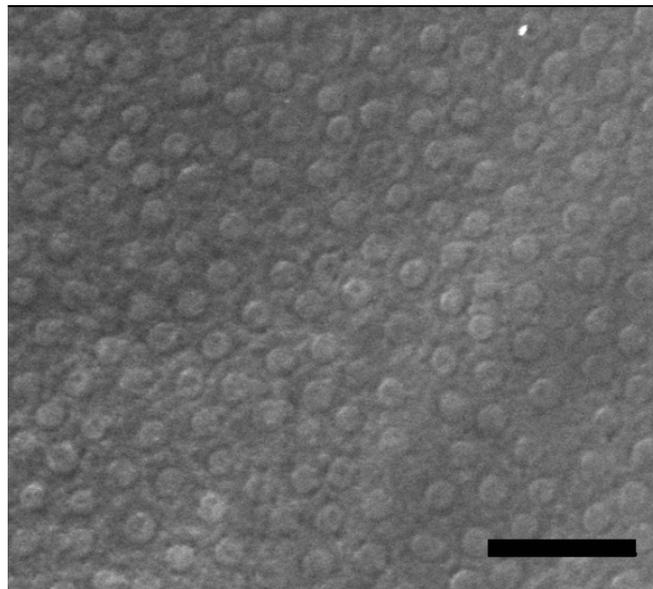
**Figura 1.6** Queratocitos estromales. Imagen de microscopía electrónica de transmisión en la que se muestra una célula corneal estromal humana, situada entre varias fibras de colágeno del estroma corneal. Escala: 20  $\mu\text{m}$  (Tomada de Muñoz-Ávila, 2006).

d) Membrana de Descemet. Esta estructura, que separa el estroma del endotelio corneal, es en realidad una membrana basal producida fundamentalmente por el endotelio. Con un espesor de entre 10 y 15 $\mu\text{m}$ , la membrana de Descemet se mantiene unida al endotelio corneal, alcanzando el ángulo esclerocorneal en la llamada línea de Schwalbe. Al microscopio electrónico, la membrana de Descemet aparece como un enrejado de fibrillas de colágeno tipo IV, laminina y fibronectina (Newsome, 1981), y consta de una zona estriada anterior (que se desarrolla durante la vida intrauterina), y una zona no estriada posterior (que se establece a lo largo de la vida). En su conjunto, la membrana de Descemet es una estructura muy elástica, capaz de regenerarse con rapidez y muy resistente a la acción de enzimas proteolíticos. Por este motivo, en úlceras corneales graves, la membrana de Descemet resiste formando un descematocele.

e) Endotelio corneal o epitelio posterior. El endotelio corneal constituye la capa más interna de la córnea, en contacto directo con la cámara anterior del ojo y, por lo

tanto, con el humor acuoso. Es en realidad una capa de mesotelio, aunque tradicionalmente se le ha llamado endotelio por estar en contacto con un líquido (el humor acuoso) por similitud al endotelio vascular en contacto con otro líquido (la sangre).

Histológicamente, el endotelio corneal está constituido por una monocapa de células planas hexagonales que se imbrican unas con otras para formar un mosaico. Las uniones de las células endoteliales a la membrana de Descemet son muy tenues, lo cual les permite desplegarse para cubrir toda la superficie posterior de la córnea (Waring et al., 1974). Entre las células, existen numerosas uniones herméticas de tipo ocluyente, adherente y comunicante (menos fuertes que las zónulas ocludens del epitelio, por lo que la barrera endotelial no es tan eficaz como la epitelial) (MacLaughlin et al., 1985).



**Figura 1.7.** Endotelio corneal. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la córnea humana en la que se aprecian las células endoteliales recubriendo toda la superficie interna de la córnea. Escala: 50 $\mu$ m. (Tomada de Muñoz-Ávila, 2006).

El núcleo de estas células es grande, mientras que en el citoplasma hay una importante actividad de síntesis mitocondrial de ATP, así como de ATPasas. Todo ello está relacionado con el elevado metabolismo basal que presentan las células endoteliales, el cual permite a éstas llevar a cabo una importante función de control de los niveles de hidratación del estroma corneal.

Tradicionalmente, se pensaba que estas células endoteliales corneales no tenían capacidad de regeneración en el ser humano, no existiendo mitosis tras el nacimiento. De este modo, habría una disminución progresiva del número de células endoteliales con la edad, por lo que las células remanentes aumentarían su tamaño para cubrir todo el espacio corneal. Distintos investigadores han demostrado que el endotelio corneal humano, como el resto de los tejidos del organismo, posee cierto número de células madre indiferenciadas y, por lo tanto, es capaz de proliferar y regenerarse en el adulto, aunque en un grado muy bajo (Joyce, 2003). La densidad celular en el adulto joven es de unas 3.000-3.500 células por  $\text{mm}^2$  de superficie corneal. La existencia de un número de células inferior a 500-700 células por  $\text{mm}^2$  puede asociarse a una pérdida de función endotelial.

## 1.2. CARACTERIZACIÓN ÓPTICA DE LA CÓRNEA HUMANA

Desde el punto de vista óptico, la córnea es el único órgano del cuerpo humano que se conserva casi totalmente transparente a lo largo de toda la vida, permitiendo la refracción y transmisión de la luz a través de ella. La enorme regularidad y uniformidad de su estructura, especialmente la ordenación en láminas de las fibras de colágeno del estroma corneal, formando una red tridimensional, el estrecho diámetro de estas fibras (entre 30 y 38nm), así como la ausencia de vasos sanguíneos anteriormente mencionada, facilita su transparencia (Freegard, 1997; Freund et al.,1995; Maurice, 1957), destacando su gran capacidad refractiva, actuando como una lente convergente de gran potencia.

Morfológicamente, la córnea se puede comparar a una hemiesfera, presentando un diámetro vertical medio de 11,5mm y un diámetro horizontal medio de 12mm. El espesor corneal oscila entre 0,49 y 0,56mm en la zona central y entre 0,7 y 0,9mm en la zona periférica. La córnea tiende a incrementar su diámetro y a

aplanarse con la edad, alcanzando su medida definitiva después del primer año de vida (Gordon y Donzis, 1985). La cara anterior de la córnea tiene un radio de curvatura de 7,8mm, lo cual supone, debido a la diferencia entre los índices de refracción del aire (1) y de la córnea (1,377), un poder refractor de 48,35D. La superficie posterior presenta un radio de 6,5mm lo cual supone un poder refractor negativo de 6,11D. Esto es debido a que la cara posterior de la córnea separa dos medios de índices de refracción similares, el humor acuoso (1,337) y la propia córnea. El poder de refracción total de la córnea es, por tanto, de 42,36D, lo cual representa un 70% del poder refractor total del ojo (Katz, 1989).

Como ya hemos apuntado anteriormente, una de las propiedades más importantes de la córnea es su transparencia, la cual depende de los fenómenos de reflexión, dispersión (o *scattering*) y absorción que se producen cuando la luz incide sobre las distintas capas corneales y las atraviesa. Varios métodos para la evaluación de la transparencia de la córnea se han descrito en la literatura, aunque ninguno ha adquirido el uso generalizado en la práctica clínica.

La diferencia entre estos modelos consiste esencialmente en la formulación matemática del término que describe la sección transversal de *scattering*. Todos estos modelos consideran la estructura de la córnea, es decir, el tamaño y la forma de los componentes estromales y sus índices de refracción, puesto que cada uno de estos factores influye en la cantidad de luz dispersada por la estructura. La mayoría de los modelos se basan en la teoría de rejillas desarrollada por Maurice (1957), mediante la cual, aproximando las fibras de colágeno a unos cilindros perfectos infinitos, se puede calcular el *scattering* relativo de una sola fibra. La diferencia existente entre el índice de refracción de las fibras y el índice de refracción de la matriz interfibrilar muestra que cada fibra dispersa una pequeña cantidad de luz. La Tabla 1.1. muestra los principales modelos basados en esta teoría de Maurice (1957).

Rejillas perfectas	Maurice (1957)
Índice de refracción uniforme	Smith (1969)
Ordenación de corto alcance	Hart y Farrell (1969)
Área/fibra media = correlación de área	Benedek (1971)
Rejillas perturbadas	Feuk (1971)
Fibras aleatorias con capa de PG	Twersky (1975)

**Tabla 1.1.** Modelos sobre la transparencia corneal

Hart y Farrell (1969) demostraron que solamente se necesita una ordenación de corto alcance de las posiciones de las fibras de colágeno para poder obtener una interferencia destructiva de los fotones dispersados. Los resultados obtenidos mediante la difracción de rayos X mostraron que este tipo de ordenación es el que se encuentra verdaderamente en la córnea (Sayers et al., 1982). Feuk (1971) desarrolló un modelo de ordenación de largo alcance basado en los desplazamientos pequeños y aleatorios de las fibras con respecto a las posiciones ideales de rejilla. Twersky (1975) hizo la suposición de que las fibras están dispuestas como en un fluido bidimensional y encontró una expresión de la distribución de las fibras en términos de fracciones de volumen ocupado por las mismas. Benedek (1971) consideró el problema de la transparencia de la córnea del punto de vista de las fluctuaciones del número de densidad de las fibras. Estos modelos han sido analizados cuantitativamente por Vaezy y Clark (1994), quienes examinaron la disposición espacial de las fibras de colágeno utilizando métodos Fourier. Más recientemente, Ameen et al. (1998) empleó métodos de estructuras de las bandas fotónicas para explicar la transmisión de la luz a través de las rejillas corneales.

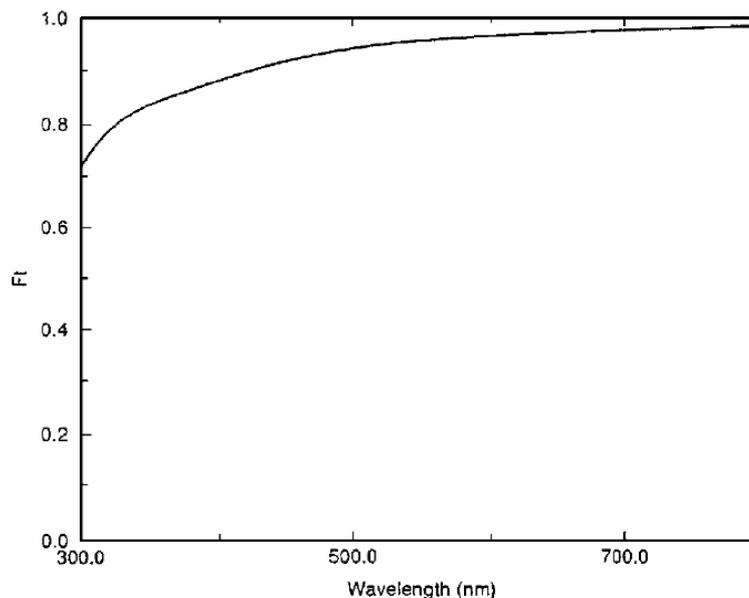
Todas estas teorías sobre la transparencia de la córnea coinciden en 3 aspectos: a) cada fibra de colágeno produce un *scattering* ineficaz; b) a pesar de esto, un número grande de fibras requiere que suceda la interferencia destructiva de la luz dispersada y c) la córnea es muy delgada (Farrell y McCally, 2000).

En 1986, Freund et al. (1986) publicó un método estadístico, denominado método DSF (Direct Summation of Fields), mediante el cual se puede calcular el *scattering* de la luz de cada una de las fibras de la córnea y se puede predecir la transmitancia de una distribución de fibras de tamaños diferentes ordenadas a corto alcance como una función de longitud de onda, despreciando la estructura laminar del estroma y la presencia de células estromales. Se trata de un método ampliamente testado y que ha ofrecido resultados fiables para distintas condiciones. Para poder emplear el método DSF en el cálculo de la transmitancia de la córnea, es necesario conocer varias propiedades estructurales y físicas del estroma: el índice de refracción de las fibras hidratadas de colágeno, el índice de refracción de la matriz interfibrilar (también se ha calculado el cociente entre los dos para distintas muestras), las posiciones relativas de cada una de las fibras y su diámetro. La Tabla 1.2. muestra los valores de algunos de estos parámetros de la córnea humana.

<b>Diámetro medio de una fibra</b>	(30,8 ± 0.8) nm
<b>Índice de refracción de las fibras</b>	1,411 ± 0,001
<b>Índice de refracción de la matriz extrafibrilar</b>	1,365 ± 0,003
<b>Cociente de los índices mencionados arriba</b>	1,003 ± 0,002
<b>Número de densidad</b>	(292 ± 70) $\mu\text{m}^2$

**Tabla 1.2.** Datos de la córnea humana

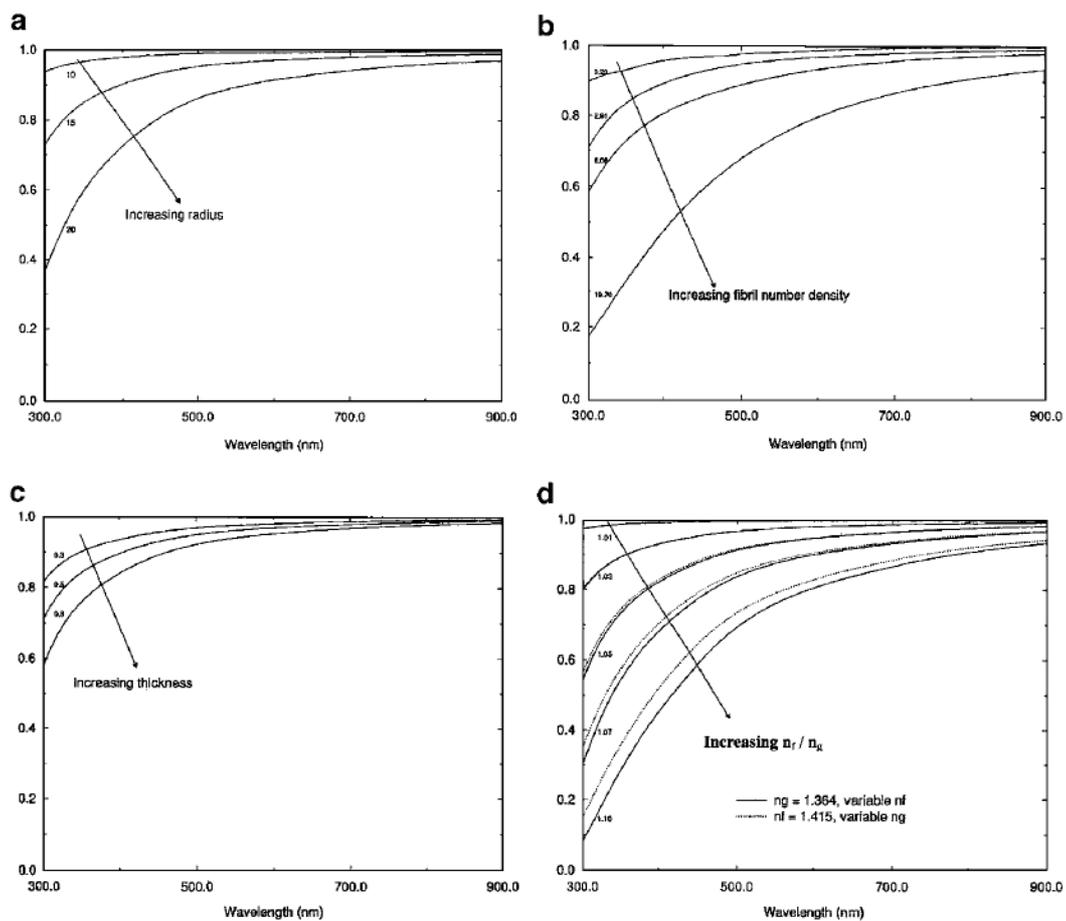
Considerando el espesor de la córnea de 0,52mm y combinando los datos sobre las posiciones y los diámetros de las fibras de colágeno de la córnea humana con los índices de refracción de la Tabla 1.2, el método DSF se utilizó para predecir la transmitancia como función de la longitud de onda. Como se esperaba, la transmitancia toma valores por encima del 90% para casi todas las longitudes de onda del espectro visible.



**Figura 1.8.** Transmitancia de la córnea determinada mediante el método DSF, realizando la estimación con los datos de la Tabla 1.2. (Tomada de Meek et al., 2003).

Es interesante examinar los efectos teóricos que pueden aparecer cuando varía uno de los parámetros de la córnea y los demás se quedan constantes, para averiguar a cual de estos parámetros la transmitancia es más sensible. Hay que recordar que se trabaja con un solo modelo de transparencia que presenta sus suposiciones implícitas sobre la córnea y las condiciones son unas condiciones teóricas. En la práctica, muchos de estos parámetros están relacionados entre sí, y la variación de uno implica la variación de los otros. La Figura 1.9.a. muestra que, si el radio de una fibra aumenta hasta 20nm, la transmitancia decrece, especialmente en la zona azul del espectro, mientras que si el radio de la fibra disminuye, la transmitancia aumenta.

El efecto independiente del número de densidad de las fibras sobre el *scattering* es difícil de medir, puesto que la variación del número de densidad de las fibras (aumentando la separación entre las fibras) modifica los efectos de interferencia. No obstante, se ha encontrado que, manteniendo las posiciones relativas de las fibras constantes, pero desplazando las fibras unas con respecto a las otras se obtiene un *scattering* más débil (mayor transmitancia) como se muestra en la Figura 1.9.b.



**Figura 1.9.** Efectos teóricos de la variación de distintos parámetros individuales así como los predice el método DSF. Se representa la transmitancia de la córnea en función de la longitud de onda (Tomada de Meek et al., 2003).

Sabemos que si en un sistema, la atenuación de la luz es causada solamente por el *scattering* (no existen pérdidas debidas a la absorción), ese sistema se describe por la expresión:

$$F_t = \exp(-\mu_s \cdot t)$$

donde  $F_t$  representa el porcentaje de la luz transmitida sin *scattering*,  $\mu_s$  es el coeficiente de *scattering* y  $t$  es el espesor de la muestra en la dirección de la luz incidente.

La ecuación anterior muestra claramente que el *scattering* de la luz va a aumentar si aumenta el espesor corneal (suponiendo que el aumento del espesor se produce debido a una masa extra de tejido y no a enfermedades). De todos modos, en la Figura 1.9.c. se puede observar que este efecto es relativamente débil. Por ejemplo, el valor del espesor corneal puede casi duplicarse sin que el *scattering* aumente una cantidad significativa.

La transmisión de la luz a través de la córnea es muy sensible a un aumento desproporcionado de los índices de refracción de las fibras de colágeno y de la matriz extrafibrilar. Desde el punto de vista teórico, hay dos maneras de variar su cociente: se mantiene el índice de refracción de las fibras constante y se modifica el de la matriz, o viceversa. Las dos maneras tienen el mismo efecto (Figura 1.9.d.). Si el cociente es 1, hay transmisión total de luz para todo el espectro. Esta condición se denomina la condición del índice de refracción uniforme. A medida que el cociente aumenta, la transmisión disminuye, de nuevo en la zona azul del espectro.

El método DSF se puede utilizar para demostrar que el *scattering* de la luz en la córnea aumenta si: a) el orden en la disposición espacial de las fibras desaparece; b) los diámetros de las fibras aumentan; c) el número de densidad de las fibras aumenta; d) hay una diferencia entre el incremento del índice de refracción de las fibras hidratadas y el incremento del índice de refracción de la matriz extrafibrilar; e) el espesor corneal aumenta.

Hasta ahora, la córnea ha sido tratada como una estructura formada solamente por las fibras de colágeno y la matriz extrafibrilar. También hay que tener en cuenta que en el estroma existe un gran número de queratocitos con una densidad que disminuye desde la parte anterior hacia la parte posterior del estroma (Patel et al., 2001; Moller-Pedersen y Ehlers, 1995). Maurice (1957) consideró los queratocitos como insuficientes para contribuir de modo significativo al *scattering*. Además de esto, los queratocitos son relativamente delgados en la dirección del paso de la luz a través de la córnea. Más recientemente, Jester (1999) sugirió que estas células contienen unas proteínas especiales llamadas cristalinós corneales que producen un índice de

refracción uniforme en las células y pueden igualar el índice de refracción del citoplasma al de la matriz circundante. Esto, junto con las dimensiones de las células, hace que el *scattering* producido sea más débil. No obstante, si los queratocitos cambian sus formas o derraman sus contenidos, las condiciones a analizar son distintas y los queratocitos son capaces de producir un *scattering* muy eficiente.

Si bien la transmisión en el visible es importante en el ojo, no es menos importante la transmisión en el rango espectral correspondiente a la radiación ultravioleta (UV). El estudio de la transmisión corneal en este espectro es de gran interés por los posibles efectos nocivos de esta radiación en el cristalino, y sobre todo en el caso de los afáquicos en la retina. Algunos estudios (Bergmanson, 1990; Dourhthy and Cullen, 1989) han mostrado que la exposición de la córnea a esta radiación induce cambios patológicos en su estructura, produciendo patologías como oftalmítis y queratopatías que afectan al epitelio, estroma corneal y endotelio. Juntas todas estas capas, absorben la mayoría de la radiación UV-B (Zigman, 1993), por tanto, la cornea es especialmente sensible al daño inducido por la exposición de esta radiación (Zigman, 1993; Zigman, 1995). Sin embargo, existen muy pocos estudios concernientes a la absorción en las diferentes capas de la córnea. Kinsey (1995) encontró que la mayoría de la radiación ultravioleta por debajo de 290nm es absorbida en el epitelio corneal. En contraste, un estudio de Schive (1984) no mostró diferencia alguna en la absorción entre el epitelio y el estroma. El estudio del daño que produce esta radiación en estos tejidos cobra hoy día mayor importancia debido al auge de la cirugía refractiva. En este tipo de cirugías las capas anteriores sufren cambios estructurales profundos y, por tanto, puede alterar el resultado de la transmisión en este rango del espectro. Lajos et al. (2002) realizaron un estudio sobre la absorción de las diferentes capas de la córnea *ex vivo*, encontrando que la absorción de las capas anteriores de la córnea es 1,8 veces mayor que en las capas posteriores. Las capas posteriores tienen una absorbancia uniforme, sin encontrar una dependencia estructural. También encontraron que el epitelio y la capa de Bowman eran igual de efectivos absorbiendo la radiación UV-B.

### 1.3. PROPIEDADES ÓPTICAS DE LOS TEJIDOS. FUNDAMENTOS.

En la literatura (Boulnois, 1986) se han identificado cuatro grandes categorías de procesos foto-físicos que pueden ocurrir cuando interacciona la radiación (y en nuestro caso la luz) con un tejido biológico (o con un sustituto del mismo biomaterial):

- **Procesos foto-químicos:** implican la absorción de la luz por las moléculas del tejido. Este tipo de interacciones son la base de la terapia foto-dinámica.
- **Procesos térmicos:** se caracterizan por la deposición de energía térmica en la muestra. Las interacciones térmicas son utilizadas en la cirugía láser.
- **Procesos foto-ablativos:** solo pueden ocurrir en el UV, porque en esa zona los fotones poseen suficiente energía para provocar la disociación de los bio-polímeros.

- **Procesos electromecánicos:** se producen a tasas de fluencia muy grandes, cuando el intenso campo eléctrico presente puede causar la ruptura dieléctrica del tejido y la formación de un plasma de pequeño volumen. La rápida expansión de este plasma crea una onda de choque que puede romper mecánicamente el tejido.

En la práctica, las interacciones de los primeros dos tipos son las más frecuentes mientras que las de los últimos dos tipos suelen ser interacciones muy complejas, y sus efectos generalmente son despreciables.

### 1.3.1. Propiedades ópticas de los biomateriales.

La dispersión o *scattering* y la absorción, son los dos principales fenómenos físicos que afectan la propagación de la radiación (luz) en un biomaterial. Aunque los efectos de los dos son importantes, el *scattering* es dominante (Cheong et al, 1990) porque incluso para muestras muy finas (espesor sub-milimétrico), es muy probable que los fotones sufran varias dispersiones (debidas a los múltiples choques con los átomos) antes de atravesar la muestra. La probabilidad relativa de aparición de estos procesos en un material determinado depende de la longitud de onda de la radiación incidente.

#### 1.3.1.1. Absorción

El coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ) se define como:

$$dI = \mu_a I dx$$

donde  $dI$  es la variación diferencial de la intensidad  $I$  de un haz de luz colimado que hace un recorrido infinitesimal  $dx$  a través de un medio homogéneo que tiene el coeficiente de absorción  $\mu_a$ .

Si integramos sobre un espesor  $x$ , obtenemos:

$$I = I_0 e^{-\mu_a x}$$

El coeficiente de absorción también se puede expresar en términos de la densidad de partículas ( $\rho$ ) y sección transversal de absorción ( $\sigma_a$ ):

$$\mu_a = \rho\sigma_a$$

lo que nos lleva a la ley de Lambert-Beer:

$$I = I_0 e^{-\rho\sigma_a x}$$

La inversa de  $\mu_a$ ,  $1/\mu_a$ , se denomina penetración de absorción y es igual al camino libre medio que hace un fotón entre dos absorciones consecutivas. Otra cantidad utilizada para caracterizar la absorción de del tejido biológico es el coeficiente específico de extinción ( $\alpha$ ), que representa el nivel de absorción por  $\mu\text{mol}$  de compuesto por litro de solución por centímetro ( $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Se define utilizando el logaritmo en base 10, y se relaciona con el coeficiente de absorción a través de la siguiente expresión:

$$\alpha = \log_{10}(e) \cdot \frac{\mu_a}{c}$$

donde  $c$  es la concentración del compuesto.

La transmitancia ( $T$ ) se define como la proporción entre la intensidad de la luz transmitida a través del material y la intensidad de la luz incidente sobre el mismo:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

La atenuación, ó densidad óptica (OD), de un medio es:

$$OD = \log_{10} \frac{1}{T} = -\log_{10} \frac{I}{I_0}$$

Por lo tanto:

$$OD = \log_{10}(e) \cdot \mu_a x = \alpha c x$$

### 1.3.1.2. Scattering

El *scattering* de la luz en tejidos biológicos se produce debido a las variaciones del índice de refracción a nivel microscópico (membranas de células, orgánulos, etc.). De manera análoga a la absorción, se puede definir un coeficiente de scattering ( $\mu_s$ ), de forma que:

$$I = I_0 e^{-\mu_s x}$$

donde  $I$  es la componente no dispersada de la luz después de atravesar una muestra no-absorbente de espesor  $x$ . Si lo escribimos en función de la densidad de partículas ( $\rho$ ) y la sección transversal de scattering ( $\sigma_s$ ):

$$\mu_s = \rho \sigma_s$$

La penetración de scattering ( $1/\mu_s$ ) es el camino medio de un fotón entre dos dispersiones consecutivas. La cantidad  $\mu_s x$  se denomina el espesor óptico de una muestra y es adimensional.

Cuando un fotón que incide con una dirección descrita por el vector unitario  $\vec{e}_s$  sufre dispersión, la probabilidad de que su nueva dirección sea descrita por otro vector  $\vec{e}_s'$  es dada por la función de fase normalizada  $f(\vec{e}_s, \vec{e}_s')$ . Para los tejidos biológicos se puede asumir que la probabilidad de distribución es una función que depende solamente del ángulo que forman las direcciones del fotón incidente y el fotón dispersado. Por lo tanto, la función de fase se puede expresar, de una forma muy conveniente, como una función del coseno del ángulo de dispersión  $\vec{e}_s \cdot \vec{e}_s' = \cos \theta$ :

$$f(\vec{e}_s \cdot \vec{e}_s') = (\cos \theta)$$

Mie (1908) desarrolló una teoría que estableció que las soluciones analíticas de la función de fase son funciones derivadas y así determinó la dispersión de una onda electromagnética plana por partículas esféricas isotrópicas de cualquier tamaño. Para

tamaño de partículas mucho menor que la longitud de onda incidente, la teoría de Mie se puede aproximar con la teoría de Rayleigh (1871).

La anisotropía de un medio se puede caracterizar utilizando el valor medio del coseno del ángulo de dispersión ( $\vartheta$ ). El parámetro utilizado se denomina factor de anisotropía ( $g$ ):

$$g = \int_{-1}^1 \cos \theta [(f(\cos)) \theta] d \cos \theta$$

Para  $g=0$  tenemos una dispersión perfectamente isotrópica mientras que para  $g=1$  tendríamos una dispersión completa. Los tejidos biológicos (o los biomateriales que los sustituyen) tienen factores de anisotropía comprendidos en el rango  $0,69 \leq g \leq 0,99$  (Cheong et al., 1990). El coeficiente reducido de transporte de scattering ( $\mu'_s$ ), se define como:

$$\mu'_s = \mu_s (1 - g)$$

Esta cantidad puede ser interpretada como un equivalente al coeficiente de scattering isotrópico y es un parámetro fundamental en la teoría de difusión de la propagación de la luz a través de medios turbios.

Combinando la absorción y el scattering, se puede definir el coeficiente de atenuación total ( $\mu_t$ ):

$$\mu_t = \mu_s + \mu_a$$

Conociendo el  $\mu_t$  se puede definir el camino libre medio de un fotón como  $1/\mu_t$ .

Por analogía, el coeficiente de transporte de atenuación ( $\mu_{tr}$ ) es:

$$\mu_{tr} = \mu_a + \mu_s (1 - g) = \mu_a + \mu'_s$$

### 1.3.2. Ecuación de transporte radiativo.

La propagación de la radiación a través de los tejidos biológicos puede, en principio, ser descrita utilizando la teoría electromagnética fundamental. En este caso, el tejido se puede considerar un medio con una permitividad que varía espacialmente, y las variaciones del campo podrían ser descritas utilizando las ecuaciones de Maxwell. Sin embargo, este planteamiento no es factible debido a la complejidad del problema y la falta de un preciso conocimiento de la permitividad del medio. El problema puede ser simplificado ignorando fenómenos relacionados con la propagación de las ondas, como pueden ser la polarización y las interferencias, y fenómenos relacionados con las partículas, como las colisiones inelásticas.

Según la teoría de transporte radiativo, la radiancia  $L(r, \vec{s})$  de la luz en la posición  $r$  que se propaga en la dirección descrita por el vector unitario  $\vec{s}$ , es disminuida debido a la absorción y el scattering y aumentada por la luz que se propaga en dirección  $\vec{s}'$  pero que ha sido dispersada en dirección  $\vec{s}$ . La ecuación de transporte radiativo que describe este fenómeno es:

$$\vec{s} \cdot \nabla L(r, \vec{s}) = -(\mu_a + \mu_s)L(r, \vec{s}) + \mu_s \int_{4\pi} p(\vec{s}, \vec{s}')L(r, \vec{s}')d\omega'$$

Donde  $\mu_a$  es el coeficiente de absorción,  $\mu_s$  es el coeficiente de scattering,  $\mu_t$  el coeficiente de atenuación,  $d\omega'$  es el ángulo sólido diferencial en la dirección  $\vec{s}'$  y  $p(\vec{s}, \vec{s}')$  es la función de fase.

La función de fase describe la distribución angular para una única dispersión, y es generalmente una función que depende del ángulo entre  $\vec{s}$  y  $\vec{s}'$ . Si la integral de la función de fase se normaliza ( $=1$ ),  $p(\vec{s}, \vec{s}')$  es la función de densidad de probabilidad de scattering de la dirección descrita por  $s$  a la dirección descrita por el vector  $s'$ :

$$\int_{4\pi} p(\vec{s}, \vec{s}')d\omega' = 1$$

Normalmente, la función de fase no es conocida. Ella se caracteriza a través del parámetro  $g$  (factor de anisotropía):

$$g = \int_{4\pi} p(\vec{s}, \vec{s}') (\vec{s} \cdot \vec{s}') d\omega'$$

La ecuación de transporte radiativo asume que las partículas (que causan la absorción y el scattering) están uniformemente distribuidas a través del medio y que no hay interacciones entre ellas.

Debido a la gran dificultad que supone resolver la ecuación de transporte radiativo, se han hecho aproximaciones con respecto a la radiancia y/o función de fase. El tipo de aproximación que se puede emplear para calcular la distribución de la luz a través de los tejidos biológicos, depende del tipo de irradiancia (difusa o colimada) y de si hay una variación del índice de refracción.

### 1.3.2.1. Teoría de la Difusión

En la teoría difusa, la función de fase es representada por el valor medio del ángulo de scattering ( $g$ =factor de anisotropía), que está combinado con el coeficiente de scattering para obtener el coeficiente reducido de transporte de scattering:

$$\mu'_s = \mu_s (1 - g)$$

El albedo óptico reducido o albedo de transporte ( $\alpha'$ ) es definido como:

$$\alpha' = \frac{\mu'_s}{\mu_a + \mu'_s}$$

Utilizando la teoría de la difusión, Flock et al. (1989) han encontrado una ecuación que expresa la reflectancia difusa ( $R$ ) como una función del albedo de transporte ( $\alpha'$ ):

$$R_{\infty} = \frac{a'}{1 + 2k(1 - a') + \left(1 + \frac{2k}{3}[3(1 - a')]^{1/2}\right)}$$

donde  $k=(1-r_d)/(1+r_d)$  y  $r_d$  es el coeficiente de reflexión interna del medio. Esta ecuación se puede emplear para calcular la reflectancia difusa de un medio cuyo albedo de transporte y coeficiente de reflexión interna sean conocidos. También hay que suponer que los fotones que se detectan han viajado difusamente dentro del medio, lo que supone que hayan sufrido múltiples dispersiones. Por lo tanto, la ecuación de determinación de la reflectancia difusa no sirve si la gran mayoría de los fotones que se detectan provienen de capas superficiales del material, lo que supone que los fotones hayan sufrido pocas dispersiones dentro de la muestra.

### 1.3.2.2. Método Adding-Doubling

Prahl et al. (1993) desarrollaron un nuevo método para determinar las propiedades ópticas de los medios turbios, iterando una solución *Adding-Doubling* para la ecuación de transporte de radiativo. Se obtuvieron valores de la reflectancia total, considerando radiación incidente normal a la superficie y varios valores del albedo, grosor óptico, condiciones límite y scattering isotrópico o anisotrópico (Prahl, 1988). Los valores obtenidos para scattering isotrópico están en acuerdo con los valores obtenidos por Giovanelli (1955). Para el caso anisotrópico, Prahl et al. (1993) emplearon la función de fase de Henvey-Greenstein, que es frecuentemente utilizada para describir la dispersión de la luz en medios biológicos.

Jacques (1999), utilizando tanto el método *Adding-Doubling* como el método Monte Carlo, obtuvo, para la reflectancia difusa de un medio que presenta un scattering anisotrópico descrito por la función de fase Henyey-Greenstein y considerando una variación del índice de refracción entre medio y aire de 1,33, la siguiente expresión:

$$R_{\infty} = \exp\left\{\frac{-7.8}{\left[3(1 + \mu'_s/\mu_a)\right]^{1/2}}\right\}$$

En una publicación posterior, Jacques (2000) estableció que el valor 7,8 presente en la ecuación anterior no es una constante ni una función que depende de la variación del índice de refracción, sino un número que depende de  $\mu_a/\mu'_s$ . De todas formas, esta ecuación representa un gran avance en la búsqueda de una expresión analítica de la reflectancia difusa que tenga en cuenta la fuerte anisotropía de la dispersión de la luz que atraviesa un medio biológico.

### 1.3.2.3. Teoría de Kubelka-Munk

La teoría de Kubelka-Munk describe la propagación de la luz difusa a través de una muestra isotrópica. El modelo de Kubelka y Munk (Kubelka y Munk, 1931; Kubelka, 1954) es un modelo de doble flujo que solamente considera el flujo en dos sentidos que se propaga en una muestra de grosor  $d$ . La reflectancia de Kubelka-Munk ( $R$ ) y la transmitancia de Kubelka-Munk ( $T$ ) tienen las siguientes expresiones:

$$R = \frac{\sinh(Sbd)}{a \cosh(Sbd) + b \sinh(Sbd)}$$

$$T = \frac{b}{a \cosh(Sbd) + b \sinh(Sbd)}$$

donde  $S$  y  $K$  son los coeficientes de scattering y absorción de Kubelk-Munk. La ventaja de la teoría de Kubelka-Munk es que los coeficientes de scattering y absorción se pueden expresar en función de la reflectancia y la transmitancia:

$$S = \frac{1}{bd} \ln \left[ \frac{1 - R(a - b)}{T} \right]$$

$$K = (a - 1)S$$

$$a = \frac{1 + R^2 - T^2}{2R}$$

$$b = \sqrt{a^2 - 1}$$

Los modelos que tienen en cuenta cuatro o más flujos, proporcionan resultados mucho más precisos y están en buen acuerdo con los datos experimentales. La principal limitación de esta teoría es que solamente se puede aplicar a muestras con geometría simple. Es de destacar que la simplicidad del modelo de Kubelka-Munk lo ha convertido en un método muy popular para evaluar las propiedades ópticas de los tejidos biológicos.

#### *1.3.2.4. Relación entre los coeficientes de la ecuación de transporte radiativo y los coeficientes de Kubelka-Munk*

Como hemos mencionado anteriormente, la propagación de la luz se puede describir rigurosamente utilizando la ecuación de transporte radiativo, pero su complejidad computacional (sobre todo cuando se quiere llegar a una solución exacta) hace que sea muy difícil de aplicar en la práctica. Aunque se han obtenido valores aproximados derivados de la ecuación de transporte radiativo, la simplicidad de la teoría de Kubelka-Munk y su sencilla solución analítica son los principales motivos de su uso generalizado.

La teoría de Kubelka-Munk no proporciona una conexión explícita entre sus coeficientes y las propiedades ópticas, como es el caso de las teorías basadas en la ecuación de transporte radiativo. Un método para obtener esta conexión es precisamente buscar una relación entre los coeficientes de transporte y los coeficientes de Kubelka-Munk. Esta relación ha sido estudiada por varios autores (Brinkworth, 1972; Gate, 1974; Star et al, 1988; Thennadil, 2008) partiendo siempre de la ecuación de transporte radiativo.

Para la relación entre el coeficiente de absorción de Kubelka-Munk ( $K$ ) y el coeficiente de transporte de absorción ( $\mu_s$ ) se ha establecido:

$$K = 2\mu_a$$

En el caso del coeficiente de scattering de Kubelka-Munk ( $S$ ) y el coeficiente de transporte de scattering ( $\mu_s$ ), la forma general de la relación es:

$$S = y\mu'_a - x\mu_a$$

donde  $\mu'_s = \mu_s(1-g)$  es el coeficiente reducido de transporte de scattering,  $\mu_s$  es el coeficiente de transporte de scattering y  $g$  es el factor de anisotropía.

La formula de Brinkworth (1972) se obtiene para  $x=1$ , la formula de de Star (1988) para  $x=1/4$  y las formulas de Gate (1984) y Thennadil (2008) se obtienen para  $x=0$ . En todos los casos  $y=3/4$ . Thennadil (2008) también demostró que la presencia del término que incluye una contribución de  $\mu_a$  al coeficiente de scattering de Kubelka-Munk conduce a valores físicamente imposibles, especialmente para valores grandes de  $\mu_a$ . Por lo tanto, en este trabajo vamos a considerar  $x=0$ , por lo que la relación entre  $S$  y  $\mu'_s$  es:

$$S = \frac{3}{4}\mu'_s$$

La utilización de esta fórmula tiene un error menor del 3% sobre el rango de las propiedades ópticas consideradas (Thennadil, 2008).

### 1.3.3. Medida de las propiedades ópticas.

Existen varias formas de medir las propiedades ópticas de los medios biológicos. Se pueden separar en dos grandes grupos:

- a) *Medidas directas*: para determinar las propiedades ópticas se utiliza la ley de Lambert-Beer. Entre estos métodos se encuentran la medida de la transmisión

sin dispersión (Flock et al., 1987), medida de la atenuación efectiva (Svaasand et al., 1981) y medidas gonio-fotométricas de la función de fase (Yoon, 1988);

**b) Medidas indirectas:** implican el uso de un modelo teórico de la dispersión de la luz.

- *Métodos no-iterativos:* se utilizan ecuaciones en las cuales las propiedades ópticas están directamente relacionadas con los parámetros medidos. Un ejemplo de este tipo de método es la teoría de Kubelka-Munk.
- *Métodos iterativos:* las propiedades ópticas que se quieren determinar están implícitamente relacionadas con los parámetros medidos. Estos métodos son los más difíciles de aplicar.

#### 1.3.3.1. Métodos directos

Dos de los parámetros independientes que se suelen determinar en los métodos directos, son el coeficiente total de atenuación ( $\mu_t$ ) y el coeficiente de atenuación efectiva ( $\mu_{eff}$ ).

Para determinar  $\mu_t$  se mide la transmisión sin dispersión a través de muestras delgadas (Figura 1.10a). Los resultados son afectados por la geometría de iluminación y medida, por las características de la muestra y las múltiples reflexiones en los bordes de la muestra. Este método es conceptualmente simple, pero muy difícil de utilizar debido al gran problema que supone separar la radiación no-dispersada de la radiación dispersada (que se tiene que medir).

El coeficiente de atenuación efectiva se estima por medio de la medida de la fluencia determinada con unos detectores intersticiales, como se muestra en la Figura 1.10b. Este es el parámetro más simple y más fácil de medir. Los detectores de fibra óptica se tienen que situar en la región de difusión de la muestra irradiada. Es muy importante que el campo de medida sea dentro de la región de difusión porque, si no

es así, la orientación de la fibra con respecto al haz incidente y su apertura numérica van a introducir errores experimentales.

### 1.3.3.2. Métodos indirectos no-iterativos

Este tipo de métodos requieren expresiones simples que relacionen las propiedades ópticas con los valores medidos de transmisión y reflexión. Vamos a presentar a continuación dos de los métodos más empleados:

- El primer método emplea el cálculo de los coeficientes de scattering y absorción de Kubelk-Munk ( $S$  y  $K$ ) a partir de las medidas de la reflexión difusa y la transmisión para una irradiancia difusa, aplicando las formulas que relacionan estos parámetros con los coeficientes de transporte de scattering y absorción. Este método requiere una fuente perfecta de irradiación difusa (Figura 1.10c).
- El segundo método supone la determinación de los coeficientes de scattering, absorción y anisotropía a partir de las medidas de la reflectancia difusa y la reflexión, empleando las formulas descritas por Gemert et al (1987). A diferencia del método anterior, se determinan los coeficientes de Kubelka-Munk, se calculan los coeficientes de transporte y se combinan con una medida de la transmisión sin dispersión. Tiene las mismas limitaciones que el primer método.

Existen otros tipos de métodos indirectos. Un ejemplo es la combinación de la absorbancia de una muestra situada dentro de una esfera integradora y las medidas de la función de fase (Arnfield et al., 1988). Otro (Marijnissen y Star, 1984), consiste en la combinación de la medida de los patrones de radiancia angular con las medidas del coeficiente de atenuación efectiva ( $\mu_{eff}$ ) para poder calcular  $\mu_a$ ,  $\mu_s$  y  $g$ .

### 1.3.3.3. Métodos indirectos iterativos

Al contrario que los métodos no-iterativos, este tipo de procedimientos pueden utilizar soluciones complicadas de la ecuación de transporte radiativo. Ejemplos de

este tipo de técnicas son la teoría difusa o de la difusión, el método *Adding-Doubling* y el método Monte-Carlo. Este tipo de método requiere por lo menos dos de las siguientes medidas:

- Transmisión total de un haz colimado o de una irradiancia difusa.
- Reflexión total de un haz colimado o de una irradiancia difusa.
- Absorbancia de la muestra situada dentro de una esfera integradora.
- Transmisión sin dispersión para un haz colimado.
- Distribución angular de la radiación emitida de una muestra irradiada.

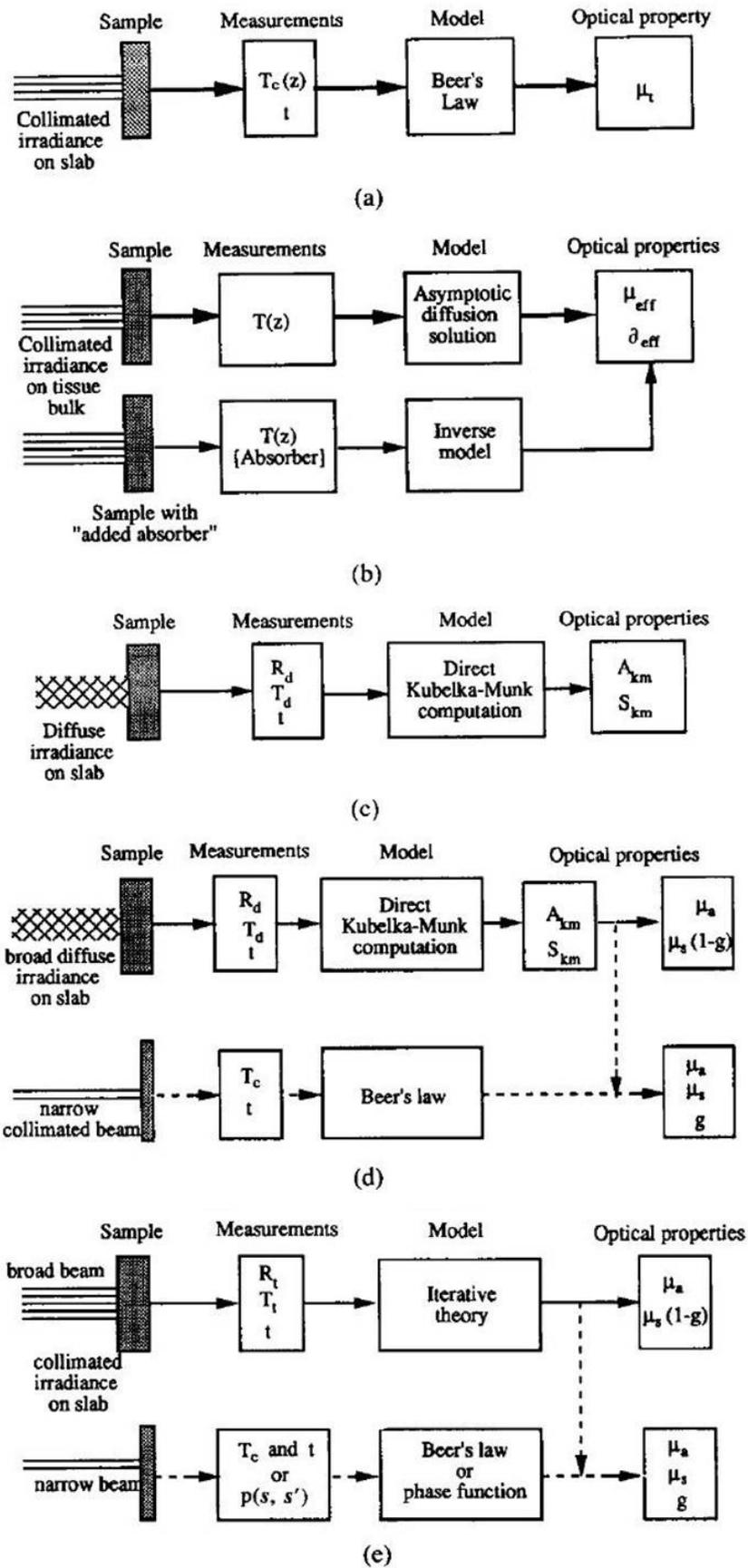
Normalmente,  $\mu_a$  y  $\mu_s'$  se pueden obtener solamente con las medidas de la reflexión total y de la transmisión (Figura 1.10e). Una tercera medida de la transmisión sin dispersión o de la función de fase, nos permite calcular, además de los dos términos de arriba,  $\mu_s$  y  $g$ .

#### 1.3.4. Fuentes de error

En el cálculo para los coeficientes ópticos se pueden cometer una serie de errores debidos a:

- La condición fisiológica de la muestra, nivel de hidratación, homogeneidad, rugosidad superficial, medidas *in vivo-ex vivo-in vitro*, etc.
- La geometría de iluminación y medida.
- La orientación de los detectores de fibra óptica con respecto a la muestra y su apertura numérica.
- La resolución angular de los foto-detectores.
- La separación entre la radiación dispersada y la radiación no-dispersada.
- Limitaciones teóricas.

Todos estos factores se deben de tener en cuenta a la hora de realizar las medidas, en el cálculo de los coeficientes ópticos y también cuando se comparan los resultados con los de otros investigadores.



**Figura. 1.10.** Métodos de medida de las propiedades ópticas de los tejidos biológicos (Tomada de Cheong et al., 1990)

## 1.4. ABERRACIONES OCULARES

La mejora de la calidad de la imagen que se forma en retina es un tema que ha preocupado al mundo científico desde hace años. Inicialmente se atribuía la incapacidad de obtener imágenes nítidas exclusivamente a la existencia de un astigmatismo corneal irregular no compensado. Se observó que incluso tras la adaptación de lentes de contacto rígidas permeables a los gases (RPG) en estos ojos, los sujetos seguían refiriendo falta de nitidez. Esto ha llevado a pensar que no solo es el desenfoque (propio de los defectos refractivos como miopía, hipermetropía y astigmatismo regular e irregular) el que afecta a la calidad de estas imágenes.

En ingeniería óptica es frecuente evaluar la calidad de imagen de un sistema óptico mediante el cálculo de las desviaciones que sufren rayos paralelos con respecto a las trayectorias ideales. En un sistema óptico perfecto (limitado por difracción), todos los rayos que entran por la pupila inciden en el mismo punto en el plano imagen que,

en el caso del ojo, se trataría de la retina. Las desviaciones angulares con respecto a la trayectoria ideal se denominan aberraciones transversales.

La representación habitual de las aberraciones de un sistema óptico se realiza en términos de la aberración de frente de onda; de ahí el tecnicismo “aberración de onda”. El frente de onda es normal a las trayectorias de los rayos. Conocidas las aberraciones transversales para cada posición de entrada del rayo en la pupila, es posible estimar la aberración de onda.

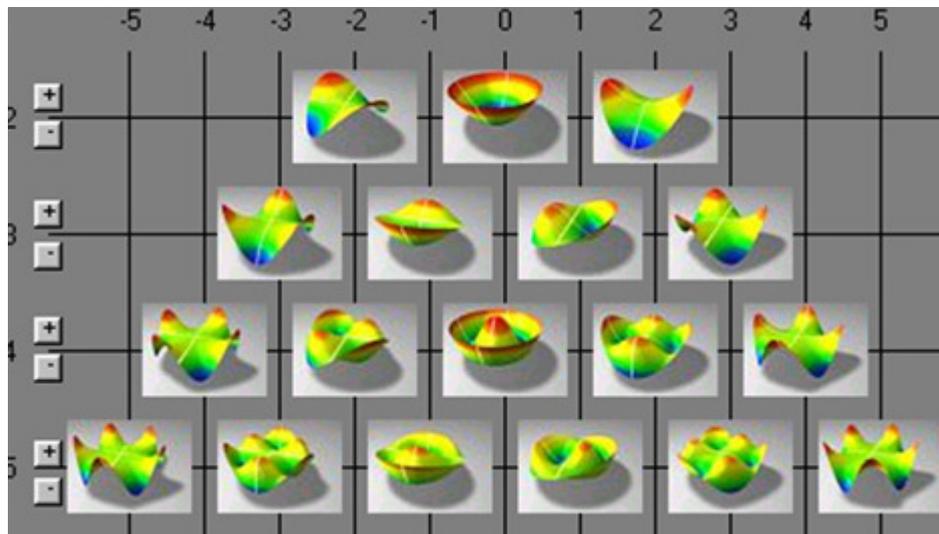
Un sistema óptico perfecto transforma un frente de onda plano en un frente de onda esférico, que converge en la imagen de un punto limitada por difracción. Un sistema óptico con aberraciones distorsiona el frente de onda con respecto al frente de onda esférico inicial. Para un ojo perfecto (esto es, sin aberraciones o limitado por difracción), la aberración de onda es plana. Por aberración de onda se entiende la diferencia entre el frente de onda distorsionado y el frente de onda ideal.

De este modo queda determinado que la aberración de onda de un sistema óptico cualquiera (sin simetría de rotación, como es el caso del ojo humano) puede quedar representado por una función polinomial, basada en la expansión de los coeficientes de Zernike (1975), del tipo:

$$W(X, Y) = W_1X + W_2Y + W_3X^2 + W_4XY + W_5Y^2 + W_6X^3 + W_7X^2Y + W_8XY^2 + W_9Y^3 + W_{10}Y^4 + W_{11}X^3Y + W_{12}X^2Y^2 + W_{13}XY^3 + W_{14}Y^4$$

*+ otros términos de mayor orden*

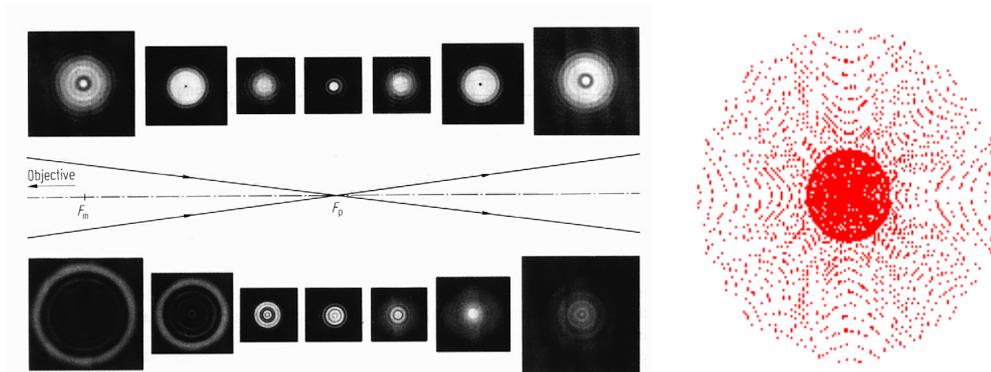
Donde X e Y son las coordenadas referidas a la pupila de entrada del sistema, y los coeficientes 1 y 2 se refieren a efectos prismáticos o de distorsión, los 3, 4 y 5 al desenfoque y al astigmatismo, los 6, 7, 8 y 9 al coma y los 10, 11, 12, 13 y 14 a la aberración esférica.



**Figura 1.11.** Representación de los polinomios de Zernike hasta el orden 5.

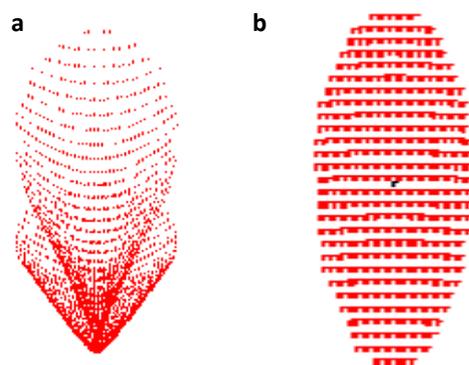
Los coeficientes de Zernike de orden inferior remiten a errores de refracción. Así, los coeficientes de primer orden representan un prisma, y los de segundo, un desenfoque que caracteriza a la miopía, hipermetropía y astigmatismo. En cambio, los términos de alto orden incluyen:

- La **aberración esférica**: indica un desenfoque variable con el diámetro de la pupila y produce halos en las imágenes. Según se produzca el corte de los rayos con respecto a la imagen paraxial perfecta, podemos diferenciar entre aberración esférica positiva y aberración esférica negativa. Se suele considerar que muchos ojos tienen aberración esférica positiva cuando están acomodando y que tienen una tendencia a la aberración esférica negativa cuando no acomodan (Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Representación de la imagen de un punto que reproduce un sistema óptico afectado solo de aberración esférica según se localice el punto de corte de los rayos con el eje óptico del sistema.

- La **aberración de coma**: esta aberración de tercer orden, carece de simetría rotacional y produce imágenes dobles. En este tipo de aberración la distribución de la luz no es uniforme sino que existe una concentración de la luz en el extremo puntiagudo. Según algunos estudios esta aberración varía desde  $-0,128$  hasta  $+0,108\text{mm}^{-2}$  y se puede encontrar alterada por los cambios en la acomodación (Figura 1.13a).
- La **aberración de astigmatismo**: la superficie generada al igual que el caso anterior carece de simetría de rotación. Un rayo que entra en el ojo será enfocado en dos líneas diferentes y perpendiculares entre sí y en diferentes posiciones del ojo (Figura 1.13b)



**Figura 1.13.** Representación gráfica de la imagen de un punto afectada solo de a) aberración de coma; b) aberración de astigmatismo.

Generalmente la falta de simetría de rotación viene dada por al menos la falta de simetría de una de las superficies, siendo normalmente en la córnea, por el cambio de radio de curvatura a lo largo de su superficie.

No fue posible la medida de las aberraciones directamente y de manera objetiva hasta 1969 cuando Berny hizo posible esta medida mediante un *test de Foucault* (Berny y Slansky, 1969). Previamente solo se llevaban a cabo valoraciones indirectas de la Función de Transferencia Óptica (OTF) o medidas psicofísicas de las aberraciones del ojo.

Actualmente, se han desarrollado nuevas técnicas y aparatos para la medida directa de estas aberraciones, como pueden ser:

- ***Técnica de doble paso (D-P)***. Se proyecta una fuente puntual en la retina. La imagen de vuelta se forma, tras pasar dos veces por los medios oculares, sobre una cámara CCD. La función de transferencia de modulación (MTF) del ojo se puede obtener directamente de dicha imagen aérea.
- ***Técnica de Shack-Hartmann (SH)***: Se proyecta una fuente puntual sobre la retina; el frente de onda se muestrea, a la salida, con una matriz de microlentes. Un frente de onda perfecto forma múltiples imágenes aéreas en el punto focal de las microlentes. Para un frente de onda distorsionado, cada microlente muestrea una porción inclinada del frente de onda, de modo que las correspondientes imágenes se desvían de las posiciones ideales. A partir de estas desviaciones, se estima la aberración de onda en función de la posición en la pupila. (Thibos, 2000)
- ***Técnicas de trazado de rayos por láser (“Laser Ray Tracing”, o LRT) y refractómetro de resolución espacial (“Spatially Resolved Refractometer”, o SRR)***. Ambas técnicas son secuenciales. Muestran el frente de onda en el camino de entrada hacia el ojo. En ambos aberrómetros, los rayos de luz entran en el ojo por distintas partes de la pupila. Por efecto de las aberraciones, los rayos se desvían con respecto al correspondiente a una

pupila centrada. En el LRT, se captan imágenes sobre una cámara CCD, a medida que un haz láser escanea el ojo, mientras que en el SRR es el propio sujeto el que alinea el haz con respecto de una referencia usando una palanca. La aberración de onda se estima a partir de estas desviaciones en función de la posición en la pupila (Moreno-Barriuso y Marcos, 2001).

## **1.5. INGENIERÍA TISULAR**

La Ingeniería Tisular es una nueva área de la biotecnología cuyo objetivo es la fabricación de equivalentes tisulares orgánicos que puedan ser utilizados para la sustitución de tejidos y órganos dañados (Langer y Vacanti, 1993; Nerem y Sambanis, 1995).

### **1.5.1. Conceptos generales de Ingeniería Tisular.**

El rápido desarrollo que ha experimentado esta disciplina durante los últimos años se justifica por dos factores de gran importancia:

- Las listas de espera en la cirugía de transplantes, así como la escasez de donantes.

- La utilización de prótesis autólogas que permite eliminar el riesgo de rechazo del injerto así como la utilización de inmunosupresores tras su implantación (Sher et al., 1983).

Según Bell (1995), la fabricación de sustitutos o prótesis biológicas mediante Ingeniería Tisular se basa en tres pilares: células, matrices extracelulares y factores de crecimiento y diferenciación.

Asimismo, para crear una prótesis biológica que se pueda implantar con éxito, son necesarios tres factores: tecnología celular, tecnología de constructos e integración en un sistema vivo.

#### 1.5.1.1. Tecnología celular.

a) *Fuentes celulares*: Lo primero que se necesita para fabricar un equivalente tisular es una adecuada fuente de células viables que nos permita elaborar los órganos deseados. Estas células deben tener una adecuada capacidad de proliferación, y además estar libres de patógenos y de contaminación. Los tres tipos de fuentes celulares que se pueden utilizar en Ingeniería Tisular son:

- células autólogas: proceden del propio paciente y no producen respuesta inmunológica.
- Células heterólogas o alogénicas: pertenecen a otro individuo de la misma especie, por lo que producen respuesta inmunológica en el huésped.
- células xenólogas o xenogénicas: proceden de un individuo de otra especie, por lo que producen respuestas inmunológicas agudas o hiperagudas y obligan a descartar la transmisión de virus animales al huésped.

b) *Función celular*: Una vez obtenidas las células, en ocasiones debemos manipularlas para obtener las características funcionales deseadas. Esto se puede

conseguir mediante modificación del medio extracelular o por manipulación genética de las células.

c) *Tecnología de células madre*: Las células madre son la principal fuente de células para la Ingeniería Tisular y la terapia regenerativa (Solter, Gearhart, 1999). Las células madre humanas aisladas pueden ser de varios tipos. Atendiendo a su origen, las células madre se clasifican en embrionarias (aisladas a partir de la masa celular interna de embriones humanos en fase de blastocisto) y adultas (aisladas a partir de tejidos adultos). Atendiendo a su potencialidad, las células madre pueden ser totipotenciales, multipotenciales, pluripotenciales o unipotenciales. Las células totipotenciales son aquellas que son capaces de generar cualquier tipo de tejido e incluso un organismo completo. Por otro lado, aquellas células destinadas a la generación de cualquier tipo de tejido, pero no de un organismo completo, se denominan pluripotenciales, mientras que las células multipotenciales ya están dirigidas hacia una estirpe específica de células (por ejemplo, las células de la sangre). Finalmente, las células unipotenciales sólo pueden diferenciarse hacia un tipo específico de células. La mayoría de las células madre adultas son unipotenciales o multipotenciales, mientras que las totipotenciales y las pluripotenciales son de origen embrionario.

#### *1.5.1.2. Tecnología de constructos*

Una vez seleccionada una fuente útil de células, el siguiente paso es desarrollar un modelo tridimensional (constructo), en el cual esas células se organicen en una arquitectura espacial tridimensional, con características funcionales similares a las del tejido que queremos sustituir. Las diferentes posibilidades son, fundamentalmente, las matrices celulares, los constructos con células cultivadas y los automontajes celulares (Tabla 1.3.) (Auger FA et al., 1995; Griffith LG y Naughton G, 2002; Khademhosseini A et al., 2006).

Tipo	Características
<i>Matriz celular</i>	Requiere la colonización por células del huésped, una vez implantado
<i>Constructo polimérico con células cultivadas</i>	Se utiliza una matriz extracelular artificial en la cual se cultivan las células madre del tejido que se quiere sustituir
<i>Automontaje celular</i>	La matriz extracelular es sintetizada por las propias células (Auger et al., 1995)

**Tabla 1.3.** Principales tipos de constructos elaborados mediante Ingeniería Tisular.

Una vez fabricado el constructo, éste debe ser implantado en el receptor en las mejores condiciones, bien en fresco (dentro de los primeros 5 días desde su fabricación) (Parenteau, 1999), o bien conservado a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Naughton, 1999) hasta el momento de su implante.

#### 1.5.1.3. Integración en un sistema vivo

Todo constructo implantado en un ser vivo debe cumplir unos criterios mínimos de viabilidad y funcionalidad. Para evitar el rechazo del injerto por parte del huésped, el constructo debe ser aceptable inmunológicamente, lo cual ocurre siempre que las células son autólogas. Sin embargo, si este no es el caso, deben buscarse otras soluciones mediante la ingeniería de aceptación inmunológica. Por ejemplo, es sabido que para que se desencadene una reacción inmune, no sólo debe haber un reconocimiento por parte del huésped de una sustancia considerada como cuerpo extraño, sino que, además, debe existir una señal coestimuladora. En los trasplantes alogénicos, se ha demostrado que esta señal coestimuladora se puede bloquear farmacológicamente, aumentando así las posibilidades de éxito del implante (Larsen et al., 1996).

Finalmente, el constructo debe ser biocompatible, lo cual significa que el órgano implantado debe adaptarse a la zona receptora y llevar a cabo las funciones

específicas de ese tejido sin generar ningún tipo de respuesta inflamatoria local. En ocasiones, una respuesta inflamatoria independiente de la respuesta inmune puede hacer fracasar el implante. Esto es especialmente importante, por ejemplo en el caso de sustitutos de vasos sanguíneos que produzcan fenómenos de trombosis por no ser biocompatibles.

### 1.5.2. Aplicación de la Ingeniería Tisular a la construcción de córneas

Como estructura avascular, la córnea es un excelente candidato para la Ingeniería Tisular. Un constructo corneal debe llevar a cabo de forma eficiente todas las funciones de la córnea, incluyendo la de la barrera frente a agentes externos y la de permitir la transmisión y refracción de la luz. Además, debe tener una forma y curvatura adecuadas y debe poder ser implantado quirúrgicamente.

La necesidad de un sustituto corneal autólogo es real, debido a la escasez de donantes (muy importante en países subdesarrollados, ya sea por motivos religiosos, culturales o de infraestructura sanitaria), por el problema del rechazo del injerto alogénico y por la posibilidad de transmisión de enfermedades al huésped.

Podemos hablar de dos grandes grupos de sustitutos corneales permanentes:

- a) *Queratoprótesis permanentes*: Constan de una zona óptica central fabricada con diversos materiales como cristal, PMMA (polimetacrilato), silicona o diversos geles como el PHEMA (poli[2-hidroxietilmetacrilato]) y una zona periférica compuesta por un material biológico (diente o hueso alveolar circundante o tibia) o biocompatible (PTFE, Dacron, PHEMA...) que permite la migración celular desde el huésped hacia la prótesis para contribuir al anclaje de ésta.

- b) *Equivalentes o constructos corneales*: Fabricados mediante Ingeniería Tisular con células corneales cultivadas sobre materiales biológicos (Duan et al., 2006).

Nos centraremos a continuación en el estudio de estos últimos.

### 1.5.3. Prótesis corneales biológicas (equivalentes corneales)

Gracias al gran desarrollo que han experimentado en los últimos años las técnicas de cultivo celular y de Ingeniería Tisular, hoy es posible fabricar distintos tipos de sustitutos tisulares humanos a partir de células madre obtenidas mediante pequeñas biopsias del tejido a reparar (Atala, 2000). De igual modo, los avances en la ingeniería de materiales han posibilitado la utilización terapéutica de matrices basadas en fibras de colágeno, fibrina, quitosán, agarosa o ácido poliglicólico, por ejemplo, posibilitando todos estos materiales el cultivo tridimensional de las células de la córnea (Nishida et al., 2004; Reichl et al., 2004; Alaminos et al., 2006; González-Andrades et al., 2009; Scheneider et al., 1999; Zieske et al., 1994; Minami et al., 1993; Chen et al., 2005).

Diversos laboratorios que trabajan en el diseño de constructos corneales mediante Ingeniería Tisular han establecido tres criterios mayores que deben cumplir todos los constructos corneales (Chirila, 1994; Leibowitz et al., 1994): a) el constructo debe permanecer estable en el ojo receptor durante largos periodos de tiempo y no debe actuar como un estímulo inflamatorio o inmunológico; b) la óptica central debe ser transparente y formar una imagen de alta calidad sobre la retina; c) el componente estromal debe permitir el crecimiento en su interior de los queratocitos estromales, la producción y el depósito de matriz extracelular y estar permanentemente fijo. Otros autores han añadido varios criterios adicionales: a) los constructos deben ser anclados mediante la colonización de queratocitos y depósito de proteínas en la interfase para desarrollar suficiente fuerza de tensión, que mantenga el constructo en su sitio. Asimismo, debe tener suficiente fuerza y resistencia para poder ser suturados y evitar

así la extrusión; b) el componente periférico debe permitir el paso de nutrientes a su través; c) la superficie anterior debe estar cubierta por capas de epitelio corneal, el cual debe ser capaz de repararse ante una agresión externa; d) la superficie posterior no debe ser atacada por células o proteínas, esto es, no debe ser susceptible a la degradación enzimática ni al rechazo inmune.

Utilizando técnicas de Ingeniería Tisular, diferentes investigadores han intentado desarrollar un sustituto eficaz de la córnea que pudiera implantarse sin las desventajas del trasplante de córnea heterólogo (Nishida et al., 2004; Nishida, 2003; Reichl et al., 2004). Con este objetivo, algunos investigadores han propuesto diferentes técnicas de Ingeniería Tisular para la construcción de equivalentes corneales de origen animal de espesor parcial o completo como un primer paso en el desarrollo de un sustituto corneal humano (Alaminos et al., 2006; Scheneider et al., 1999; Zieske et al., 1994; Minami et al., 1993). Del mismo modo, se están obteniendo buenos resultados en trasplantes de endotelio cultivado que se están llevando a cabo en modelos animales (Koizumi et al., 2007). E incluso, se ha observado que, en equivalentes corneales porcinos compuestos por epitelio y estroma, se produce una inervación de los mismos que alcanza el epitelio cuando son implantados en un animal receptor mediante queratoplastia lamelar profunda (Li et al., 2003; Liu et al., 2008). Análogamente, recientemente se han realizado algunos ensayos clínicos para evaluar la posible utilidad clínica de la Ingeniería Tisular en el tratamiento de diversas patologías, aunque la mayoría de estos ensayos se basan exclusivamente en cultivos bidimensionales de epitelio corneal. Así, se están realizando trasplantes, de epitelio autólogo cultivado en córneas tratadas mediante queratectomía con láser Excimer con finalidad refractiva (PRK) con la intención de disminuir la incidencia de opacidades tipo Haze, observándose una epitelización inmediata, una disminución de la apoptosis de los queratocitos y una menor formación de colágeno tipo III en la interfase, lo que se asocia a una menor incidencia de Haze. Estos resultados hacen presuponer la utilidad de esta técnica para disminuir la tasa de recidivas en pacientes sometidos a queratectomía fototerapéutica (PTK) por distrofias corneales anteriores o para

acelerar la curación y disminuir la incidencia de leucomas en pacientes con defectos epiteliales corneales persistentes (Hayashida et al., 2006).

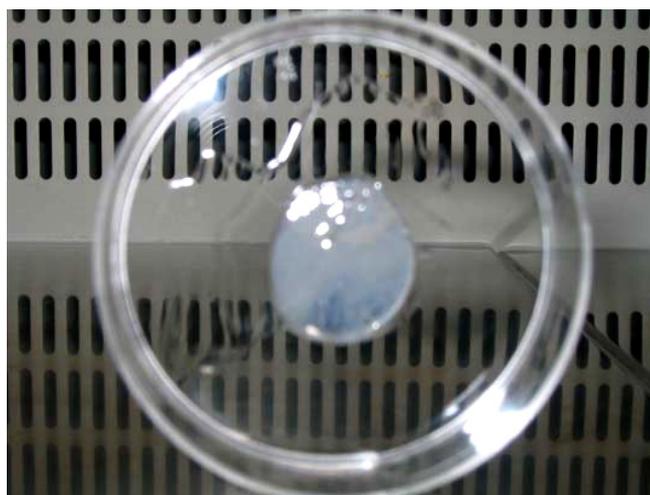
Sin embargo, aunque algunos científicos han desarrollado sustitutos corneales que imitan parcialmente a la córnea humana (González-Andrades et al., 2009; Griffith et al., 1999), hasta la fecha no se ha conseguido desarrollar un constructo corneal de espesor completo con las características histológicas y funcionales de la córnea humana (Koizumi et al., 2007). A pesar de que algunos trabajos reflejan que es posible obtener *ex vivo* un endotelio humano con características similares a las que tiene *in vivo* (monocapa confluyente de células poligonales unidas por zónulas ocluyentes) (Lai et al., 2006), la optimización de las técnicas de cultivo de las células endoteliales corneales humanas continúa siendo uno de los principales escollos que todavía tiene que salvar la Ingeniería Tisular en su búsqueda de un sustituto de la córnea humana de espesor completo.

#### **1.5.4. Biomateriales en la Ingeniería Tisular de la córnea.**

La mayoría de los sustitutos corneales que se están diseñando en la actualidad se fabrican a partir de cultivos tridimensionales de las tres estirpes celulares de la córnea, sobre estromas artificiales fabricados con biomateriales (Nishida, 2003). Un buen biomaterial debería ser biocompatible, transparente y consistente, y las células deberían poder adherirse y crecer sobre él (Miyashita et al., 2006). Los principales biomateriales utilizados para la construcción de córneas en laboratorio son el colágeno, especialmente el tipo I, y la fibrina, aunque también se emplean con éxito otras sustancias como el quitosán, el ácido poliglicólico o los son los geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% (Gonzalez-Andrades et al., 2009; Alaminos et al., 2006; Reichl y Müller-Goymann, 2003; Orwin y Hubel, 2000; Schneider et al., 1999; Griffith et al., 1999; Zieske et al., 1994; Minami et al., 1993).

a) *Matrices de colágeno:*

El colágeno tipo I se ha utilizado durante mucho tiempo en la fabricación de piel artificial, mucosa oral, córnea y otros tejidos (Griffith et al., 1999; Orwin y Hubel, 2000; Reichl y Müller-Goymann, 2003), sin embargo, el colágeno tipo I es un material costoso que tiende a contraerse y a perder volumen cuando se cultivan células en su interior debido a la formación de enlaces no covalentes durante el proceso de gelificación (Ibusuki et al., 2007; Porter et al., 1998; Tegtmeier S et al., 2001). Además, los sustitutos corneales fabricados a partir de colágeno son blandos, poco estables, presentan una escasa transparencia y tienden a degradarse en poco tiempo (Figura 1.14.) (Chen et al., 2005; Doillon et al., 2003; Muñoz-Ávila, 2006). Todo esto hace que en la actualidad se estén haciendo ensayos con colágeno tipo I sometido a diversas técnicas de entrecruzamiento (*cross-linking*) para minimizar e incluso llegar a solventar los problemas que ofrecen las matrices puras de colágeno tipo I. Las sustancias más empleadas en estas técnicas de entrecruzamiento son la N-etil-N'-(3dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y la N-hidroxisuccinamida. Los sustitutos estromales así construidos permiten una transmisión de la luz blanca similar a la de la córnea humana y se han implantado mediante queratoplastia lamelar anterior en cerdos, con un seguimiento medio de 1 año. Tras este período, los sustitutos han permanecido transparentes y han



**Figura 1.14.** *Equivalente corneal, construido en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada, sobre un sustituto estromal a base de colágeno tipo I y empleando células corneales de conejo. Puede observarse la escasa transparencia del constructo. (Tomado de Muñoz Ávila, 2006).*

sufrido una colonización por parte de las fibras nerviosas de la córnea receptora (Liu et al., 2007; Liu et al., 2006; Vrana et al., 2007). También se ha utilizado, para mejorar las propiedades de los geles de colágeno tipo I, el entrecruzamiento fotoquímico empleando riboflavina. Las matrices celulares así obtenidas experimentan una menor retracción, a la vez que la concentración de riboflavina y el tiempo de exposición a la radiación ultravioleta empleado, permiten una viabilidad celular mayor del 90% (Isubuki et al., 2007). Por otro lado, se ha comprobado que la adición de diversos glicosaminoglicanos al colágeno tipo I, entre los que destaca el condroitinsulfato, consigue aumentar la transparencia de los geles de colágeno, a la vez que disminuye su retracción. Este último hecho se asocia a una menor expresión de alfa actina de músculo liso (*alpha-smooth muscle actin*), marcador de miofibroblastos por parte de los queratocitos (Orwin et al., 2003). Además, la estabilización proporcionada por el condroitinsulfato, puede verse reforzada añadiendo un procedimiento de *cross-linking* con glutaraldehído (Doillon et al., 2003). Otra sustancia añadida al colágeno tipo I para estabilizarlo es el alcohol polivinílico. Este tipo de matrices de colágeno con alcohol polivinílico permiten una correcta adhesión de las células epiteliales corneales sembradas sobre ellos y el desarrollo de un epitelio estratificado de características similares a las del epitelio corneal cuando el constructo se somete a la técnica aire-líquido (Miyahsita et al., 2006). También, con la finalidad de mejorar la adhesión del epitelio cultivado al sustituto estromal, se han empleado diversos péptidos de adhesión epitelial unidos a dendrímeros. Los dendrímeros son polímeros sintéticos tridimensionales elaborados a partir de un monómero al que se le añaden nuevas ramas mediante un proceso de fabricación a nanoescala. Los péptidos empleados con esta finalidad (p. ej. YIGSR, YIGSRKQAV, IKVAVYIGSR) se unen a los dendrímeros y estos complejos se emplean como *cross-linkers*, obteniéndose así, sustitutos estromales que favorecen la correcta estratificación de las células epiteliales corneales en ellos sembradas (Duan y Sheardown, 2007). Frente a la EDC y al glutaraldehído, el entrecruzamiento con dendrímeros proporciona matrices estromales de una mayor transparencia y no posee los efectos tóxicos del

glutaraldehído (Duan y Sheardown, 2006). En esta búsqueda de un sustituto estromal lo más parecido posible al estroma corneal nativo, incluso se han conseguido fabricar matrices de colágeno tipo I con lamelas alineadas en las que los queratocitos se disponen paralelos a las fibrillas de colágeno sometiendo el colágeno a un campo electromagnético de 7 Teslas y a ciclos sucesivos de gelificación-rotación-gelificación (Torbet et al., 2007). Frente al colágeno tipo I, el colágeno tipo III parece ofrecer unas mejores propiedades mecánicas y también puede beneficiarse de las técnicas de entrecruzamiento. Tanto el colágeno humano tipo I como el colágeno humano tipo III pueden obtenerse mediante Ingeniería Genética, lo cual evita el riesgo de transmisión de infecciones y de reacciones inmunológicas que supone la utilización de colágeno animal (Liu et al., 2008).

*b) Matrices de fibrina humana:*

Otra sustancia propuesta como sustituto estromal para diferentes constructos tisulares, especialmente para la piel humana, es la fibrina de origen humano (Llames et al., 2004; Meana A et al., 1998). Frente al colágeno, la fibrina ofrece varias ventajas destacando su bajo precio, su disponibilidad, la buena tolerancia a las células, la ausencia de contracción de los constructos con ella elaborados y la posibilidad de su obtención autóloga a partir de sangre del propio paciente. Sin embargo, los geles de fibrina poseen ciertas propiedades, como son una escasa

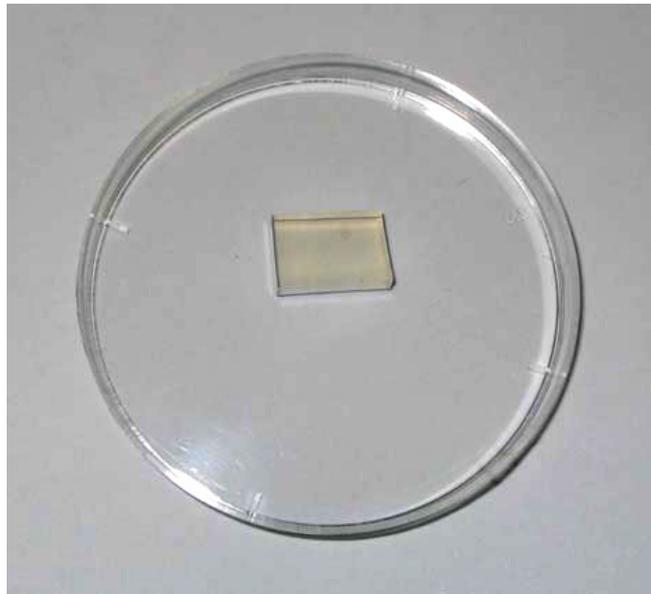


**Figura 1.15.** Gel de fibrina humana con queratocitos en su interior preparado para su utilización como sustituto estromal. (Tomado de Muñoz-Ávila, 2006).

consistencia y una transparencia escasa, que limitan su utilización en la fabricación de sustitutos corneales (Figura 1.15.)

c) *Matrices de agarosa:*

La agarosa y otros compuestos, aunque presentan buena transparencia y correcta consistencia para su manipulación, son utilizados con menos frecuencia en Ingeniería Tisular, debido al escaso crecimiento que muestran las células estromales cuando se incluyen en hidrogeles de estos materiales y la deficiente adhesión de las células epiteliales corneales cultivadas sobre ellos (Aufderheide y Athanasiou, 2005) (Figura 1.16.).



**Figura 1.16.** Sustituto estromal de agarosa al 2% con queratocitos inmersos en su interior. Es apreciable la gran transparencia del sustituto estromal. (Tomado de Muñoz-Ávila, 2006).

d) *Matrices de fibrina humana y agarosa al 0,1%:*

Como hemos dicho anteriormente, la agarosa, *per se*, presenta ciertos inconvenientes que hacen de ella una sustancia poco útil para la Ingeniería Tisular de la córnea. Sin embargo, su adición a la fibrina humana en forma de geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% puede ser una alternativa interesante a la hora

de fabricar un sustituto corneal. La agarosa mejora la transparencia y aumenta la consistencia de las matrices de fibrina humana, por lo que los geles de fibrina humana y agarosa al 0,1% se caracterizan por presentar una buena transparencia con una correcta adhesión de las células epiteliales, estromales y endoteliales, permitir ser suturados y no experimentar la retracción observada en las matrices puras de colágeno, además de resultar más económicos (Figura 1.17.) (Alaminos *et al.*, 2006). Utilizando este tipo de biomateriales González-Andrades y colaboradores (2009) han generado y descrito un método, el cual, permite elaborar sustitutos corneales humanos lamelares de fibrina y agarosa con epitelio humano cultivado en su superficie, utilizando técnicas de cultivo aire-liquido. Este tipo de técnica consigue desarrollar un epitelio muy similar al epitelio de córneas humanas nativas, como demuestran los análisis genéticos de plakoglobina 3 (PKG3), desmogleína 3 (DSG3) y desmoplaquina (DSP), zónula ocludens 1 (ZO-1) y 2 (ZO-2) y conexina 37 (Cx37) llevados a cabo por los autores. Estos resultados sugieren que las córneas lamelares generadas mediante Ingeniería Tisular podrían ser estructural y funcionalmente análogas a la córnea humana nativa.



**Figura 1.17.** *Equivalente corneal de espesor completo generado en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada fabricado utilizando células epiteliales, estromales y endoteliales de conejo y empleando un gel de fibrina humana y agarosa al 0,1% como base del sustituto estromal. La transparencia del constructo permite apreciar los números de la guía de referencia. (Tomado de Alaminos *et al.*, 2006).*



# Capítulo 2

## Objetivos



## **OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es elaborar un modelo de estroma corneal humano artificial generado mediante Ingeniería Tisular basado en biomateriales de Fibrina y Agarosa y caracterizarlo desde un punto de vista histológico y de sus propiedades ópticas para validar su utilidad en medicina regenerativa.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para conseguir este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Generar en laboratorio un modelo de estroma corneal artificial con queratocitos humanos inmersos en una matriz extracelular de Fibrina con concentraciones crecientes de Agarosa (0%, 0,025%, 0,05%, 0,1%, 0,2% y 0,3%).

2. Evaluar histológicamente el modelo de estroma corneal humano artificial en distintos niveles de desarrollo, desde la semana 0 a la semana 8.
3. Caracterizar desde el punto de vista óptico el modelo de estroma corneal humano artificial mediante el coeficiente de *scattering* reducido ( $\mu_s'$ ), el coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ), y el albedo de transporte ( $a'$ ) en los distintos niveles de desarrollo.
4. Evaluar la transmitancia del modelo de estroma corneal humano artificial en el rango de luz visible y la radiación ultravioleta (UV) en los distintos niveles de desarrollo.
5. Medir el índice de refracción del modelo de estroma corneal humano artificial para la estimación de la calidad de la imagen retiniana.
6. Establecer, en base a las propiedades histológicas y ópticas, los modelos de estroma corneal humano artificial de posible utilidad en medicina regenerativa.

# Capítulo 3

## Material y Método



### **3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS MODELOS DE ESTROMA CORNEAL HUMANO ARTIFICIAL MEDIANTE INGENIERÍA TISULAR.**

#### ***3.1.1. Obtención de limbos esclero-corneales humanos.***

Los limbos esclero-corneales humanos de los que se tomaron los queratocitos estromales utilizados en esta Tesis Doctoral proceden de los tejidos remanentes tras los trasplantes de córnea realizados en el Hospital Universitario San Cecilio de Granada. Toda la metodología empleada fue aprobada por la Comisión de Investigación y la Comisión de Ética del Hospital Universitario de San Cecilio de Granada y de la Universidad de Granada.

Para los procedimientos de extracción, almacenamiento e implante, se siguieron las directrices recogidas en el protocolo para almacenamiento y preservación

de córneas firmado por los Servicios de Oftalmología y la Coordinación de Trasplantes de dichos hospitales y el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco Sectorial de Tejidos de Granada-Almería (CRTS-Granada-Almería) (Documento TEJ/PRO/06) y que se describen a continuación.

#### *3.1.1.1. Extracción.*

El procedimiento de extracción de las córneas se realizó mediante la enucleación y posterior tallado de la córnea bajo microscopio en el quirófano de Oftalmología. Para su transporte desde el lugar de la extracción hasta el quirófano de Oftalmología, el globo ocular fue suspendido en una cámara húmeda (frasco de urocultivo en cuyo interior se colocó una gasa estéril empapada en colirio de gentamicina y suero fisiológico 0,9% al 50%).

Las córneas fueron extraídas junto con el limbo esclero-corneal, introducidas en el medio de conservación de córneas (Optisol®) indicando si es derecha o izquierda y enviadas al Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería junto con el protocolo de donación correctamente cumplimentado y las muestras sanguíneas (dos tubos de hematimetría y uno de bioquímica).

#### *3.1.1.2. Almacenamiento.*

El almacenamiento de las córneas en el CRTS asegura la custodia de las mismas en condiciones óptimas de conservación. Allí mismo se comprobó toda la documentación recibida, registrándose y realizándose todas las determinaciones analíticas complementarias necesarias. Si la córnea cumplía todos los requisitos pasaba a situación de distribución a la espera de ser implantada. El tiempo máximo para que la córnea pase a ser apta para la distribución es de 48-72 horas (96 horas si se trata de fin de semana) y el tiempo total óptimo desde la extracción hasta el implante es de 8 días

(aunque el medio de conservación actualmente utilizado permite su almacenamiento hasta 14 días).

### **3.1.2. Desarrollo de los cultivos celulares primarios de queratocitos a partir de células procedentes de limbos esclero-corneales humanos.**

Transcurrido el período de transporte, los anillos o rodetes corneales (limbos esclero-corneales remanentes tras la queratoplastia) fueron lavados dos veces en una solución estéril de PBS con penicilina, estreptomycin y anfotericina B (500U/ml, 500µg/ml y 1,25µg/ml respectivamente) para eliminar los restos de sangre, fibrina, grasa o materiales extraños que pudieran encontrarse adheridos a los mismos.

Para obtener los queratocitos estromales a partir de estos anillos esclero-corneales humanos utilizamos los fragmentos de córnea humana que iban adheridos a los rodetes corneales. En primer lugar, se extirpó mecánicamente la membrana de Descemet y el endotelio corneal. A continuación, se eliminó la mayor parte de las células epiteliales mediante el raspado con un escarificador. Finalmente, el estroma corneal remanente se separó quirúrgicamente del limbo esclero corneal y se dividió en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm de longitud, los cuales se incubaron en una solución de colagenasa I de *Clostridium histolyticum* al 2% para digerir la matriz extracelular y liberar así los queratocitos estromales. Los queratocitos corneales humanos así obtenidos se recogieron mediante centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos y se sembraron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie en presencia de medio de cultivo para queratocitos. Este medio, desprovisto de factores de crecimiento, estaba compuesto por:

- Medio de cultivo de Dubelcco modificado por Eagle (DMEM) (Sigma-Aldrich ref. D1145, Steinheim, Alemania), el cual no contenía rojo de fenol en su composición para no alterar las condiciones ópticas de los cultivos.

- Suero bovino fetal (SBF) a concentración final del 10% (Sigma-Aldrich ref. F9665, Steinheim, Alemania).
- Solución antibiótica y antifúngica especial para cultivos celulares (Gibco BRL Life Technologies, Karsruhe, Alemania) hasta una concentración final del 1% (equivalente a 100U/ml de penicilina G, 100µg/ml de estreptomina y 0,25µg/ml de anfotericina B).

Después de este proceso, se incubaron a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo celular. Los medios de cultivo fueron renovados cada tres días.

### **3.1.3. Subcultivo de los cultivos primarios de queratocitos humanos.**

Una vez alcanzada la subconfluencia, los distintos cultivos celulares se lavaron en PBS estéril y se incubaron en 1ml de una solución de tripsina 0,5g/l y EDTA 0,2g/l (Sigma Aldrich ref. T4799, Steinheim, Alemania) a 37°C durante 10 minutos para disgregar los mecanismos de adhesión celular y obtener células individualizadas y no adheridas a la superficie del frasco de cultivo. Una vez que las células se desprendieron de la superficie de los frascos de cultivo, se procedió a inactivar la tripsina utilizada mediante adición de 1ml de medio de cultivo de queratocitos. La presencia de abundantes proteínas séricas en este medio de cultivo es capaz de desactivar la acción proteolítica de la tripsina. Posteriormente, la solución inactivada en la cual se localizaban las células desprendidas se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos para obtener un *pellet* o botón celular con las células de interés, desechándose el sobrenadante con la tripsina. El *pellet* celular se resuspendió cuidadosamente en 5ml de medio y éstas células se cultivaron en frascos de cultivo de 75cm<sup>2</sup> de superficie. Los cultivos de queratocitos estromales se expandieron hasta unas quince veces antes de su uso para fabricar los sustitutos corneales. En cualquier caso, y para asegurar la adecuada viabilidad celular, la elaboración de sustitutos corneales humanos se llevó a cabo utilizando células correspondientes a los primeros subcultivos.

### 3.1.4. Elaboración de los sustitutos de estroma corneal.

Para la generación de geles de Fibrina y Agarosa se utilizó plasma sanguíneo humano congelado procedente de donantes sanos (cedido por el Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada-Almería, España) siguiendo las normas y recomendaciones de la Asociación Española de Bancos de Tejidos (AEBT). La fabricación de dichos sustitutos estromales de Fibrina humana y Agarosa con queratocitos corneales humanos se llevó a cabo utilizando la modificación de la técnica descrita previamente por Llames y Meana (Llames et al., 2004; Meana et al., 1998) y utilizada en el Departamento de Histología de la Universidad de Granada (Alaminos et al., 2006; Muñoz-Ávila, 2006; Gascón, 2008; Gozález-Andrades, 2009). Para ello, se utilizaron alrededor 10.000 células/ml de constructo procedentes de los cultivos primarios.

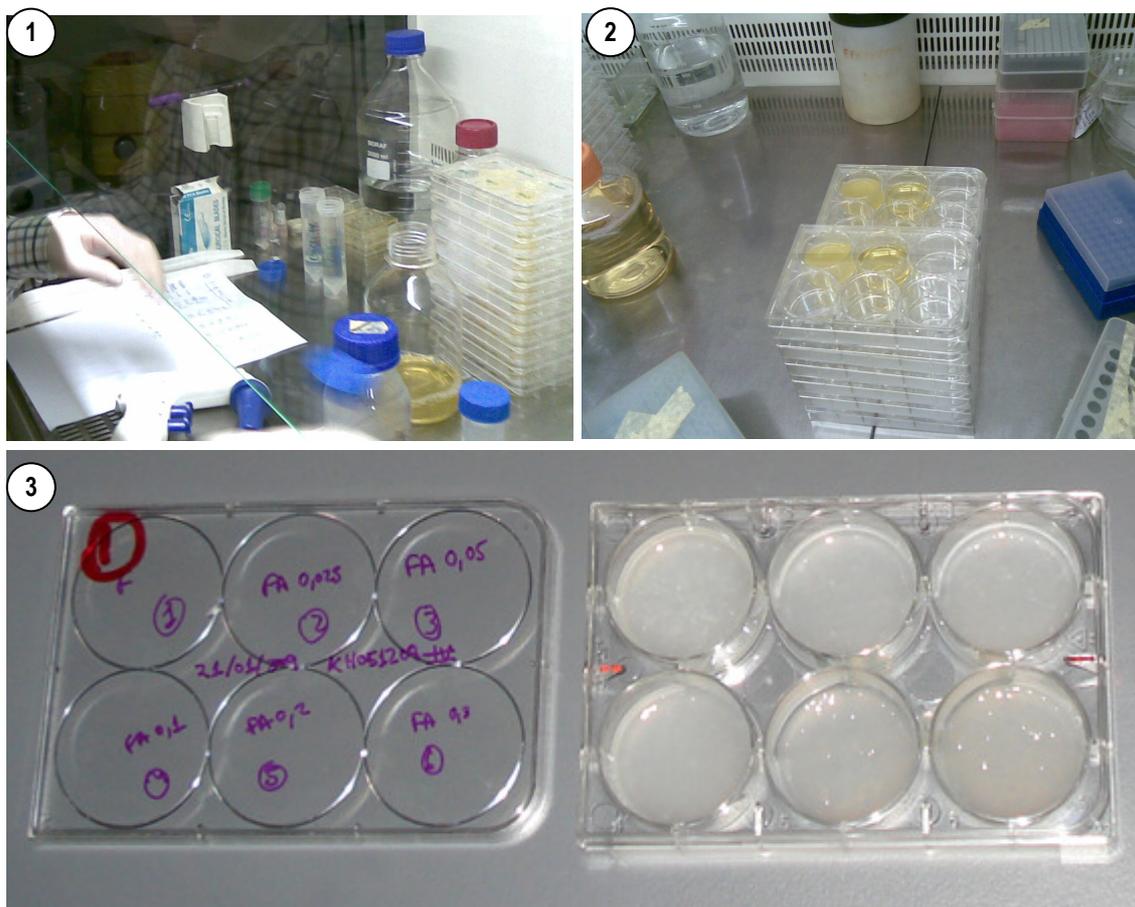
Los contenedores de crecimiento celular elegidos fueron placas Corning® CellBIND®, con 6 pocillos circulares transparentes, de fondo plano, con tapa, estéril (ref. 3335), cuyas características técnicas aparecen en la Tabla 3.1., así cada placa alojaba uno de los 6 diferentes sustitutos estromales analizados en esta Tesis Doctoral. Teniendo en cuenta que estudiamos las características ópticas desde el día inicial ( $S_0$ ) hasta la octava semana ( $S_8$ ), se necesitaron un total de 20 placas, 2 para cada semana de estudio, más otras dos de reserva por si hubiese algún tipo de problema en el crecimiento celular normal (contaminación por hongos, bacterias, etc...). Semanalmente se recogían dos contenedores aleatoriamente para su análisis

Material	<b>Poliestireno</b>	Volumen Constructo	<b>16.8 mL</b>
Formato del contenedor	<b>6 pocillos</b>	Área de crecimiento celular	<b>9.5 cm<sup>2</sup> (aprox)</b>
Características del contenedor	<b>Estandar</b>	Volumen de medio celular recomendado	<b>1.9-2.9 mL</b>
Color del Contenedor	<b>Transparente</b>	Tratamiento de la superficie	<b>Corning® CellBIND® Surface</b>
Fondo Constructo	<b>Plano</b>	Estéril	<b>Sí</b>
Forma Constructo	<b>Circular</b>	Índice de Refracción	<b>1,56</b>

**Tabla 3.1.** Características técnicas de las placas de crecimiento celular Corning® CellBIND®

histológico y óptico. De esta forma, el resto de contenedores seguían desarrollándose normalmente para su análisis en semanas posteriores.

En esta Tesis Doctoral se realizaron 6 tipos diferentes de geles de Fibrina y Agarosa con los queratocitos humanos cultivados anteriormente inmersos en ellos. Todos los geles fueron similares entre sí diferenciándose únicamente en las distintas concentraciones de Agarosa existentes en cada uno de ellos.



**FIGURA 3.1.** 1. Fabricación de los geles de Fibrina y Agarosa. 2. Contenedores de cultivo donde se alicuotaron los geles dentro de la campana de convección de aire. 3. Contenedor utilizado para este estudio y posición de los constructos con las diferentes concentraciones de Agarosa utilizadas.

Para cada modelo de estroma corneal humano artificial, se utilizaron distintas cantidades de plasma humano, medio de cultivo DMEM, ácido tranexámico, calcio y Agarosa según se detalla en la Tabla 3.2. El ácido tranexámico (Amchafibrín®, Fides

Ecofarma, Valencia, España) se utilizó para evitar la fibrinolisis espontánea de los gels de Fibrina humana y Agarosa, mientras que el calcio se añadió para precipitar la reacción de polimerización de la Fibrina. La Agarosa utilizada fue Agarosa tipo VII especial para cultivos celulares (Sigma-Aldrich ref.A9045, Steinheim, Alemania) previamente disuelta en PBS y calentada hasta alcanzar el punto de fusión. Los modelos generados son los siguientes:

- a) Constructo 1: gel de Fibrina con queratocitos humanos (F).
- b) Constructo 2: gel de Fibrina con queratocitos humanos y Agarosa al 0,025% (FA<sub>025</sub>).
- c) Constructo 3: gel de Fibrina con queratocitos humanos y Agarosa al 0,05% (FA<sub>050</sub>).
- d) Constructo 4: gel de Fibrina con queratocitos humanos y Agarosa al 0,1% (FA<sub>100</sub>).
- e) Constructo 5: gel de Fibrina con queratocitos humanos y Agarosa al 0,2% (FA<sub>200</sub>).
- f) Constructo 6: gel de Fibrina con queratocitos humanos y Agarosa al 0,3% (FA<sub>300</sub>).

CONSTRUCTO	F	FA <sub>025</sub>	FA <sub>050</sub>	FA <sub>100</sub>	FA <sub>200</sub>	FA <sub>300</sub>
PLASMA HUMANO	97,2	95,7	94,2	91,2	91,2	91,2
MEDIO DMEM	9	9	9	9	9	9
AMCHAFibrin®	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
CL <sub>2</sub> CA 1%	12	12	12	12	12	12
AGAROSA 2%	0	1,5	3	6	12	18

**Tabla 3.2.** Cantidades utilizadas expresadas en mililitros para cada tipo de estroma corneal fabricado.

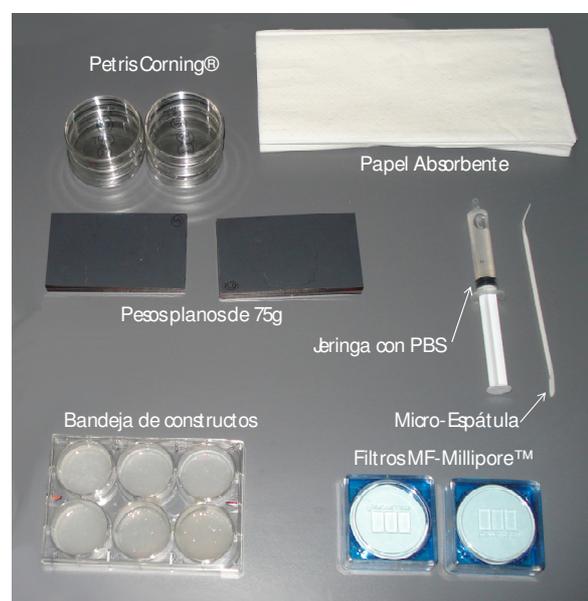
Una vez mezclados todos los componentes, y para evitar un trauma físico excesivo, cada mezcla se alicuotó cuidadosamente en cada una de las 20 superficies de cultivo. Los geles alicuotados se dejaron en el incubador a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>, durante 2 horas para que coagularan. Después de este tiempo, se cubrieron con 10 ml de medio de cultivo para queratocitos, renovándolo cada 3 días.

### 3.1.5. Obtención de sustitutos estromales nanoestructurados.

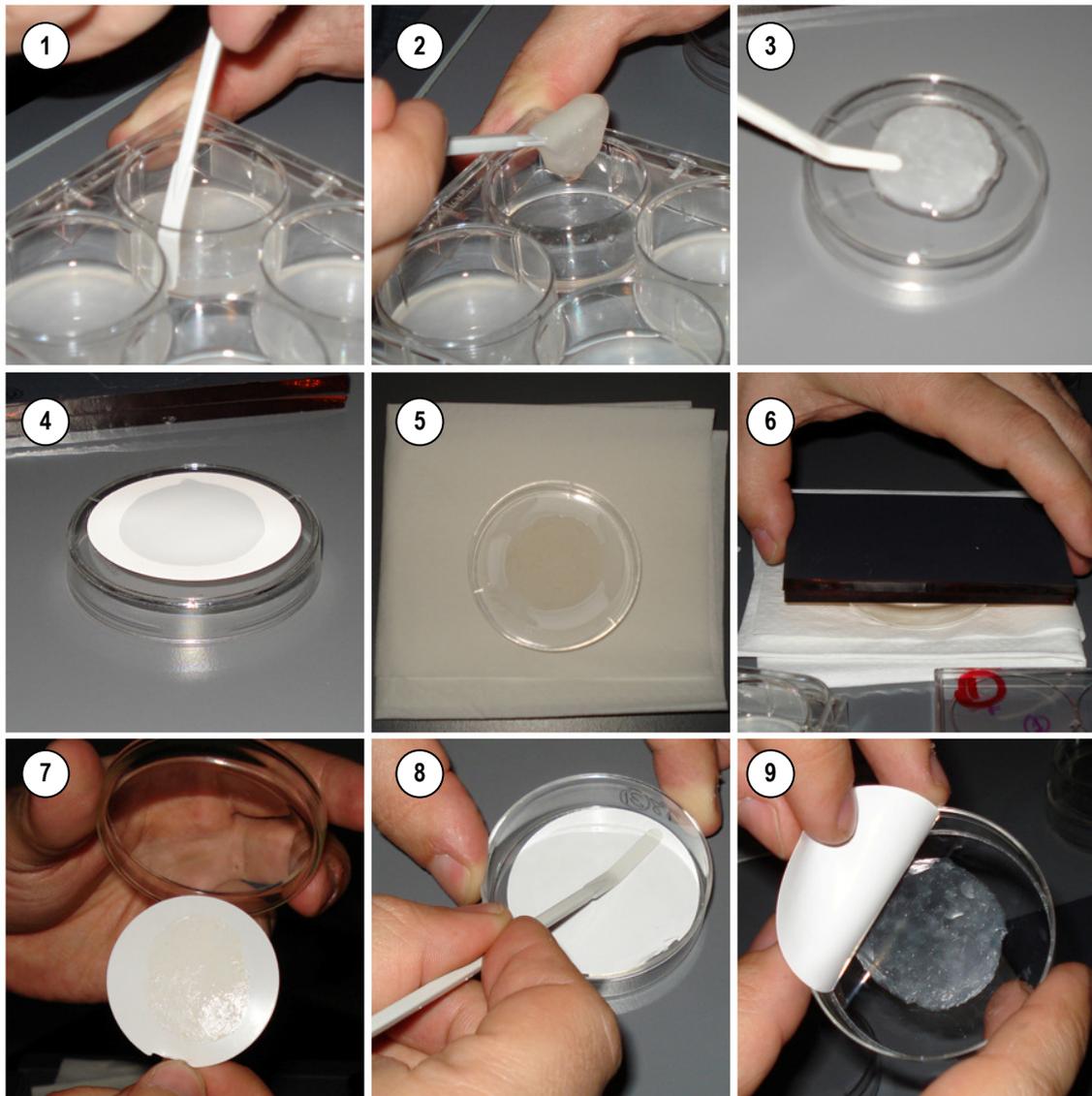
Una vez desarrollados los constructos estromales, se procedía cada semana a nanoestructurar dos bandejas de ellos para proceder posteriormente a su análisis óptico e histológico.

La expresión de “nanoestructuración” tal y como se utiliza a continuación, se refiere a una modificación estructural consistente en la generación de enlaces de tamaño inferior a una micra entre las fibras de Fibrina y las moléculas de Agarosa. Este

proceso comprende la deshidratación por la compresión mecánica de los constructos, y de esta forma permitía conseguir un tejido artificial que alcance los niveles óptimos de consistencia y elasticidad que no se tienen de manera natural. El resultado final es una modificación irreversible de las fibras que genera unas cualidades biomecánicas muy favorables para la manipulación quirúrgica y el implante clínico. Todo el material utilizado y los pasos del procedimiento seguido se muestran en las Figuras 3.2. y 3.3. y se describe a continuación.



**Figura 3.2.** Material utilizado para la nanoestructuración de los geles.



**Figura 3.3.** Proceso de nanoestructuración; **1.** Separación del gel del pocillo de cultivo; **2.** Extracción; **3.** Extensión del gel sobre la parte posterior de una placa de Petri; **4.** Se cubre con un filtro poroso Millipore™; **5.** Se voltea y se apoya sobre cuatro hojas de papel absorbente; **6.** Se ponen 150 gramos de peso sobre la placa de Petri; **7.** Separación del filtro con el gel nanoestructurado adherido a él; **8.** Adhesión por presión del gel en el fondo de la placa de Petri; **9.** Gel de Fibrina y Agarosa adherido en el fondo de la placa de Petri, listo para su análisis óptico.

Con la ayuda de una espátula de plástico flexible (Corning® Microspatula with V-Shaped Scoop/rounded Blade, Esteril, ref. 3013), se despegó el constructo de las paredes de las placas de cultivo. Posteriormente, cada constructo se puso encima de la superficie inferior de una placa de Petri de 6cm de diámetro y se secó con papel absorbente el líquido sobrante alrededor del tejido. Posteriormente, se puso un filtro poroso de nylon sobre la superficie del tejido (MF-Millipore™ Membrane Filters, Ref. GSWP04700, Millipore Corp., Billerica, MA 01821, USA) y encima de éste, 4 capas de

papel absorbente. Al constructo resultante se le dio la vuelta, se apoyó sobre una superficie plana y se colocó sobre la placa de Petri un peso de 150g durante 10 minutos, ejerciendo una presión aproximada sobre el tejido de 3000Pa. Entonces, se retiró el papel absorbente y se despegó cuidadosamente el tejido de la superficie de la placa de Petri. Después, esa misma cara se puso en contacto con el fondo de otra placa de Petri de poliestireno transparente de 6cm de diámetro (Corning® Cell Culture Dish 60mm x 15mm. Ref. 430166), se hizo presión ligeramente con la superficie de una espátula sobre el filtro para que el tejido quedase adherido al fondo y, finalmente, se separó dicho filtro, quedando el tejido adherido a éste. Al finalizar este proceso, se midieron las propiedades ópticas del tejido nanoestructurado, manteniéndolos tapados y sumergidos en PBS hasta el momento de dichas medidas para evitar que se deshidratasen.

## **3.2. DISPOSITIVOS EXPERIMENTALES Y MÉTODO DE MEDIDA.**

A continuación se exponen los diferentes dispositivos y procedimientos empleados para la medida de las características ópticas de cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial generados.

### ***3.2.1. Medida del espesor.***

Obtener la medida del espesor de sustitutos estromales generados de una forma exacta es muy importante, ya que este es necesario para la evaluación de las propiedades ópticas del biomaterial. La medida del espesor se realizó de manera no invasiva, para no alterar sus características estructurales, mediante el desplazamiento del enfoque micrométrico de un microscopio tal cual se describe a continuación.

*a) Dispositivo Experimental:*

1. *Microscopio Nikon Eclipse 90i* (Nikon Instruments Europe B.V.).
2. Software control del microscopio *iControl* y *NIS-Elements Advanced Research ver. 3.00* (Nikon Instruments Europe B.V) con el cual se puede controlar y medir el desplazamiento del enfoque en el eje Z (azimutal) con una sensibilidad de  $1\mu\text{m}$ .



**Figura 3.4.** *Microscopio Nikon Eclipse 90i utilizado para la medida del espesor de la muestra.*

*b) Procedimiento:*

1. En el fondo de la placa de Petri se realizó una marca con un rotulador indeleble.
2. Con el microscopio y utilizando el objetivo de menor aumento (4x) enfocamos dicha marca de tinta.
3. Una vez enfocada, se procedió a poner en el programa de control del microscopio el medidor de distancia en el eje Z (enfoque) a cero.
4. Se desplazó el tornillo micrométrico de enfoque hasta que se logró enfocar la superficie del tejido, ajustando en el caso necesario el enfoque con el software de control micra a micra.
5. Una vez enfocada, se anotó el desplazamiento resultante del objetivo.
6. Para todos los tejidos se repitió la secuencia de procedimientos 1-5.

*c) Parámetros*

$e_t$       Espesor del tejido

### 3.2.2. Medidas por reflexión:

Se realizaron medidas de la reflectancia espectral para la aplicación posterior del método de Kubelka-Munk (Kubelka and Munk, 1931; Kubelka, 1948; Kortüm, 1969). Este método es ampliamente utilizado por diferentes autores para describir las cualidades ópticas de distintos materiales (Vargas and Niklasson, 1997; Lee, 2007).

#### a) Dispositivo experimental.

1. *Espectrorradiómetro SpectraScan modelo PR-704* (Photo Research, Inc. 9731 Topanga Canyon Place Chatsworth, CA 91311-4135 U.S.A.). Este aparato consta de un cabezal óptico con un espejo de apertura tipo Pritchard que dirige la radiación óptica incidente hacia una red de difracción y hacia el ocular. A continuación de la red de difracción se encuentra una matriz lineal de fotodiodos detectores en una cámara. Esta matriz tiene 256 elementos, o píxeles enfriados termoeléctricamente a 0° C en la cámara, sellada para eliminar cualquier posible contaminación y el efecto de las fluctuaciones térmicas. Además, está presurizada con nitrógeno para prevenir la condensación. Aproximadamente 245 de los píxeles son los responsables de obtener las medidas y los restantes no se usan. Teniendo en cuenta que el rango espectral de este instrumento es de 380-780nm, cada píxel mide en incrementos de 1.6 nm, aunque los resultados se expresan en incrementos de 2nm por conveniencia.
2. Software *Spectra-View 2.10* (Photo Research, Inc. 9731 Topanga Canyon Place Chatsworth, CA 91311-4135 U.S.A.). Es el programa que controla el espectrorradiómetro desarrollado por PhotoResearch que incluye, entre otras opciones, las siguientes: medida de Luminancia, Iluminancia, Radiancia, Irradiancia y Temperatura de color; cálculo de reflectancias y transmitancias fotométricas y radiométricas; cálculo de valores triestímulos X,Y,Z, coordenadas

de cromaticidad en los sistemas CIE 1931, CIE 1960, CIE 1976 ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) y CIE 1976 ( $L^*$ ,  $u^*$ ,  $v^*$ ), longitud de onda dominante y pureza colorimétrica.

3. *Cabina de iluminación VeriVide CAC60* (VeriVide Limited, Leicester, LE19 4SG, England). Como fuente de iluminación se utilizó una fuente que simulaba la irradiancia espectral relativa del iluminante CIE estándar D65.
4. *Fondos de la escala Munsell acromática*, siendo para el blanco las coordenadas  $L^*= 93.2$ ,  $a^*= 0.7$ ,  $b^*= 1.7$  y para el negro  $L^*= 2.8$ ,  $a^*= 0.7$ ,  $b^*= 1.9$ .
5. *Blanco de referencia*, de óxido de bario (SRS-2, S/N 3122).

#### b) Procedimiento

1. Para todas las medidas, las muestras fueron situadas en el centro de la cabina de iluminación sobre un atril con una inclinación de  $45^\circ$ .
2. Las configuraciones de iluminación y medida respetaron la geometría CIE  $d/0^\circ$ , manteniendo siempre la misma distancia de medida desde la muestra al espectrorradiómetro.
3. Previamente, se estabilizaron fuente y detector según las condiciones que especifican los fabricantes.
4. Se dispuso la primera placa de Petri de Fibrina sin tapadera sobre el fondo blanco, alineando la mira del espectrorradiómetro con el centro del constructo y se realizaron 3 medidas evitándose en todo momento la reflexión especular.
5. Sin variar la posición del constructo, se cambió el fondo blanco por el fondo negro y se realizaron otras tres medidas.
6. Se repitió la operación 4 y 5 para cada uno de los sustitutos estromales.

7. Finalmente se realizaron 3 medidas de la reflectancia espectral de los fondos blanco y negro y del blanco de referencia.
8. De cada medida que se realizó se obtuvo un archivo \*.dat cuyo tratamiento se explicará en apartados posteriores.

c) *Parámetros obtenidos.*

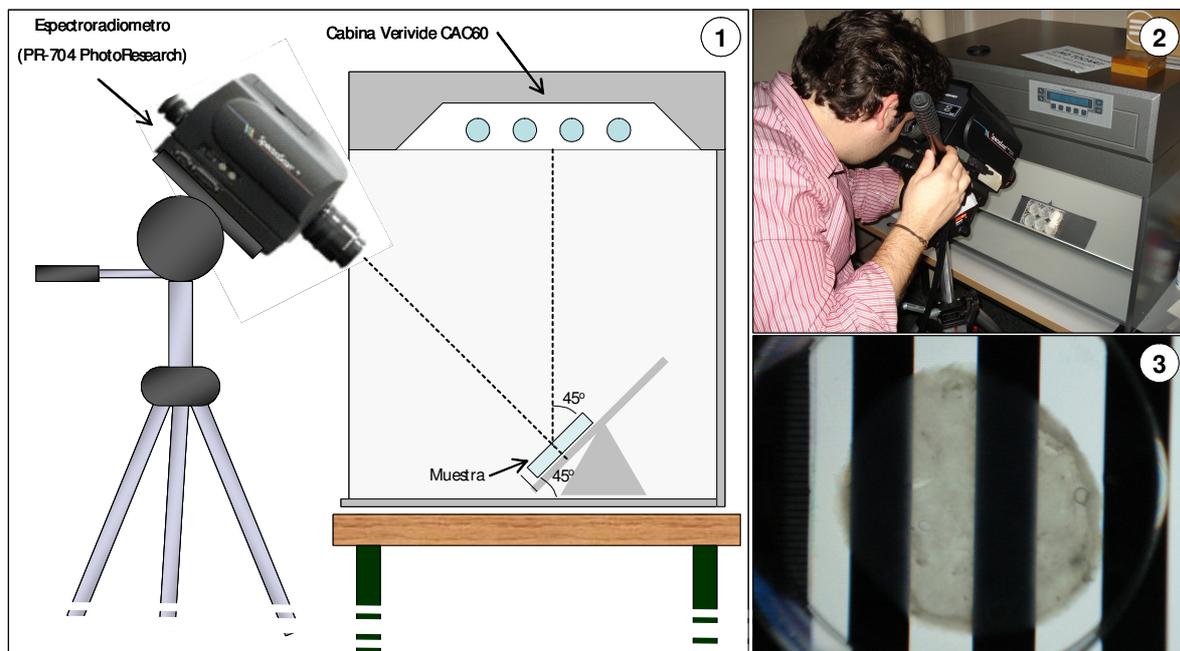
$L_{e\lambda W}$  Radiancia espectral del blanco de referencia.

$L_{e\lambda B}$  Radiancia espectral del fondo blanco.

$L_{e\lambda N}$  Radiancia espectral del fondo negro.

$L_{e\lambda b}$  Radiancia espectral de la muestra sobre fondo blanco.

$L_{e\lambda n}$  Radiancia espectral de la muestra sobre fondo negro.



**Figura 3.5.** Dispositivo experimental de las medidas de reflexión por el método Kubelka-Munk. **1.** Esquema del montaje experimental; **2.** Alineación y preparación del aparato con las muestras; **3.** Constructo a medir, sobre los fondos blanco y negro.

A partir de dichas radiancias y la del blanco de referencia se obtuvieron las correspondientes reflectancias espectrales con las que pudimos calcular los coeficientes de K-M de absorción ( $K$ ) y scattering ( $S$ ), y a partir de ellos el coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ), coeficiente de scattering reducido ( $\mu'_s$ ), el albedo de transporte ( $a'$ ) y la transmitancia K-M en el visible.

### 3.2.3. Medidas por transmisión para la radiación UV

Las medidas por transmisión para la radiación UV se realizaron igual que las anteriores de reflexión en el Departamento de Óptica de la UGR.

#### a) Dispositivo experimental.

1. Espectrómetro Newport® OSM-400 UV/VIS (Newport Corporation, Irvine, CA 92606). En la Tabla 3.3. se pueden ver las especificaciones técnicas del aparato. Como se observa, el detector permite realizar medidas para la radiación ultravioleta A, B y C (240-400nm)

Especificaciones Técnicas del Espectrómetro OSM-400 UV/VIS

<b>Detector</b>	Back thinned CCD	<b>SNR (Detector)</b>	400:1	<b>SNR (Sist. Completo)</b>	1.15 %
<b>Rango Espectral</b>	240 - 850 nm	<b>Sensibilidad espectral</b>	0.1 nm	<b>Resolución Óptica</b>	1 nm
<b>Luz Difusa</b>	0.1 %	<b>Rango dinámico</b>	5000:1	<b>Conectores</b>	SMA 905
<b>Red/Rejilla</b>	600 l/mm	<b>Blaze Wavelength</b>	250 nm	<b>Tiempo Integración</b>	3.34 ms - 16s
<b>Dist. Focal Objeto</b>	50	<b>Dist. Focal Imagen</b>	80	<b>Número de píxeles</b>	14 x 2048
<b>Ancho de hendidura</b>	50 $\mu$ m	<b>Altura de hendidura</b>	3 mm	<b>Tamaño del Pixel</b>	(14*14)*14 $\mu$ m

**Tabla 3.3.** Características técnicas del espectrómetro OSM-400 UV/VIS de Newport Corporation.

2. Software de control, OSM-Analyst ver. 2.01.04 (Newport Corporation, Irvine, CA 92606).

3. Mini-Fuente de Deuterio (ref. LSM-DT-S, Newport Corporation, Irvine, CA 92606). Esta fuente está diseñada para su uso con el espectrómetro anteriormente descrito. Incluye una lámpara D2, para el ultravioleta principalmente (de 200 a 400).

**Especificaciones Técnicas de la fuente LSM-DT-S**

<b>Salida Espectral</b>	200 - 400 nm (sólo fuente de deuterio)
<b>Vida Media de las Lámparas</b>	1000 horas (Lámpara de Deuterio)
<b>Apertura</b>	0.5 mm
<b>Material de la Ventana de Salida</b>	Sílice Fundido
<b>Alimentación</b>	100 - 240 V, 47-63 Hz, 0.7 A

*Tabla 3.4. Características técnicas de la fuente utilizada con el espectrómetro.*

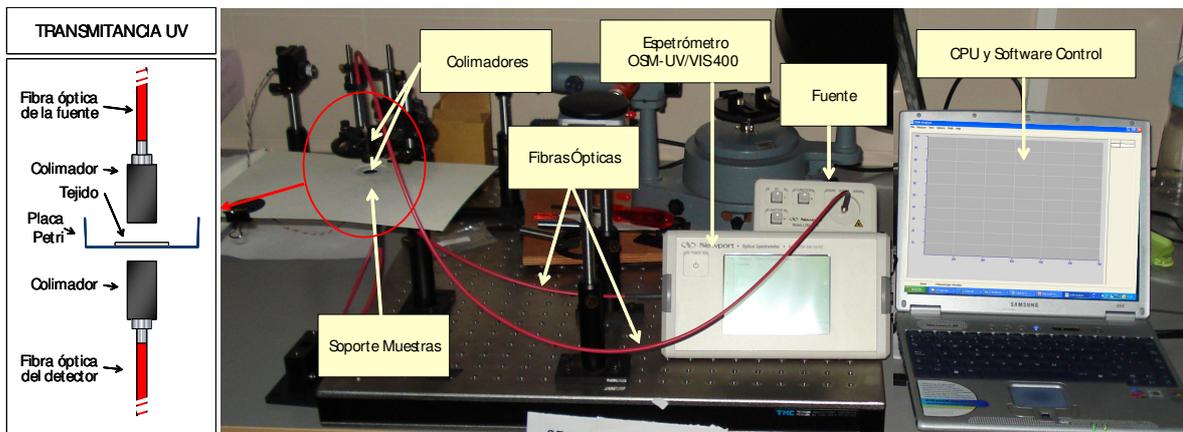
4. Set de 2 Colimadores para fibra óptica( ref. 78382, Newport Corporation, Irvine, CA 92606) , con conectores SMA, para abrir el haz que viene de la fuente y hacer que pase por la muestra y recogerlo de nuevo en una fibra óptica para conducirlo al detector.
5. Dos cables de fibra óptica resistentes a la solarización, 400 $\mu$ m de sección, un metro de longitud, 180-1100nm, con conectores SMA (ref. 78363, Newport Corporation, Irvine, CA 92606).
6. Mesa de montaje de dispositivos, jinetillos, soportes....

*b) Procedimiento de medida.*

La Figura 3.6. muestra el esquema y la fotografía del montaje experimental del espectrofotómetro para las medidas de la transmisión de la radiación UV.

1. Se conectó la fibra óptica desde la salida de la fuente al colimador.

2. Se hizo lo mismo con el otro cable de fibra óptica, pero esta vez uniendo el colimador de recogida de luz con la entrada al detector.
3. Se fijaron los colimadores a unas abrazaderas montadas en un jinetillo, de modo que la luz pasara de manera vertical y perpendicular a la muestra a la hora de apoyarla sobre la abrazadera inferior. El colimador superior correspondía al de la fuente y el inferior al del detector.



**Figura 3.6.** Dispositivo experimental para las medidas de transmitancia de la radiación UV. A la izquierda, esquema de la disposición del soporte de la placa de Petri y los colimadores.

4. La abrazadera superior era móvil, con motivo de poder desplazarse hacia arriba para poder poner y quitar las muestras con comodidad.
5. El jinetillo también disponía de un tope situado en la parte inferior del recorrido de la fijación de la abrazadera superior con el objeto de que todas las medidas se realizaran con la misma distancia entre colimadores (14mm), según recomienda el fabricante.
6. Se estabilizaron la fuente y el espectrofotómetro encendiéndolas previamente media hora siguiendo las recomendaciones del fabricante.
7. Se realizaron 3 medidas de ruido o cero ( $I_0$ ) y 3 medidas de referencia ( $I_R$ ).

8. Posteriormente, se alojó la primera placa de Petri, haciendo coincidir el centro del constructo con la vertical formada entre los colimadores emisor-detector, realizándose 3 medidas ( $I_F$ ).
9. Se repitió el paso 8 para cada uno de los constructos ( $I_{FA025}$  a  $I_{FA300}$ ).

*c) Parámetros obtenidos.*

Para las medidas de transmisión total:

$I_{T0}$  Medida de cero del aparato.

$I_{Ti}$  Intensidad inicial, sin muestra.

$I_T$  Intensidad total obtenida tras pasar la luz incidente a través de la muestra.

### 3.2.4. Medida del índice de refracción.

Finalmente, para terminar de caracterizar nuestras muestras se procedió a la obtención del índice de refracción mediante el procedimiento de la medida del ángulo de Brewster. En este método se hace incidir sobre la muestra un haz láser cuyo plano de polarización esta contenido del plano de incidencia. Si modificamos el ángulo de incidencia, llegamos a un punto en el que toda la luz que incide se transmite y desaparece la componente reflejada. En dicho punto, la luz incide con el llamado ángulo de Brewster, y su tangente es igual al índice de refracción del medio objeto de estudio.

$$n = \tan \varphi_B$$

Este método, a la vez de sencillo, nos permite obtener dicho ángulo sin la necesidad de manipular la muestra. Esto es de gran importancia dado que posteriormente realizaremos análisis histológicos de estos sustitutos corneales. La adecuación de este método de medida del índice de refracción viene avalada por su empleo para la valoración de otros tejidos biológicos con anterioridad (Jin et al., 2006; Sardar et al., 2005; Sardar et al., 2004; Singh, 2002).

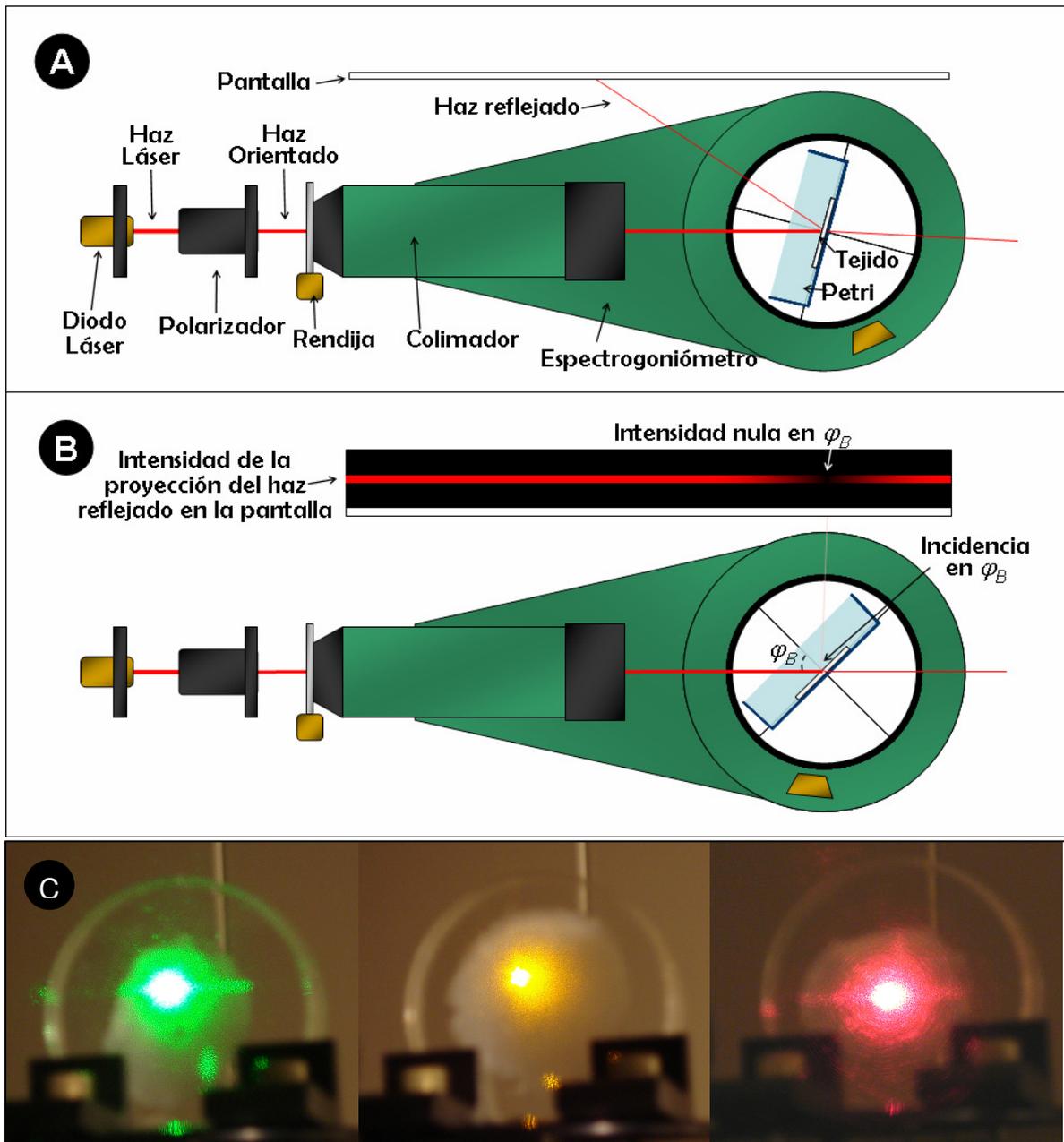
*a) Dispositivo experimental.*

1. Espectrogoniómetro, con una sensibilidad de medida de 1' de arco.
2. Tres Diodos-Láser, de 534, 594 y 670nm para valorar el índice de refracción para esas longitudes de onda. (Dragon Lasers Co. Ltd., Jilin, China)
3. Polarizador (Ref. DGL10, Thorlabs, Newton, New Jersey, USA) en el visible para modificar la intensidad del haz láser y el eje de polarización de la luz incidente.
4. Jinetillos y soportes para poder alinear los diodos láser con el sistema polarizador-espectrogoniómetro.

*b) Procedimiento de medida.*

1. Se puso a punto el espectrogoniómetro
2. Se colocaron el láser y el polarizador previo al espectrogoniómetro, alineándose todo el sistema colocando un vidrio en la perpendicular de incidencia en el lugar de la muestra y haciendo coincidir el haz reflejado del láser con la misma fuente emisora (Figura 3.7a).
3. Se ajustaron los ejes del láser y polarizador para que el fenómeno del ángulo de Brewster tuviese su efecto máximo (la desaparición completa de la componente reflejada en dicho ángulo).

4. Una vez puesto a punto todo el sistema, se reemplazó la lámina de vidrio por la muestra, colocándola en el mismo plano perpendicular al de incidencia.
5. Se giró la base de la plataforma, siguiendo el desplazamiento del haz reflejado sobre una pantalla y comprobando como, cuando la incidencia del



**Figura 3.7.** **A.** Dispositivo experimental de las medidas del índice de refracción con el espectrogoniómetro. **B.** Incidencia en ángulo de Brewster y la proyección de intensidades reflejadas, siendo ésta nula en dicho ángulo. **C.** Incidencia sobre las muestras de los láseres de 532, 594 y 670nm utilizados.

haz se acerca a la incidencia de polarización, comienza a disminuir la intensidad del haz reflejado, hasta que llega un punto en el que se anula totalmente, lo que indica que hemos llegado a dicho ángulo de Brewster (Figura 3.7b).

6. Esta medida se repitió tres veces, para cada una de las longitudes de onda a estudiar, anotando los ángulos resultantes.

*c) Parámetros obtenidos:*

$\varphi_B$       Ángulo de Brewster.

### 3.2.5. Estimación de la calidad de la imagen retiniana.

La estimación de las aberraciones ópticas fue realizada mediante el software OSLO LT, (software creado por Lambda Research Corp), el cual permite la estimación y visualización de las aberraciones de un sistema óptico diseñado previamente. Para ello, el software permite seleccionar y modificar, índices de refracción de los medios, radios de curvatura, etc.

En nuestro estudio, para simular el ojo, consideraremos el modelo esquemático de Navarro-Escudero (Navarro-Sanz, Esther, Escudero Rafael 1999). Para ello, se ha diseñado un sistema óptico en OSLO LT con los datos correspondientes a los diferentes dioptrios, índices y espesores de dicho modelo (Tabla 3.5.).

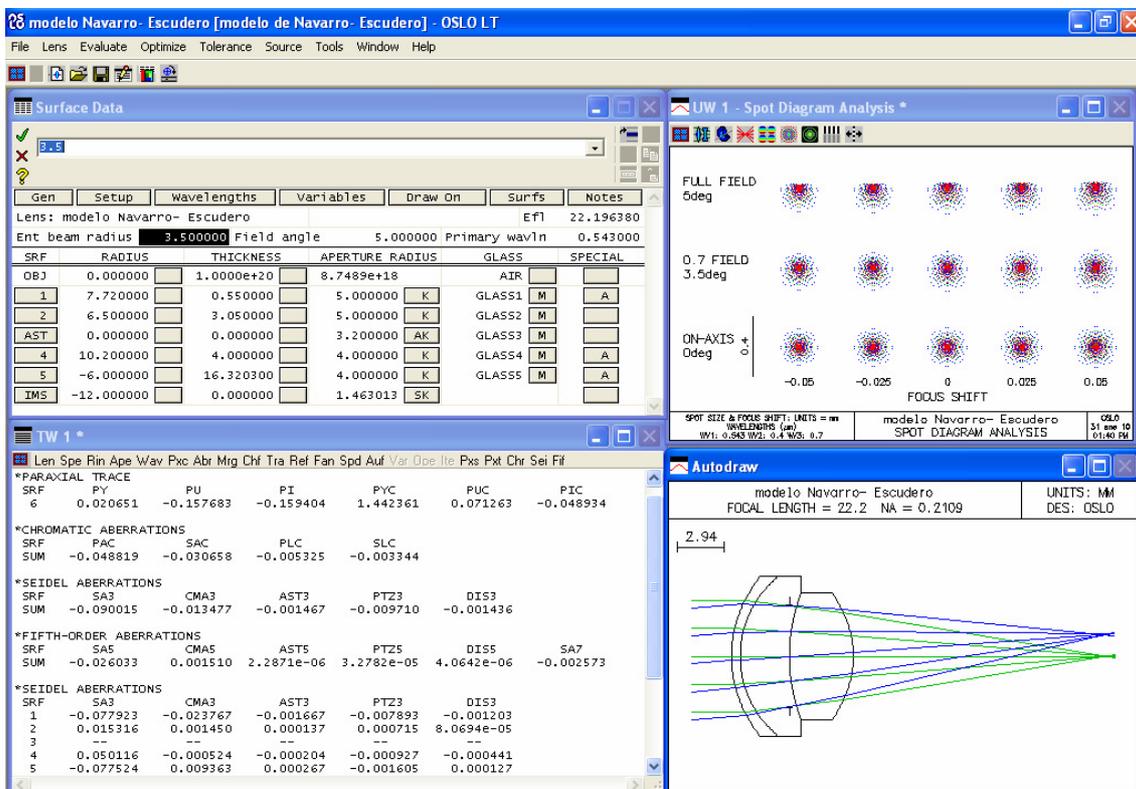
En nuestro trabajo, para evaluar la modificación que produciría sobre las aberraciones en el ojo la sustitución de la córnea por los modelos de estroma corneal humano artificial de Fibrina y Fibrina-Agarosa en concentraciones crecientes, modificamos en el modelo de ojo de Navarro-Escudero el índice de refracción de la córnea por el de los sustitutos de estroma corneal generados mediante Ingeniería Tisular. Completamos el estudio realizando una estimación de la influencia sobre las aberraciones de ligeras modificaciones del radio de curvatura de la córnea. En

concreto, realizaremos nuestros cálculos para diferentes radios de la cara anterior de la córnea de 7,65 mm, 7,7 mm, 7,8mm y 7,9mm.

Superficie/Espacio	Radio	Espesor/Distancia	Radio de apertura	Índice
<i>Anterior Córnea</i>	7,72mm	0,55mm	5mm	$n_{400} = 1,382$ $n_{543} = 1,377$ $n_{700} = 1,375$
<i>Posterior Córnea</i>	6,50mm		5mm	
<i>Cámara Anterior</i>	----	3,05mm	3,2mm	$n_{400} = 1,343$ $n_{543} = 1,339$ $n_{700} = 1,336$
<i>Anterior Cristalino</i>	10,20mm	4,00mm	4mm	$n_{400} = 1,425$ $n_{543} = 1,420$ $n_{700} = 1,416$
<i>Posterior Cristalino</i>	6,00mm		4mm	
<i>Humor Vítreo</i>	-12,00mm	16,32mm	---	$n_{400} = 1,342$ $n_{543} = 1,337$ $n_{700} = 1,335$

**Tabla 3.5.** Datos correspondientes a los radios, índices y espesores de los diferentes componentes del modelo de ojo de Navarro-Escudero.

Una vez introducidos todos los parámetros, el programa realiza un cálculo numérico y presenta gráficamente las aberraciones de nuestros modelos para cada concentración de Agarosa y radios de curvatura.



**Figura 3.8.** Pantalla principal del programa Oslo LT, donde se muestran las diferentes ventanas de datos y representación, con los datos del modelo de ojo de Navarro-Escudero.

### **3.3. PROCESAMIENTO PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO, RECUENTO CELULAR Y MEDIDA DEL ÁREA CELULAR.**

Una vez realizadas todas las medidas experimentales se procedió a preparar las muestras para su posterior análisis histológico y recuento celular.

#### **3.3.1. Preparación de la muestra.**

1. Se vaciaron las placas de Petri del PBS en el que estaban inmersos los tejidos corneales para mantenerlos.
2. Se añadió formaldehído al 4% tamponado para fijar los constructos corneales durante 8-12 horas.

3. Se deshidrataron los tejidos en concentraciones crecientes de etanol (70, 80, 96 y 100%).
4. A continuación, el etanol se sustituyó por xileno y las muestras fueron incluidas en bloques de parafina.
5. Una vez enfriados los bloques, se obtuvieron secciones transversales de 4  $\mu\text{m}$  de espesor que se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examen histológico mediante el microscopio óptico.

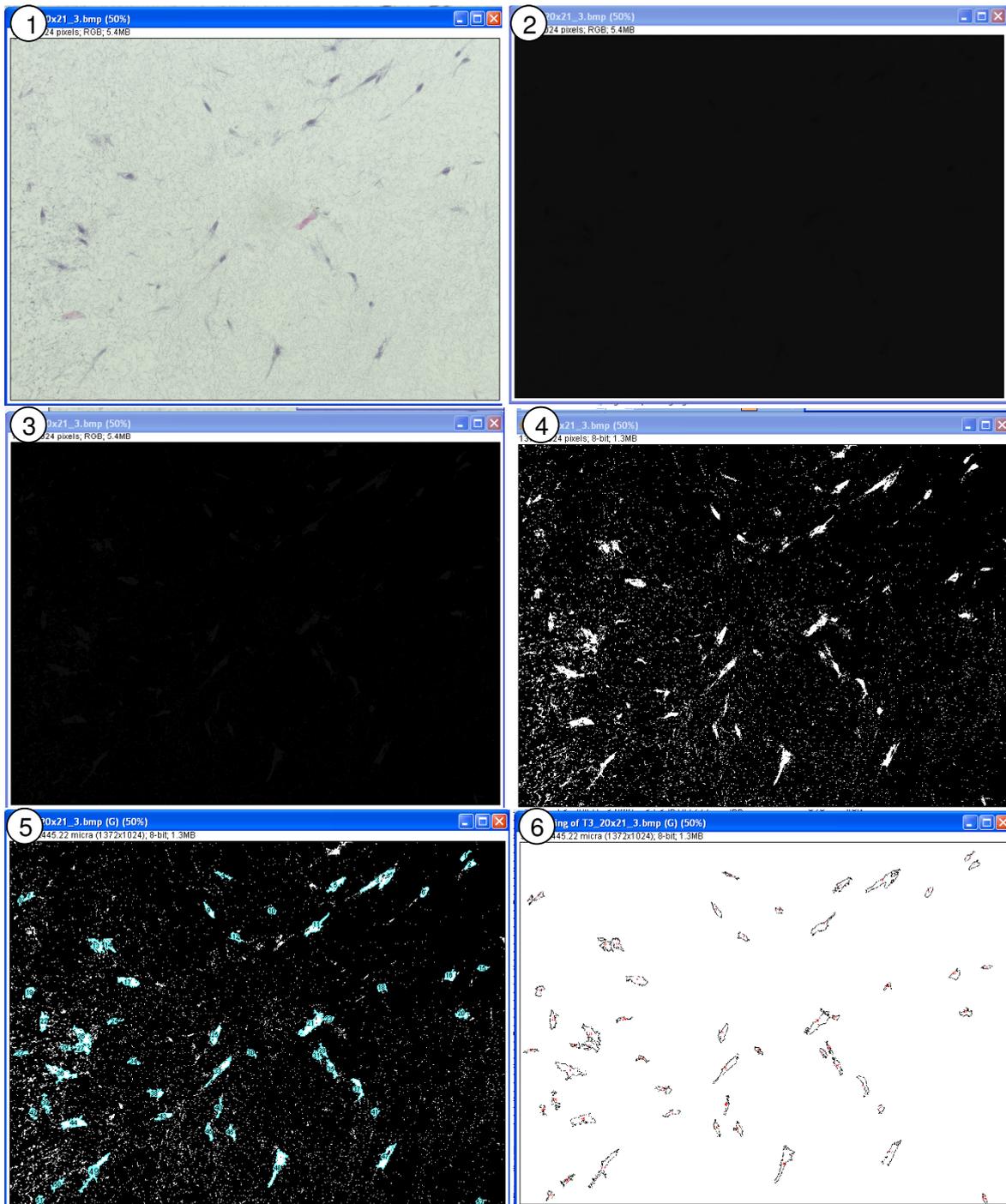
### 3.3.2. Recuento celular y medida del área celular.

Una vez que las muestras estuvieron debidamente teñidas y clasificadas, se realizó el correspondiente recuento celular y medida del área celular para evaluar el crecimiento de las células en los diferentes tejidos. Para ello se siguió el procedimiento descrito a continuación (Figura 3.9.).

1. Mediante el *Microscopio Nikon Eclipse 90i* (Nikon Instruments Europe B.V.) y los Softwares control del microscopio *iControl* y *NIS-Elements Advanced Research ver. 3.00*, (Nikon Instruments Europe B.V) se realizaron fotografías digitales con 20x aumentos ópticos y una resolución de 1372 píxeles de ancho por 1024 píxeles de alto.
2. Se tomaron 5 imágenes por cada constructo localizadas aleatoriamente en toda su extensión.
3. Posteriormente, con el programa de distribución libre de análisis de imágenes *MacBiophotonics ImageJ* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, versión 1.42i del programa *ImageJ* pero con todas las aplicaciones específicas para el tratamiento de las imágenes obtenidas mediante microscopía) se procedió a realizar el recuento celular y la medida del área. Este programa trata

la imagen como una matriz de números, lo que posibilita obtener mucha información de ella según la forma con la que operemos.

4. Se puso en marcha un nuevo sistema de recuento para imágenes de estos tejidos teñidos con hematoxilina y eosina. Para ello, tras abrir la imagen, se realizó la raíz cuadrada de ésta. Como resultado, se obtiene otra imagen de fondo gris muy oscuro, pero con el área total de las células, que es lo que nos interesa, en negro.
5. A continuación, se procedió a utilizar la aplicación de segmentación de la imagen por luminosidad, eliminando de nuestra selección todo el fondo gris quedando seleccionada el área total de cada una de las células y algún corpúsculo más pequeño que la célula.
6. Para poder proceder al recuento celular y medida del área, ésta se convierte en binaria, de tal manera, que ese área de las células y los otros corpúsculos mucho más pequeños queden de color blanco y el fondo, en negro.
7. Se ajusta la escala de la fotografía, donde cada pixel equivale a  $2,3\mu\text{m}$ , y finalmente se utiliza la aplicación de análisis de partículas, indicando que no se tenga en cuenta las menores de  $20\mu\text{m}^2$ , ya que dichas áreas no corresponden a células.
8. Una vez realizado esto, obtenemos una imagen de fondo blanco con el área delimitada de cada célula con una línea negra, con el recuento celular y un archivo de datos con dicho recuento, el área de cada célula, el área total analizada y el ratio entre área total y celular.



**Figura 3.9.** Procesamiento de la imagen para el recuento celular. **1.** Imagen original; **2.** Raíz cuadrada de la imagen; **3.** Imagen resultante tras la segmentación de la imagen con el umbral de brillo; **4.** Conversión en binario (B/N); **5.** Recuento previo; **6.** Imagen resultante del recuento definitivo y área celular delimitada tras la exclusión de áreas no celulares.

### 3.4. TRATAMIENTO DE LOS DATOS Y ESTADÍSTICA.

Cada uno de los archivos de texto y ASCII obtenidos para cada medida fueron exportados al programa Microsoft® Office Excel 2003 (parte de Microsoft Office Professional Edition 2003) para agrupar y manejar más fácilmente todos los datos obtenidos y realizar los diferentes cálculos de las propiedades ópticas. Para el análisis e interpretación de los resultados se realizaron gráficos con el programa Origin Pro 7.0 SR v7.0220(B220) (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc.) y estuvo orientado para encontrar diferencias entre los diferentes modelos de estroma corneal humano artificial elaborados en esta Tesis Doctoral (concentraciones crecientes de Agarosa y distintos periodos de tiempo). Para ello, previamente se le aplicó a los resultados obtenidos un Test de homogeneidad de la varianza. Como

ocurre en la mayoría de los estudios realizados con tejidos biológicos, la distribución de las muestras no seguía una distribución normal ( $p \leq 0.05$ ) por lo que se optó por realizar un estudio estadístico no paramétrico. En orden a realizar una comparación general entre muestras (p.e. comparación entre todos los constructos de un mismo día o la comparación para un mismo constructo entre los diferentes días de su desarrollo), utilizamos el Test de comparación de varias muestras independientes de Kruskal-Wallis (K-W). En orden a realizar comparaciones entre dos distribuciones independientes (por ejemplo, para comparar entre dos días o dos constructos diferentes) se utilizó el Test estadístico de Mann-Whitney (M-W). En todos los casos, se consideró que existían diferencias significativas cuando los p-valor eran menores a 0,05. Para completar el estudio y comprobar que las diferencias entre días y materiales son uniformes para todas las longitudes de onda, se calculó el coeficiente VAF (Variance Accounting For) con la desigualdad de Cauchy Schwarz, mediante la expresión:

$$VAF = \frac{\left( \sum_{k=\lambda_{inicial}}^{\lambda_{final}} a_k b_k \right)^2}{\left( \sum_{k=\lambda_{inicial}}^{\lambda_{final}} a_k^2 \right) \left( \sum_{k=\lambda_{inicial}}^{\lambda_{final}} b_k^2 \right)}$$

donde  $a_k$  es el valor del coeficiente a estudiar para cada longitud de onda y  $b_k$  es el equivalente para la otra medida a comparar. Una medida cercana al 100% significa que las dos curvas son muy similares.



# Capítulo 4

## Resultados



En el siguiente capítulo vamos a mostrar los resultados más relevantes de esta Tesis Doctoral. Conforme a los objetivos específicos propuestos analizamos las propiedades histológicas y ópticas de los modelos de estroma corneal humano artificial desarrollados teniendo en cuenta dos aspectos fundamentales, en primer lugar, la evolución de los modelos con el tiempo de cultivo y, en segundo lugar, la concentración de Agarosa.

En concreto, comenzaremos con el estudio de la proliferación celular de los modelos de estroma corneal humano artificial y el área de las células. Posteriormente, estudiaremos el coeficiente de *scattering* reducido ( $\mu_s'$ ), el coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ), el albedo de transporte ( $\alpha'$ ) y la transmitancia en el rango del visible ( $T_{VIS}$ ). Finalmente, en los últimos dos apartados estudiaremos la transmitancia de estos materiales para la radiación ultravioleta ( $T_{UV}$ ) y el índice de refracción. El conocimiento de éste último permitirá abordar algunos aspectos relacionados con la estimación de la calidad de imagen retiniana obtenida con estos constructos.

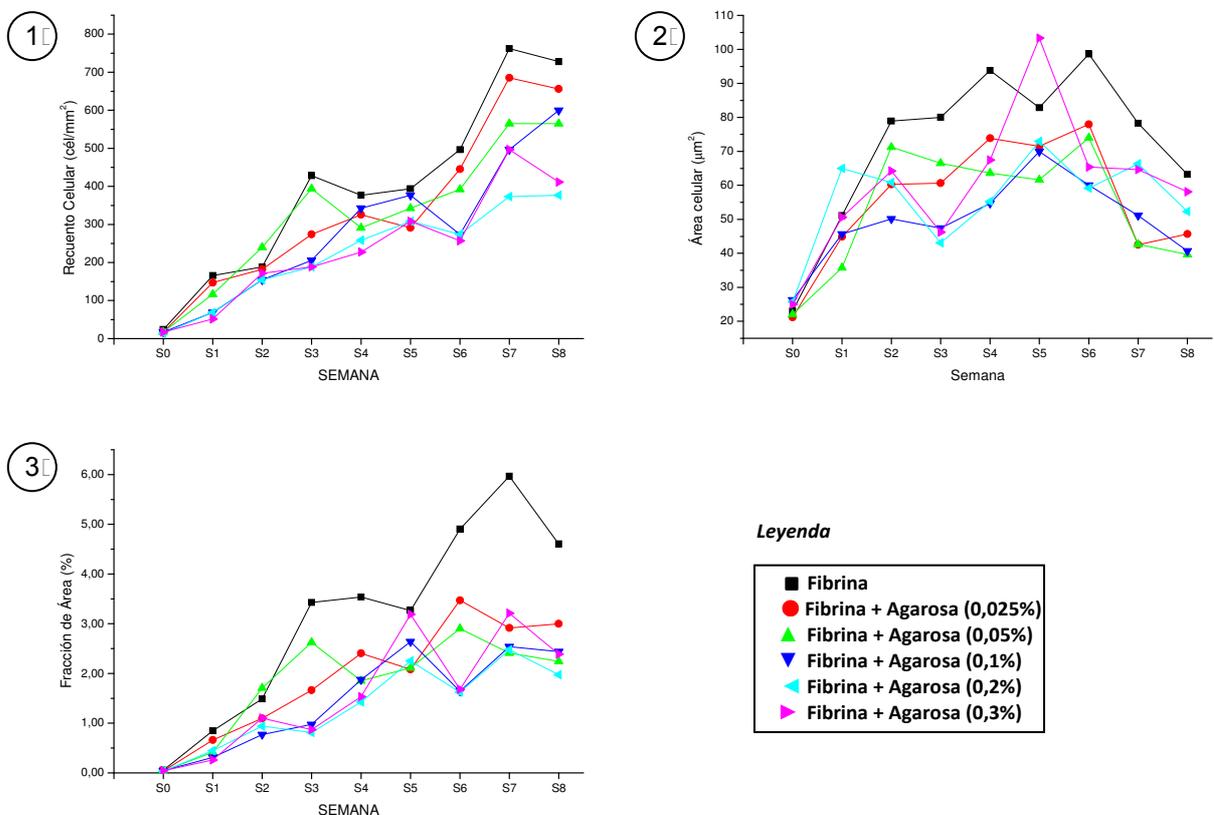
#### 4.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LOS CONSTRUCTOS.

En la Figura 4.1. se muestran las graficas correspondientes a los resultados obtenidos para la densidad celular de los constructos, cómo es el desarrollo de las células evaluando el tamaño de área celular y cuál es la fracción de área que van ocupando las células en el constructo.

Si nos centramos en el recuento celular, encontramos que según transcurren las semanas de cultivo, el número de células aumenta, pasando desde una media de  $(17\pm 3)$  cél/mm<sup>2</sup> en S<sub>0</sub> a una media de  $(556\pm 137)$  cél/mm<sup>2</sup>. Este incremento del número de células es mayor para los constructos de Fibrina y Fibrina-Agarosa en bajas concentraciones que para los de Fibrina-Agarosa de concentraciones mayores (M-W  $p < 0,001$ ), como se puede apreciar en la Figura 4.1.-1, donde el número medio de células osciló entre las  $(377\pm 40)$  cél/mm<sup>2</sup> para FA<sub>200</sub> y  $(728\pm 83)$  cél/mm<sup>2</sup> para F.

Por otra parte, el análisis del área celular muestra un incremento progresivo de la superficie celular desde  $S_0$  ( $23,9 \pm 2,1$ )  $\mu\text{m}^2$  hasta  $S_5$  ( $77,0 \pm 14,6$ )  $\mu\text{m}^2$  y  $S_6$  ( $72,5 \pm 14,8$ )  $\mu\text{m}^2$ , cuando esta comienza a descender, hasta  $S_8$  ( $50,0 \pm 9,6$ )  $\mu\text{m}^2$ . Como se puede apreciar en la Figura 4.1.-2, esta tendencia de aumento del área celular hasta las semanas 5-6 y de disminución en las últimas semanas ocurre de manera general en todos los constructos, aunque con VAFs dispares (entre 85-97%).

Finalmente, en la gráfica que se presenta en la Figura 4.1.-3, se muestran los resultados de la fracción de área. Este parámetro representa el porcentaje de área celular que ocupan las células en la totalidad del tejido y, por tanto, nos da una idea del desarrollo de los constructos. Como se puede observar, el constructo F es el que tiene una mayor fracción de área, seguido por los de Fibrina-Agarosa de menor concentración. Los que tienen menor fracción de área, son los constructos  $FA_{100}$ ,  $FA_{200}$  y  $FA_{300}$  (M-W  $p < 0,001$ ), presentando todos ellos un comportamiento similar.



**Figura 4.1.** Recuento celular. 1. Número de células por  $\text{mm}^2$ . 2. Área celular. 3. Fracción de área que ocupan las células en cada uno de los tejidos.

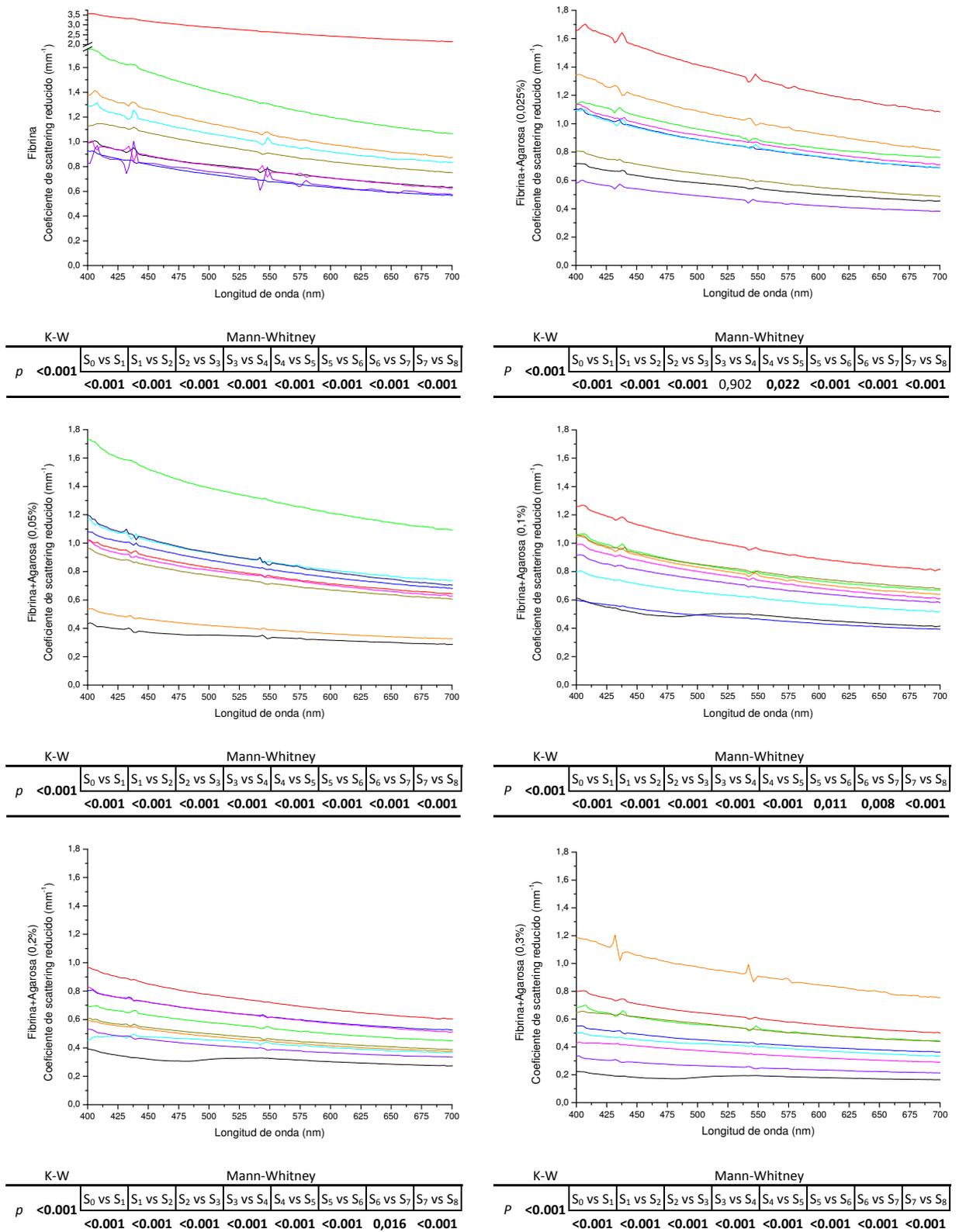
## 4.2. PROPIEDADES ÓPTICAS EN EL ESPECTRO VISIBLE.

### 4.2.1. Coeficiente de *scattering* reducido ( $\mu_s'$ ).

La Figura 4.2. muestra los valores del coeficiente de *scattering* reducido para los constructos de Fibrina (F), Fibrina-Agarosa al 0,025% (FA<sub>025</sub>), Fibrina-Agarosa al 0,05% (FA<sub>050</sub>), Fibrina-Agarosa al 0,1% (FA<sub>100</sub>), Fibrina-Agarosa al 0,2% (FA<sub>200</sub>) y Fibrina-Agarosa al 0,3% (FA<sub>300</sub>) para cada una de las semanas de cultivo (S<sub>0</sub> a S<sub>8</sub>). Junto a ellas se muestran los valores estadísticos correspondientes a las comparaciones generales (K-W) y pareadas (M-W) entre semanas de cultivo. En una primera aproximación, se puede observar que el comportamiento espectral de  $\mu_s'$  para todos los tejidos y todas las semanas es similar (VAF>97%), presentando los mayores valores del coeficiente de *scattering* reducido para las longitudes de onda cortas y disminuyendo progresivamente para las longitudes de onda medias-largas. También, para todos los

constructos, se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre todas las semanas de cultivo (K-W  $p < 0,001$ ). En general, para el día inmediatamente después de generar los constructos ( $S_0$ ) y la última semana ( $S_8$ ) e independientemente de la concentración de Agarosa se suelen obtener los valores más bajos de  $\mu_s'$  (excepto para la concentración de 0,05% de Agarosa en  $S_8$ ). Los valores máximos de  $\mu_s'$  se encuentran para  $S_1$  y  $S_2$  en todos los constructos excepto para  $FA_{300}$ , que se obtuvo en  $S_6$ . En las siguientes semanas los valores de  $\mu_s'$  va disminuyendo, con resultados muy similares entre  $S_3$ ,  $S_4$  y  $S_5$  para todos los constructos (como es el caso de  $FA_{025}$ , donde M-W de  $S_3$  vs  $S_4$   $p = 0,902$ ) excepto para el de  $FA_{200}$ .

La Tabla 4.1. muestra la estadística descriptiva del  $\mu_s'$  para cada uno de los constructos y la estadística comparativa para el estudio de la influencia del nivel de Agarosa. Independientemente de la semana de cultivo, los constructos de F presentan un mayor valor del coeficiente de *scattering* ( $1,11 \pm 0,63 \text{mm}^{-1}$ ) que los de Fibrina-Agarosa, disminuyendo éste conforme aumenta la concentración de Agarosa ( $(0,47 \pm 0,22) \text{mm}^{-1}$  para los constructos  $FA_{300}$ ). Observamos que existen diferencias significativas en todas las semanas de cultivo y entre concentraciones de Agarosa, excepto para comparación entre las concentraciones  $FA_{200}$  vs  $FA_{300}$  en  $S_2$ ,  $FA_{025}$  vs  $FA_{050}$  en  $S_3$  y  $FA_{050}$  vs  $FA_{100}$   $S_5$ .



	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8		MEDIA MOD.	
	MEDIA	D.T.	MEDIA	D.T.																
FIBRINA	0,7751	0,1033	2,7115	0,4139	1,3345	0,1981	0,7001	0,1016	1,0120	0,1360	0,7714	0,1026	1,0838	0,1533	0,9237	0,1229	0,7101	0,1017	1,1136	0,6339
Mann-Whitney(p) F vs FA <sub>025</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,025%)	0,5532	0,0748	1,3373	0,1806	0,9132	0,1201	0,8443	0,1168	0,8447	0,1137	0,8739	0,1168	1,0276	0,1514	0,6122	0,0902	0,4652	0,0630	0,8302	0,2652
Mann-Whitney(p) FA <sub>025</sub> vs FA <sub>050</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		0,468		0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,05%)	0,3387	0,0365	0,7869	0,1066	1,3279	0,1742	0,8348	0,1133	0,8884	0,1169	0,7700	0,1024	0,4002	0,0570	0,7355	0,0864	0,8827	0,1306	0,7738	0,2886
Mann-Whitney(p) FA <sub>050</sub> vs FA <sub>100</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,165		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,1%)	0,4813	0,0452	0,9805	0,1320	0,8113	0,1125	0,4716	0,0581	0,6241	0,0792	0,7562	0,1085	0,7890	0,1149	0,8163	0,1023	0,7080	0,0935	0,7154	0,1656
Mann-Whitney(p) FA <sub>100</sub> vs FA <sub>200</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,2%)	0,3126	0,0254	0,7369	0,1012	0,5487	0,0721	0,6314	0,0791	0,4285	0,0394	0,6283	0,0837	0,4572	0,0618	0,4730	0,0617	0,4017	0,0524	0,5131	0,1338
Mann-Whitney(p) FA <sub>200</sub> vs FA <sub>300</sub>	<0,001		<0,001		0,111		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,3%)	0,1827	0,0128	0,6160	0,0850	0,5363	0,0698	0,4335	0,0521	0,4038	0,0461	0,3535	0,0444	0,9259	0,1239	0,5341	0,0676	0,2551	0,0310	0,4712	0,2195
Kruskal-Wallis (p)	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
MEDIA SEMANAL	0,4406	0,2095	1,1947	0,7847	0,9120	0,3563	0,6526	0,1752	0,7003	0,2534	0,6922	0,1835	0,7806	0,2910	0,6825	0,1730	0,5705	0,2345	0,7362	0,2337

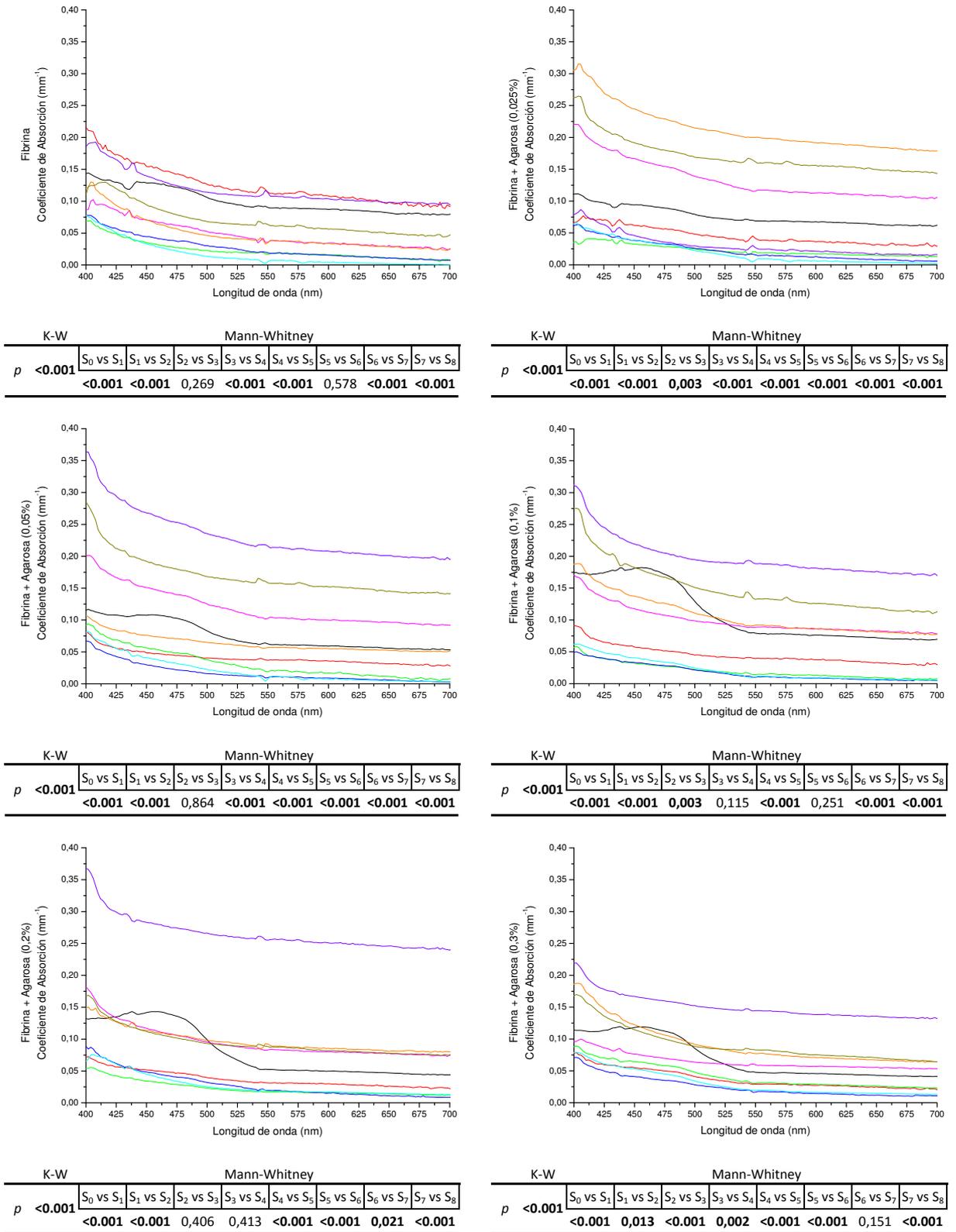
Tabla 4.1. Promedios del coeficiente de scattering reducido para todos los modelos y semanas de estudio y comparación estadística entre concentraciones

#### 4.2.2. Coeficiente de absorción.

En la Figura 4.3. y la Tabla 4.2. se presentan los resultados obtenidos para el coeficiente de absorción de los tejidos y las comparaciones estadísticas realizadas, entre semanas y entre materiales. Recordemos, que este coeficiente nos indica qué parte de la luz incidente es absorbida por los constructos.

En general, el comportamiento espectral para todos los modelos de estroma corneal humano artificial y todas las semanas es similar ( $VAF's > 96\%$ ), obteniéndose valores mayores para las longitudes de onda cortas y disminuyendo hasta mantenerse prácticamente constante a partir de 550nm, excepto para  $S_0$ . En una primera aproximación, para todos los modelos, se obtienen los menores valores de  $\mu_a$  entre las semanas  $S_1$  y  $S_4$ , excepto para el constructo F, que en la Semana 1 presenta los mayores valores de absorción. A partir de  $S_5$  a  $S_7$ , los valores de  $\mu_a$  van aumentando progresivamente, obteniendo para  $S_8$  los valores más altos de este coeficiente para todos los constructos, excepto el de Fibrina-Agarosa al 0,025%. Se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la evolución temporal de todas las concentraciones, siendo destacable que no existen cambios en la transición entre  $S_2$  y  $S_3$  de los constructos de Fibrina, Fibrina-Agarosa al 0,05% y 0,2%, y tampoco en la transición entre  $S_3$  y  $S_4$  en los de Fibrina-Agarosa al 0,1% y 0,2%.

La Tabla 4.2. muestra el estudio descriptivo y estadístico de los resultados atendiendo a la concentración de Agarosa. De manera general, se encuentran diferencias estadísticamente significativas para todas las semanas de cultivo (K-W  $p < 0,001$  para todos los casos). No obstante, es de destacar como excepción, que en  $S_4$  el comportamiento espectral del el coeficiente de absorción es similar entre las concentraciones de Agarosa 0,025% y 0,05%, 0,05% y 0,01% , y 0,2% y 0,3% ( $VAF > 98\%$  y  $p > 0,05$ ). Un comportamiento análogo se observa en  $S_3$ , no encontrándose esta vez diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el de concentración 0,05 con 0,1% y 0,2 con 0,3%.



**Legenda** S<sub>0</sub> ■ S<sub>1</sub> ■ S<sub>2</sub> ■ S<sub>3</sub> ■ S<sub>4</sub> ■ S<sub>5</sub> ■ S<sub>6</sub> ■ S<sub>7</sub> ■ S<sub>8</sub> ■

**Figura 4.3.** Coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal.

	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8		MEDIA MAT.	
	MEDIA	D.T.	MEDIA	D.T.																
<b>FIBRINA</b>	0,1003	0,0196	0,1250	0,0297	0,0230	0,0144	0,0268	0,0179	0,0159	0,0193	0,0479	0,0209	0,0482	0,0255	0,0702	0,0237	0,1178	0,0249	0,0639	0,0416
Mann-Whitney(p) F vs FA <sub>025</sub>	<0,001		<0,001		0,141		0,007		0,006		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,002	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,025%)</b>	0,0761	0,0138	0,0452	0,0135	0,0225	0,0083	0,0222	0,0153	0,0187	0,0177	0,1339	0,0306	0,2132	0,0340	0,1708	0,0267	0,0311	0,0173	0,0815	0,0732
Mann-Whitney(p) FA <sub>025</sub> vs FA <sub>050</sub>	<0,001		0,008		0,084		<0,001		0,152		<0,001		<0,001		0,098		<0,001		0,069	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,05%)</b>	0,0753	0,0220	0,0405	0,0104	0,0317	0,0227	0,0171	0,0147	0,0209	0,0201	0,1198	0,0289	0,0632	0,0131	0,1690	0,0295	0,2322	0,0387	0,0855	0,0742
Mann-Whitney(p) FA <sub>050</sub> vs FA <sub>100</sub>	<0,001		0,002		<0,001		0,478		0,059		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,315	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,1%)</b>	0,1103	0,0451	0,0448	0,0137	0,0200	0,0120	0,0179	0,0129	0,0210	0,0166	0,0989	0,0215	0,1061	0,0295	0,1488	0,0372	0,1979	0,0301	0,0851	0,0638
Mann-Whitney(p) FA <sub>100</sub> vs FA <sub>200</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,114		<0,001		<0,001		0,173	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,2%)</b>	0,0802	0,0395	0,0373	0,0125	0,0229	0,0113	0,0287	0,0200	0,0275	0,0173	0,0952	0,0241	0,0969	0,0178	0,0947	0,0210	0,2650	0,0252	0,0832	0,0753
Mann-Whitney(p) FA <sub>200</sub> vs FA <sub>300</sub>	<0,001		0,169		<0,001		0,416		0,510		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,015	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,3%)</b>	0,0698	0,0313	0,0373	0,0148	0,0419	0,0183	0,0251	0,0154	0,0303	0,0190	0,0646	0,0121	0,0920	0,0321	0,0910	0,0260	0,1508	0,0189	0,0670	0,0401
Kruskal-Wallis (p)	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
<b>MEDIA SEMANAL</b>	0,0853	0,0161	0,0550	0,0344	0,0270	0,0083	0,0230	0,0048	0,0224	0,0054	0,0934	0,0325	0,1033	0,0581	0,1241	0,0440	0,1658	0,0848	0,0777	0,0097

**Tabla 4.2.** Promedios del coeficiente de absorción para todos los modelos y semanas de estudio y comparación estadística entre concentraciones

### 4.2.3. Albedo de Transporte:

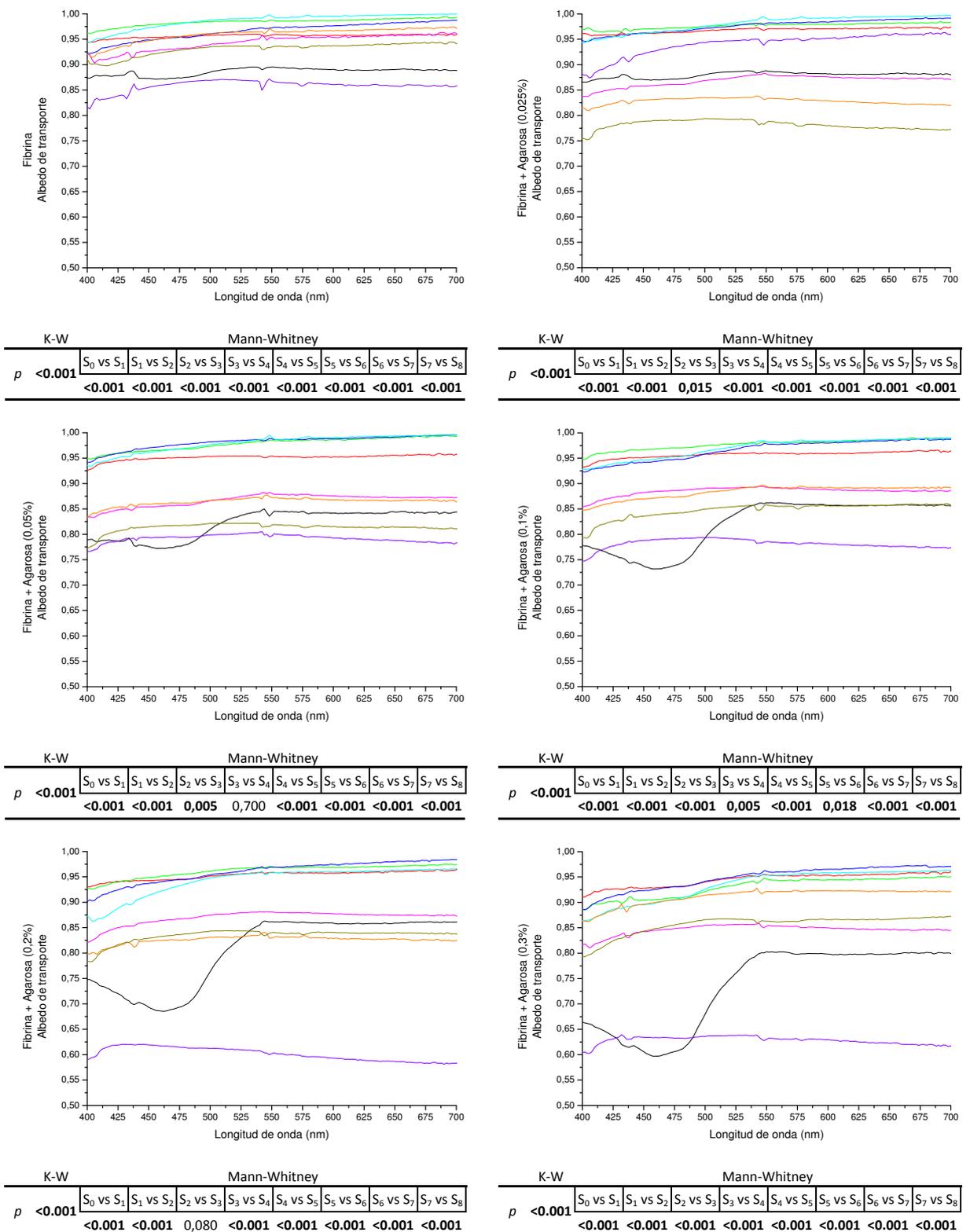
En la Figura 4.4. y en la Tabla 4.3. se muestran los resultados para el albedo de transporte ( $\alpha'$ ) que hemos obtenido para nuestros constructos y las comparaciones correspondientes entre semanas y concentraciones. Recordemos que el albedo de transporte nos indica en qué proporción el *scattering* y la absorción son responsables de la extinción de la luz. Cuando la absorción tiende a cero, este parámetro adopta valores próximos a la unidad.

Como se puede apreciar en todas las gráficas, el comportamiento espectral para este parámetro es similar (VAF > 96%) para todas las concentraciones y semanas de cultivo (excepto  $S_0$ ), siendo más bajo para los valores de longitud de onda próximos a 400nm y aumentando ligeramente hasta los 700nm. Esto indica que la componente de absorción es espectralmente dependiente, siendo más importante para las longitudes de onda corta. Este comportamiento se encuentra de forma más acentuada para  $S_0$  y cuanto mayor es la concentración de Agarosa.

Como se observa en la Figura 4.4., los valores de albedo de transporte para los constructos entre las semanas  $S_1$  y  $S_4$  presentan los valores más altos y próximos a la unidad. La comparación estadística entre estas semanas de cultivo indica que los valores obtenidos son próximos, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Los valores de este parámetro próximos a la unidad significan que en estas primeras semanas la extinción del haz de luz que atraviesa el tejido se debe principalmente al *scattering*. Entre las semanas  $S_5$  y  $S_7$ , los valores del coeficiente de albedo disminuye de forma significativa respecto a las semanas previas ( $p < 0,001$ ), aunque encontramos valores de este coeficiente superiores al 80%. Este resultado muestra que, a partir de la quinta semana de cultivo, la influencia de la absorción es más importante que en las semanas previas. Finalmente, es en  $S_8$  donde encontramos los valores más bajos de  $\alpha'$  ( $p < 0,001$   $S_8$  contra el resto de semanas), lo que ratifica que la componente de absorción es cada vez más importante en las últimas semanas de cultivo.

Si nos centramos en la comparación entre las diferentes concentraciones de Agarosa objeto de estudio (Tabla 4.3.), encontramos que, de manera general, existen diferencias estadísticamente significativas entre concentraciones para todas las semanas (test de K-W  $p < 0,001$  para todos los casos). Para la mayoría de las semanas, el

albedo de transporte que más se acerca a la unidad (o lo que es lo mismo, extinción debida principalmente al *scattering*) es el correspondiente a los constructos de Fibrina y, conforme aumenta la concentración de Agarosa, el coeficiente de albedo va disminuyendo, siendo el menor  $a'$  el correspondiente a los constructos de FA<sub>300</sub>. Únicamente no se encuentran diferencias significativas cuando comparamos los constructos de Fibrina-Agarosa al 0,1% y 0,2% para S<sub>0</sub> y para los constructos de Fibrina-Agarosa al 0,025% y 0,05% para S<sub>4</sub> y S<sub>5</sub>.



**Leyenda** S<sub>0</sub> ■ S<sub>1</sub> ■ S<sub>2</sub> ■ S<sub>3</sub> ■ S<sub>4</sub> ■ S<sub>5</sub> ■ S<sub>6</sub> ■ S<sub>7</sub> ■ S<sub>8</sub> ■

**Figura 4.4.** Albedo de transporte ( $a'$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal.

	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8		MEDIA MAT.	
	MEDIA	D.T.	MEDIA	D.T.																
<b>FIBRINA</b>	0,8662	0,0073	0,9564	0,0035	0,9841	0,0071	0,9659	0,0169	0,9866	0,0144	0,9438	0,0156	0,9595	0,0140	0,9310	0,0125	0,8585	0,0111	0,9413	0,0434
<i>Mann-Whitney(p) F vs FA<sub>025</sub></i>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,025%)</b>	0,8796	0,0057	0,9679	0,0049	0,9766	0,0053	0,9763	0,0127	0,9806	0,0158	0,8684	0,0106	0,8282	0,0060	0,7817	0,0089	0,9407	0,0217	0,9111	0,0741
<i>Mann-Whitney(p) FA<sub>025</sub> vs FA<sub>050</sub></i>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,251		0,322		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,05%)</b>	0,8215	0,0280	0,9516	0,0054	0,9785	0,0124	0,9817	0,0126	0,9795	0,0167	0,8669	0,0121	0,8644	0,0075	0,8137	0,0083	0,7919	0,0073	0,8944	0,0784
<i>Mann-Whitney(p) FA<sub>050</sub> vs FA<sub>100</sub></i>	<0,001		<0,001		0,045		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,236	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,1%)</b>	0,8195	0,0495	0,9571	0,0065	0,9773	0,0098	0,9663	0,0197	0,9702	0,0193	0,8852	0,0080	0,8833	0,0126	0,8478	0,0145	0,7817	0,0091	0,8987	0,0727
<i>Mann-Whitney(p) FA<sub>100</sub> vs FA<sub>200</sub></i>	0,497		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,2%)</b>	0,8048	0,0690	0,9530	0,0084	0,9616	0,0126	0,9597	0,0216	0,9427	0,0286	0,8700	0,0129	0,8259	0,0079	0,8346	0,0124	0,8014	0,0128	0,8615	0,1159
<i>Mann-Whitney(p) FA<sub>200</sub> vs FA<sub>300</sub></i>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,126	
<b>FIBRINA+AGAROSA (0,3%)</b>	0,7343	0,0808	0,9448	0,0131	0,9303	0,0194	0,9486	0,0231	0,9346	0,0307	0,8463	0,0097	0,9118	0,0160	0,8568	0,0187	0,8285	0,0076	0,8596	0,1106
<i>Kruskal-Wallis (p)</i>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
<b>MEDIA SEMANAL</b>	0,8243	0,0555	0,9551	0,0077	0,9681	0,0199	0,9664	0,0118	0,9657	0,0217	0,8801	0,0336	0,8789	0,0513	0,8443	0,0503	0,7671	0,1311	0,8944	0,0737

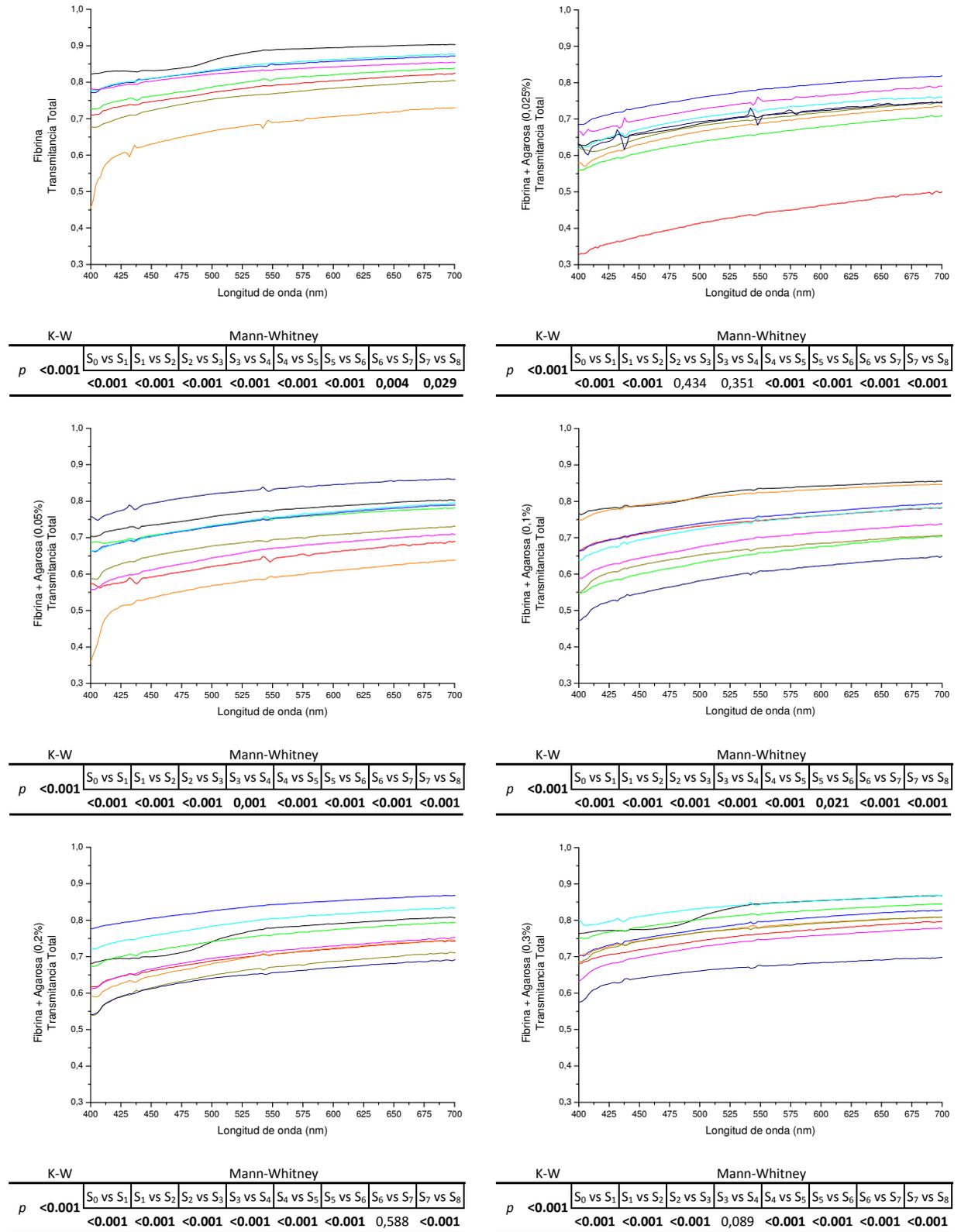
**Tabla 4.3.** Promedios del albedo de transporte para todos los modelos y semanas de estudio y comparación estadística entre concentraciones

#### 4.2.4. Transmitancia en el espectro visible.

La Figura 4.5. y la Tabla 4.4. muestran los valores obtenidos para la transmitancia para un espesor estimado de estroma corneal central de 0,5mm en el rango del visible y el resultado de la estadística realizada para la evolución temporal de cada uno de los constructos y concentración creciente de Agarosa.

De manera general, la transmitancia para todas las semanas de cultivo presenta un comportamiento espectral similar, con valores de  $T_{VIS}$  más bajos para las longitudes de onda cortas y aumentando progresivamente para las longitudes de onda medias y largas ( $VAF > 98\%$  entre semanas). Para  $S_0$  el valor del VAF disminuye hasta el 96% en comparación con el resto de las semanas. Además, si comparamos la transmitancia de cada modelo, a lo largo del periodo de cultivo analizado, encontramos que existe diferencias estadísticamente significativas entre semanas (K-W  $p < 0,001$  para todas las semanas). Como una primera aproximación, si consideramos el valor medio de la transmitancia para todas las longitudes de onda, la menor transmitancia la presentan los constructos en  $S_1$  ( $0,67 \pm 0,13$ ) y la mayor, en  $S_3$  ( $0,78 \pm 0,04$ ).

Los estudios estadísticos realizados (Tabla 4.4.) muestran que existen diferencias significativas entre los modelos con diferentes concentración de Agarosa para cada semana de cultivo (M-W  $p < 0,05$ ), excepto cuando realizamos la comparación  $F_{050}$  vs  $FA_{100}$  en  $S_7$ , que se comportan similar (M-W  $p = 0,861$ ). Es de destacar que existe un aumento progresivo, tomando valores medios de las 8 semanas de cultivo, de la transmitancia con el aumento de la concentración de Agarosa, tomando valores medios de  $T_{vis}$  para los constructos de F de  $0,67 \pm 0,10$  a  $0,80 \pm 0,06$  para  $FA_{300}$ .



**Legenda** S<sub>0</sub> ■ S<sub>1</sub> ■ S<sub>2</sub> ■ S<sub>3</sub> ■ S<sub>4</sub> ■ S<sub>5</sub> ■ S<sub>6</sub> ■ S<sub>7</sub> ■ S<sub>8</sub> ■

**Figura 4.5.** Transmitancia en el visible ( $T_{vis}$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal.

	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8		MEDIA M.A.T.	
	MEDIA	D.T.	MEDIA	D.T.																
FIBRINA	0.7005	0.0345	0.4324	0.0478	0.6524	0.0409	0.7719	0.0365	0.7145	0.0389	0.7398	0.0370	0.6782	0.0438	0.6924	0.0395	0.7018	0.0371	0.6760	0.0976
Mann-Whitney(p) F vs FA <sub>025</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,038		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,025%)	0.7675	0.0281	0.6366	0.0373	0.7429	0.0303	0.7437	0.0356	0.7465	0.0370	0.6581	0.0413	0.5781	0.0524	0.6852	0.0360	0.8259	0.0299	0.7094	0.0761
Mann-Whitney(p) FA <sub>025</sub> vs FA <sub>050</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,009		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,029	
FIBRINA+AGAROSA (0,05%)	0.8232	0.0273	0.7419	0.0300	0.6475	0.0427	0.7495	0.0344	0.7359	0.0385	0.6881	0.0398	0.8164	0.0254	0.6611	0.0371	0.5941	0.0440	0.7175	0.0767
Mann-Whitney(p) FA <sub>050</sub> vs FA <sub>100</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,861		<0,001		0,011	
FIBRINA+AGAROSA (0,1%)	0.7591	0.0426	0.6993	0.0343	0.7522	0.0328	0.8351	0.0260	0.7942	0.0319	0.7056	0.0366	0.6940	0.0428	0.6592	0.0428	0.6473	0.0361	0.7274	0.0624
Mann-Whitney(p) FA <sub>100</sub> vs FA <sub>200</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,2%)	0.8267	0.0370	0.7552	0.0315	0.8109	0.0268	0.7862	0.0340	0.8384	0.0237	0.7359	0.0353	0.7749	0.0286	0.7727	0.0304	0.6664	0.0273	0.7741	0.0522
Mann-Whitney(p) FA <sub>200</sub> vs FA <sub>300</sub>	<0,001		<0,001		0,001		<0,001		0,014		<0,001		<0,001		0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,3%)	0.8732	0.0288	0.7630	0.0315	0.7988	0.0315	0.8393	0.0267	0.8430	0.0281	0.8279	0.0216	0.6746	0.0512	0.7609	0.0347	0.7850	0.0226	0.7984	0.0584
Kruskal-Wallis (p)	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
MEDIA SEMANAL	0.7917	0.0613	0.6747	0.1292	0.7341	0.0702	0.7876	0.0414	0.7787	0.0546	0.7259	0.0585	0.7027	0.0638	0.7053	0.0496	0.7034	0.0873	0.7338	0.0448

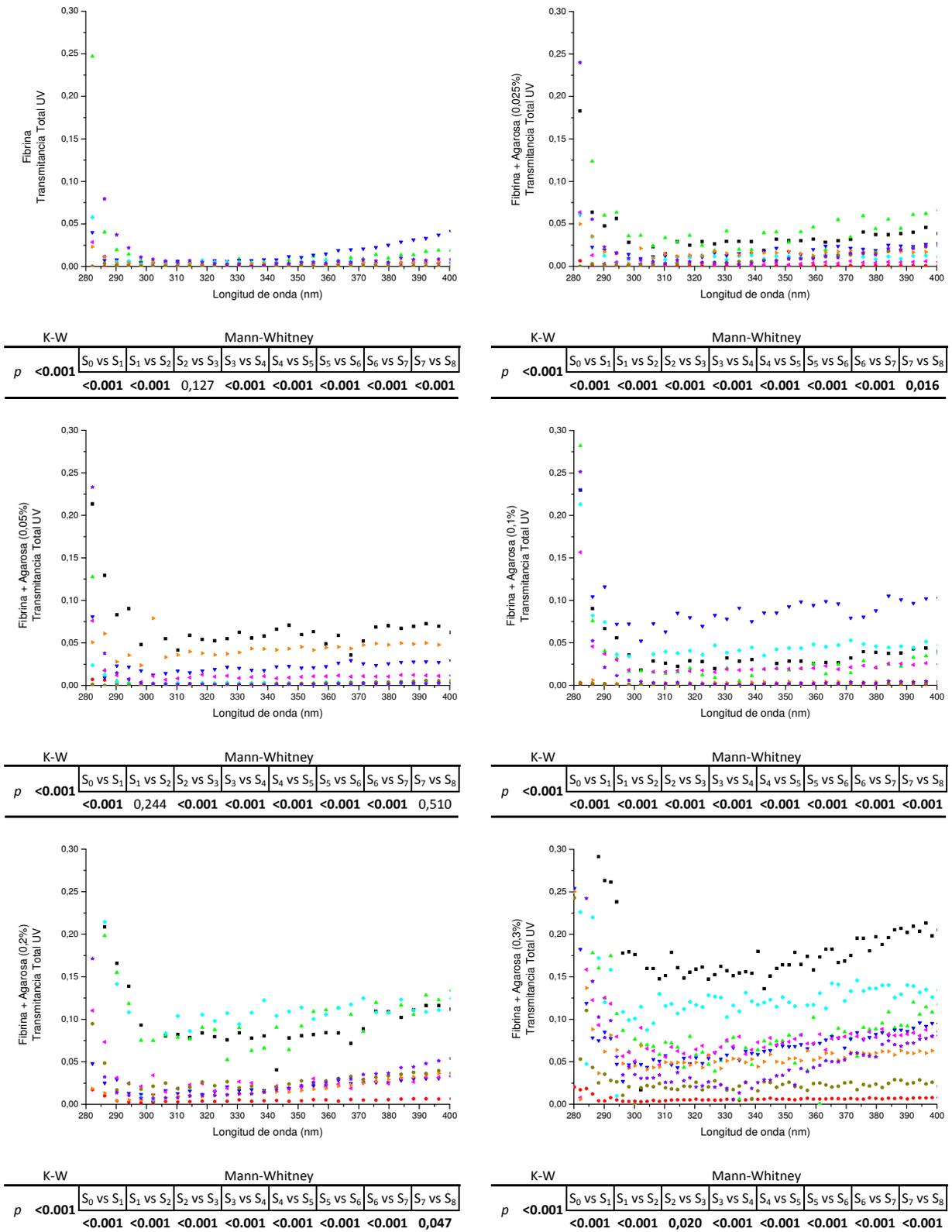
Tabla 4.4. Promedios de la transmitancia en visible para todos los modelos y semanas de estudio y comparación estadística entre concentraciones

### 4.3. TRANSMITANCIA ESPECTRAL PARA LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

En la Figura 4.6. y la Tabla 4.5. se muestran los resultados obtenidos para la transmitancia espectral para la radiación ultravioleta ( $T_{UV}$ ) y su correspondiente estadística descriptiva y comparativa para tiempos de cultivo y niveles de Agarosa.

Aunque los constructos presentan un comportamiento espectral similar para todos las semanas de cultivo ( $VAF > 95\%$ ), existen diferencias significativas para el valor de la transmitancia de la radiación ultravioleta para cada uno de los modelos a lo largo del tiempo de cultivo ( $K-W p < 0,001$ ), excepto para el constructo F entre  $S_2-S_3$  y el constructo  $FA_{050}$  entre  $S_1-S_2$  y  $S_7-S_8$ . Se puede apreciar que los constructos presentan mayor transmitancia en la radiación ultravioleta para  $S_0$  ( $0,080 \pm 0,066$ ),  $S_3$  ( $0,042 \pm 0,033$ ) y  $S_4$  ( $0,056 \pm 0,055$ ), y valores menores en  $S_1$  ( $0,003 \pm 0,003$ ).

Analizando a continuación la influencia del nivel de Agarosa, se puede apreciar cualitativamente en la gráfica (Figura 4.6.) cómo los constructos F son los que tienen la menor  $T_{UV}$  (con un promedio entre semanas de  $0,012 \pm 0,011$ ), aumentando conforme aumenta la concentración de Agarosa. Así, se obtiene el mayor valor para  $FA_{300}$  ( $0,082 \pm 0,056$ ). Además, y de forma general, encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Agarosa de los diferentes constructos para un tiempo determinado de cultivo ( $K-W p < 0,001$ ), encontrando sólo comportamientos similares en  $S_7$  para los constructos  $FA_{050}$  y  $FA_{100}$  ( $M-W p = 0,211$ ).



**Legenda** S<sub>0</sub> ■ S<sub>1</sub> ● S<sub>2</sub> ▲ S<sub>3</sub> ▼ S<sub>4</sub> ◆ S<sub>5</sub> ◆ S<sub>6</sub> ▲ S<sub>7</sub> ● S<sub>8</sub> ◆

**Figura 4.6.** Transmitancia para la radiación UV ( $T_{UV}$ ) para cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial y comparación estadística de su evolución temporal

	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6		Semana 7		Semana 8		MEDIA TOTAL	
	MEDIA	D.T.	MEDIA	D.T.																
FIBRINA	1,57E-02	2,41E-02	2,69E-06	1,41E-05	2,59E-02	8,32E-02	1,53E-02	1,19E-02	9,32E-03	2,38E-02	3,68E-03	6,16E-03	5,29E-03	8,18E-03	1,88E-03	8,73E-03	3,00E-02	1,06E-01	0,0119	0,0107
Mann-Whitney(p) F vs FA <sub>025</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,006		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,025%)	4,05E-02	4,01E-02	7,58E-04	9,89E-04	6,32E-02	1,04E-01	2,10E-02	1,49E-02	1,58E-02	2,88E-02	6,38E-03	1,29E-02	1,75E-02	1,23E-02	8,53E-03	6,65E-03	2,48E-02	6,34E-02	0,0221	0,0193
Mann-Whitney(p) FA <sub>025</sub> vs FA <sub>050</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		0,005		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,05%)	7,15E-02	4,50E-02	2,97E-03	3,93E-03	1,43E-02	6,80E-02	2,51E-02	1,98E-02	6,33E-03	2,00E-02	1,45E-02	2,04E-02	4,40E-02	1,28E-02	2,38E-03	2,12E-03	1,80E-02	7,64E-02	0,0221	0,0226
Mann-Whitney(p) FA <sub>050</sub> vs FA <sub>100</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,211		0,002		0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,1%)	4,54E-02	5,93E-02	4,72E-04	1,18E-03	3,92E-02	8,43E-02	9,46E-02	3,88E-02	5,38E-02	4,60E-02	2,99E-02	4,26E-02	3,87E-03	4,12E-03	2,08E-03	3,67E-03	2,17E-02	8,62E-02	0,0323	0,0305
Mann-Whitney(p) FA <sub>100</sub> vs FA <sub>200</sub>	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
FIBRINA+AGAROSA (0,2%)	1,11E-01	8,30E-02	5,01E-03	2,88E-03	1,18E-01	1,06E-01	2,35E-02	1,46E-02	1,19E-01	5,79E-02	3,18E-02	3,09E-02	1,71E-02	9,53E-03	2,84E-02	1,42E-02	3,18E-02	4,99E-02	0,0539	0,0473
Mann-Whitney(p) FA <sub>200</sub> vs FA <sub>300</sub>	<0,001		<0,001		0,002		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		0,005		<0,001		0,003	
FIBRINA+AGAROSA (0,3%)	1,97E-01	9,12E-02	6,34E-03	3,21E-03	1,00E-01	1,04E-01	7,27E-02	3,29E-02	1,29E-01	5,48E-02	7,99E-02	4,05E-02	5,86E-02	2,97E-02	2,80E-02	3,15E-02	6,34E-02	8,34E-02	0,0817	0,0563
Kruskal-Wallis (p)	<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001		<0,001	
MEDIA SEMANAL	0,0801	0,0656	0,0026	0,0026	0,0602	0,0418	0,0420	0,0331	0,0555	0,0558	0,0277	0,0281	0,0244	0,0221	0,0119	0,0129	0,0316	0,0164	0,0373	0,0260

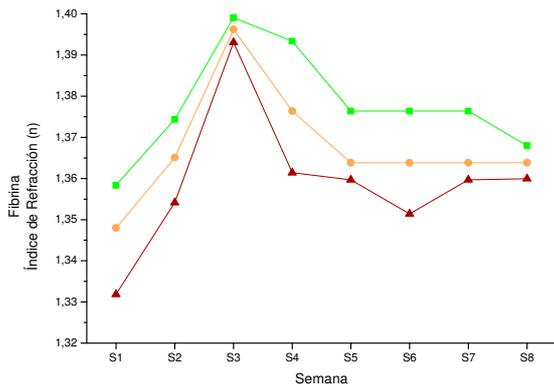
Tabla 4.5. Promedios de la transmitancia para la radiación UV para todos los modelos y semanas de estudio y comparación estadística entre concentraciones

#### 4.4. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

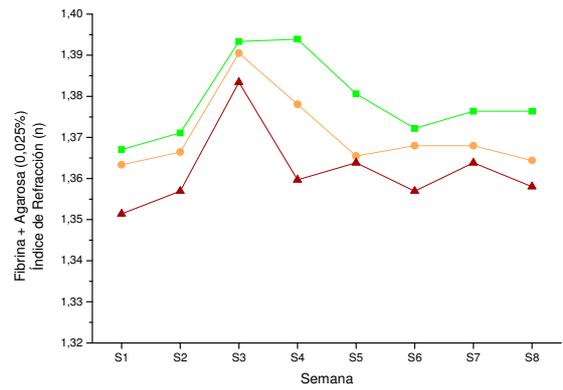
En la Figura 4.7. se muestra el índice de refracción para cada una de las longitudes de onda estudiadas (532nm, 594nm y 670nm) de cada uno de los modelos de estroma corneal humano artificial desarrollado mostrando su variación temporal.

Todos los constructos presentan valores del índice de refracción menores a medida que aumenta la longitud de onda, como es de esperar. Para  $\lambda=532\text{nm}$  se obtienen los mayores valores para todas las semanas de cultivo y todos los modelos.

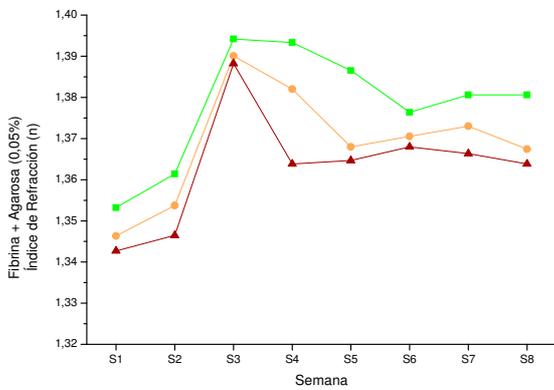
En una primera aproximación de los resultados, podemos apreciar que el comportamiento temporal es similar para todos los materiales. Aparece un aumento del valor del índice de refracción en las primeras semanas de cultivo y éste disminuye levemente o permanece invariante en las etapas finales de desarrollo. No obstante, cabe destacar que el valor máximo del índice de refracción depende del modelo estudiado. Por ejemplo, el valor máximo del índice de refracción se encuentra aproximadamente para la en  $S_3$  para los constructos de F y FA con concentraciones de hasta 0,1% de Agarosa, mientras que para los constructos de concentraciones más altas ( $FA_{200}$  y  $FA_{300}$ ), el valor máximo del índice de refracción se alcanza en  $S_4$ .



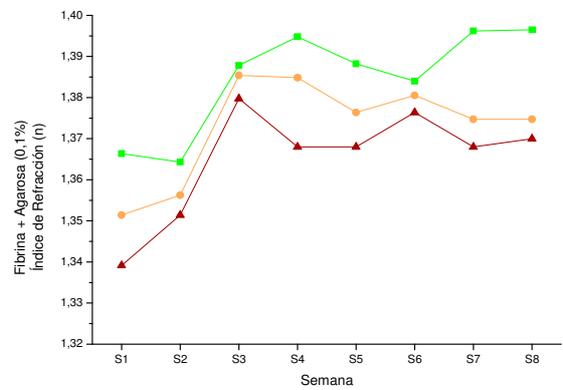
nm	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
532	1,3584	1,3744	1,3991	1,3934	1,3764	1,3764	1,3764	1,3680
594	1,3480	1,3651	1,3962	1,3764	1,3638	1,3638	1,3638	1,3638
670	1,3319	1,3542	1,3931	1,3614	1,3597	1,3514	1,3597	1,3600



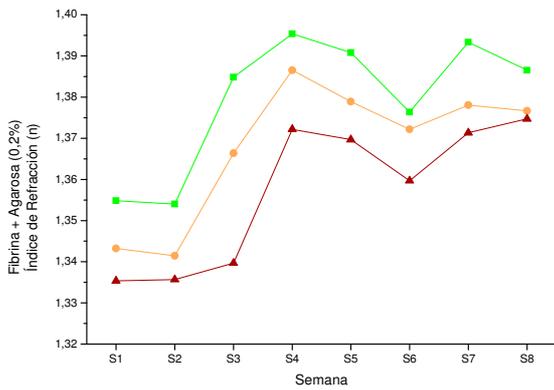
nm	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
532	1,3670	1,3711	1,3934	1,3939	1,3806	1,3722	1,3764	1,3764
594	1,3634	1,3664	1,3905	1,3781	1,3655	1,3680	1,3680	1,3644
670	1,3514	1,3569	1,3834	1,3597	1,3638	1,3569	1,3638	1,3580



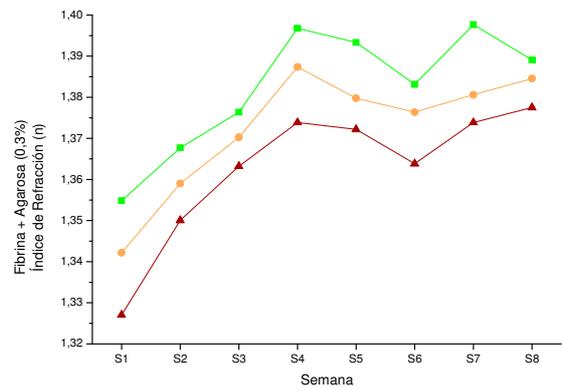
nm	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
532	1,3532	1,3614	1,3942	1,3934	1,3865	1,3764	1,3806	1,3806
594	1,3463	1,3538	1,3901	1,3820	1,3680	1,3705	1,3730	1,3674
670	1,3427	1,3465	1,3882	1,3638	1,3647	1,3680	1,3663	1,3638



nm	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
532	1,3664	1,3643	1,3878	1,3948	1,3882	1,3840	1,3962	1,3965
594	1,3514	1,3562	1,3854	1,3848	1,3764	1,3805	1,3747	1,3747
670	1,3392	1,3514	1,3798	1,3680	1,3680	1,3764	1,3680	1,3700



nm	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
532	1,3548	1,3541	1,3848	1,3954	1,3908	1,3764	1,3934	1,3865
594	1,3432	1,3414	1,3664	1,3865	1,3789	1,3722	1,3781	1,3767
670	1,3354	1,3357	1,3397	1,3722	1,3697	1,3597	1,3713	1,3747



nm	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>
532	1,3548	1,3677	1,3764	1,3968	1,3934	1,3831	1,3976	1,3891
594	1,3422	1,3590	1,3702	1,3874	1,3798	1,3764	1,3806	1,3846
670	1,3270	1,3501	1,3632	1,3739	1,3722	1,3638	1,3739	1,3775

**Leyenda**    532nm ■    594nm ●    670nm ▲

**Figura 4.7.** Índice de refracción (n) para cada uno de los materiales, longitudes de onda y evolución temporal

# Capítulo 5

## Discusión



### ***Sobre la construcción de modelos de estroma corneal humano artificial***

La córnea está expuesta a diversas patologías y traumatismos que pueden conducir a enfermedades crónicas, opacidades, defectos refractivos irregulares e incluso a la ceguera. La queratoplastia penetrante o trasplante de córnea es la técnica quirúrgica empleada con mayor frecuencia para el tratamiento de la patología corneal grave (Borene et al., 2004). Pero este trasplante presenta serios inconvenientes. Uno de los principales problemas es que la disponibilidad de órganos y tejidos es menor que la demanda actual existente, pudiéndose agravar en un futuro debido al auge de la cirugía refractiva (Lamparter et al., 2005), ya que las córneas sometidas a este tipo de tratamientos no son aptas para ser trasplantadas (Ousley y Terry, 2002). El rechazo inmunológico del injerto es otro inconveniente más, ya que debido al origen heterólogo del trasplante podría activarse una reacción inmunológica dirigida frente a los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA) presentes en la células del injerto, especialmente frente al endotelio, pudiendo producir un edema crónico del injerto y, por tanto, su fracaso (Coster y Williams, 2005).

Finalmente, otro de los problemas encontrados es la posibilidad de transmisión de enfermedades del donante al receptor. Aunque todos los protocolos de los diferentes Bancos de Tejidos realizan todos los controles pertinentes frente a distintas enfermedades infecciosas a los donantes (serologías y reacciones en cadena de la polimerasa), existen infecciones que en ocasiones se escapan a este control. Revisando la bibliografía encontramos casos de transmisión de virus como el de Inmunodeficiencia Humana Adquirida (Caron and Wilson, 1994), Hepatitis B y C (Hoft et al, 1997), Rabia (Houff et al, 1999) y Herpes Simple (Robert et al, 2005), de enfermedad de Creutzfeld-Jacob y otros priones (Heckmann et al, 1997; Hogan et al, 1999; Kennedy et al., 2001), de diferentes parasitosis (Herrera et al., 2006), y de bacterias y hongos cuyo reservorio es la córnea (Hassan et al., 2008; Schotveld et al., 2005). Por otra parte, también es posible la transmisión de enfermedades no infecciosas al receptor, como es el caso de degeneraciones y distrofias corneales en etapas iniciales (Borderie et al, 2001), y de ciertos tumores oculares que afectan a la superficie ocular o al segmento anterior (McGeorge, 2002).

La posibilidad de elaborar tejidos autólogos a demanda mediante Ingeniería Tisular, a partir de células extraídas del propio paciente mediante pequeñas biopsias, acabaría con las listas de espera para recibir un trasplante, con los rechazos inmunológicos, puesto que habría identidad inmunológica total y se terminaría con la posibilidad de transmitir cualquier tipo de enfermedad (Nishida, 2003). Estas son las principales razones por las que los equivalentes corneales desarrollados mediante Ingeniería Tisular se postulan como una alternativa a la queratoplastia penetrante, así como a las queratoprótesis a la hora de restaurar la agudeza visual o la estructura corneal perdida (Duan et al., 2006). En la actualidad, son múltiples los grupos de investigación que trabajan en la elaboración de sustitutos corneales mediante Ingeniería Tisular, y numerosos y rápidos los avances que se están produciendo en este campo (Gonzalez-Andrades et al., 2009; Alaminos et al., 2006; Griffith et al., 1999; Minami et al., 1993; Orwin y Hubel, 2000; Reichl y Müller-Goymann, 2003; Schneider et al., 1999; Zieske et al., 1994). Pero éste no es el único motivo que apoya esta disciplina de la Ingeniería Tisular. Si ya es difícil obtener córneas para trasplante, aún

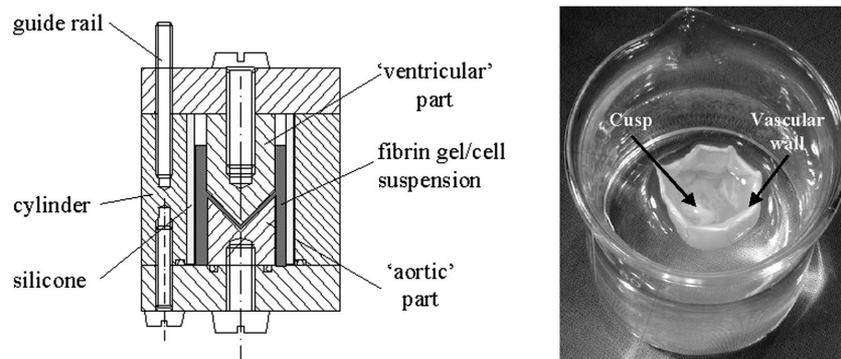
más difícil es conseguir las para la experimentación. Este es el motivo por el cual muchos estudios fisiológicos y farmacológicos se realizan en animales. Sin embargo, la experimentación con animales cada vez está más restringida. Aparte de la oposición de grupos ecologistas y de sociedades protectoras de animales, desde hace unos 20 años, numerosas directrices de la Unión Europea se han centrado en la protección de animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, haciendo hincapié en la búsqueda de sistemas biológicos *ex vivo* que sustituyan a la experimentación con animales vivos (resoluciones 86/C331/02, DOCE L222 24/08/1999, DOCE L44 20/02/1990, DOUE L230 16/09/2003 y DOUE L198 6/08/2003 de la Unión Europea). Llegados a este punto, los equivalentes corneales de origen animal o humano podrían ser empleados para estudiar, *ex vivo*, la eficacia, toxicidad o penetración en los tejidos oculares de diferentes fármacos sin la necesidad de utilizar animales vivos ni perder córneas humanas aptas para trasplante (Reichl y Müller-Goyman, 2003; Reichl et al, 2004; Tegtmeyer et al, 2001).

Pero uno de los mayores retos a los que nos enfrentamos es que la córnea generada debe tener unos requisitos análogos a la córnea nativa y, por eso, su estructura (epitelio, estroma, y endotelio) y fisiología tienen que ser semejantes. Con respecto a esto, fundamentalmente nos encontramos con varios problemas. Uno de ellos es el poder de reproducir la estructura ordenada de fibras y células en el estroma para conseguir un sustituto transparente y consistente, de tal forma que haga las funciones refractivas y protectoras que el ojo necesita. Por otro lado, es bien conocida la dificultad de regeneración del endotelio de una córnea humana, y por tanto también su proliferación *ex vivo* (Joyce, 2003) y, aunque algunos investigadores han conseguido con éxito el cultivo de células humanas endoteliales (Sumide et al., 2006; Joyce et al; 2009), un modelo eficiente de córnea humana artificial utilizando células normales de las tres principales capas de células, hasta la fecha todavía no ha sido desarrollado. Finalmente, el sustituto de córnea humana de espesor completo generado mediante Ingeniería Tisular debe, además de cumplir su función refractiva, hacer la función de filtro de todas aquellas radiaciones perjudiciales (principalmente la radiación UV) para

que el resto de la estructuras del ojo no se vean comprometidas una vez éste sea trasplantado.

Varios son los modelos de córnea artificial generados mediante Ingeniería Tisular descritos hasta el momento, en su mayoría desarrollados con células animales. Zieske et al. (1994) describió un método para generar equivalentes corneales de conejo incluyendo queratocitos estromales en un gel de colágeno con y sin una capa subyacente de células endoteliales vivas de una córnea de ratón. Otro modelo de córnea fue descrito por Minami et al. (1993), el cual utilizaba tres tipos de células inmortalizadas (epitelio, estroma y endotelio) de una córnea de bovino en matrices de colágeno, mientras que Scheneider et al. (1999) desarrolló un constructo corneal utilizando las tres capas celulares de una córnea de un feto de cerdo. En todos estos casos, el uso de colágeno tenía como inconveniente la contracción de los hidrogeles mediada por los queratocitos y por tanto la pérdida de volumen del órgano generado (Reichl et al., 2004; Germain et al. 2000). Por esto, algunos investigadores han usado matrices de Fibrina como sustitutos estromales en diferentes tejidos, incluida la córnea humana (Talbot et al., 2006; Han et al. 2002; Raman et al., 2001), debido al éxito obtenido con el uso de pegamentos biológicos basados en Fibrina para el tratamiento de córneas ulceradas (Duchesne et al., 2001). Este tipo de geles son flexibles, fáciles de separar de la placa de cultivo y de manipular. No son tóxicos, se absorben por completo una vez que se implantan y, con el paso del tiempo, son reemplazados por una matriz permanente compuesta de colágeno (Tuan et al., 1996). Son elásticos y parcialmente resistentes, por lo que se pueden suturar, y resisten al parpadeo y limpieza externa ocular. La mayor ventaja de estos tejidos corneales biogenerados es que están fabricados en su totalidad por elementos de plasma celular humano obtenido del propio paciente, por lo que se evita el riesgo de la reacción de cuerpo extraño y transmisión de enfermedades, además de poder crear un tejido complejo en 3-D con la forma del órgano que se necesite. Utilizando este tipo de geles de Fibrina, distintos investigadores lograron previamente elaborar diferentes modelos de válvulas cardiacas como se muestra en la Figura 5.1. (Jockenhoevel et al., 2001). Sin embargo, las propiedades biomecánicas de los geles de Fibrina no son comparables a las del

estroma corneal humano en términos de consistencia y transparencia (Carlsson et al., 2003). Por ese motivo la investigación actual se centra en la búsqueda de nuevos biomateriales biocompatibles cuyas propiedades biomecánicas sean análogas a las de la córnea nativa.



**Figura 5.1.** Molde para la fabricación de una válvula cardíaca. El cilindro exterior está cubierto de una capa de silicona. La parte interior del molde da forma a la válvula. La distancia entre los moldes es variable. En la imagen de la derecha se puede observar el constructo generado. (Tomadas de Jockenhoevel et al., 2001)

A este respecto, recientemente se ha desarrollado un modelo de córnea artificial basado en biomateriales de Fibrina-Agarosa el cual permitió elaborar un sustituto corneal de espesor completo de córnea de conejo (Alaminos et al. 2006), así como una córnea humana de espesor parcial (Gonzalez-Andrades et al., 2009). En el caso del conejo, desarrollaron las tres capas principales de la córnea (epitelio, estroma y endotelio), siendo la composición del estroma un gel de Fibrina humana y 0,1% de agarosa con queratocitos de conejo inmersos en él. Los análisis después de 4 semanas de cultivo demostraron que los tres tipos de células se desarrollaron adecuadamente. En la evaluación microscópica se pudo observar que las células del epitelio tendieron a formar capas estratificadas normales y que los queratocitos estromales proliferaron rápidamente en el gel de Fibrina-Agarosa, incluso la capa de células endoteliales mostró un patrón similar al endotelio de una córnea normal. Posteriormente, González-Andrades et al. (2009) construyeron un sustituto parcial de córnea humana generado mediante Ingeniería Tisular y analizaron el desarrollo secuencial de las

uniones intercelulares existentes en el epitelio corneal, encontrando que el epitelio se desarrolló de manera similar al epitelio de una córnea nativa. Es el único caso descrito en la bibliografía revisada que desarrolla un sustituto parcial realizado íntegramente con células humanas normales. Las células epiteliales fueron obtenidas utilizando explantes del limbo esclerocorneal y cultivadas hasta conseguir su confluencia. Los queratocitos fueron aislados de los fragmentos del estroma corneal cercanos al mismo limbo y posteriormente se realizó un sustituto de estroma basado en geles de Fibrina humana y Agarosa al 0,1%, de acuerdo con métodos previos (Alaminos et al., 2006). En este caso, se utilizó la técnica de cultivo aire-líquido para favorecer la maduración epitelial. Se analizaron los tejidos y el desarrollo epitelial a los 7, 14, 21 y 28 días de cultivo, encontrando un epitelio de entre 5 y 10 capas celulares y uniones intercelulares similares a los de una córnea humana nativa en desarrollo.

### ***Sobre la evaluación de las propiedades ópticas en el espectro visible***

Uno de los principales requisitos que un tejido artificial debe cumplir es la similitud estructural, fisiológica y biomecánica con el tejido nativo que se quiere reproducir. Por ese motivo, la legislación actual obliga a llevar a cabo estrictos controles de calidad en los órganos artificiales destinados a uso clínico. En el caso de la córnea es fundamental evaluar las propiedades ópticas de los constructos generados en laboratorio para determinar que su nivel de transparencia es similar al de la córnea humana nativa y por tanto podrían utilizarse para el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular. De hecho, conocer las propiedades ópticas de los modelos de estroma corneal humano debe formar una parte importante del proceso de control de calidad de estos tejidos biogenerados. Este control es esencial antes de que las córneas puedan ser utilizadas clínicamente, ya que la organización espacial de la matriz extracelular de la córnea y de las células en cultivo podrían ser muy diferentes a la de las córneas humanas nativas.

Trabajos previos de nuestro laboratorio (Gómez Sotomayor et al., 2008a; Gómez Sotomayor et al., 2008b) se centraron en el estudio preliminar de las propiedades ópticas de los constructos no nanoestructurados de Fibrina y Fibrina-Agarosa con una concentración de Agarosa al 0,1%, analizando los coeficientes de *scattering*, absorción y extinción de K-M y previsión de transmitancia a diferentes espesores corneales, encontrando que los tejidos biogenerados de Fibrina-Agarosa al 0,1% son los que presentan unas características ópticas más parecidas al estroma de la córnea nativa.

En este sentido, uno de los parámetros que más podría influir en las propiedades ópticas del modelo de estroma corneal humano artificial descrito en esta Tesis Doctoral es la composición del biomaterial utilizado. De hecho, actualmente no se conoce cuál es el nivel más adecuado de agarosa que resulta conveniente para obtener unas propiedades físicas óptimas para el estroma corneal humano artificial. Por este motivo uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral es la determinación de parámetros ópticos en estromas corneales generados con distintas concentraciones de Agarosa, siendo ésta la primera vez que se realiza un estudio cuantitativo sobre las propiedades ópticas del estroma de Fibrina con distintas concentraciones de Agarosa, tales como la transmitancia, absorción, *scattering* y albedo de transporte

De este modo, en esta Tesis Doctoral hemos estudiado el modelo de estroma corneal humano artificial basado en Fibrina y Agarosa en concentraciones crecientes y pretendemos determinar, según sus propiedades ópticas, qué tiempo de cultivo es el más adecuado a la hora de conseguir un modelo de sustituto corneal que más se asemeje a una córnea humana nativa.

Por otro lado es importante destacar que esta es la primera vez que se estudia el comportamiento óptico de los biomateriales de Fibrina y Agarosa sometidos a un proceso de nanoestructuración. Este proceso recientemente descrito consiste en la aplicación de fuerzas físicas combinadas a la deshidratación parcial del biomaterial para inducir la formación de enlaces intermoleculares a nivel inferior de una micra de distancia. Por ello, es de esperar que las propiedades ópticas y biomecánicas sean

diferentes a las del material original, y por este motivo hemos centrado el estudio en este tipo de material (Horii et al., 2007; Zhang, 2003).

La propagación de la luz a través de un medio turbido homogéneo esta determinada por las propiedades ópticas del medio tales como el *scattering*, la absorción, la función de fase de *scattering* y el índice de refracción. El *scattering* es dominante en los medios biológicos (Cheong, 1990). Estas propiedades ópticas de los tejidos biológicos son importantes en la terapia fotodinámica y en las técnicas de diagnóstico y, en general, se obtienen mediante las soluciones de la ecuación de transporte radiativo que expresan las propiedades ópticas en términos de cantidades que se pueden medir. Estas soluciones pueden ser exactas o aproximadas y corresponden a métodos directos o indirectos. Los métodos directos imponen unas restricciones en las muestras para que coincidan con las suposiciones realizadas para las soluciones exactas, mientras que los métodos indirectos no imponen restricciones pero sí requieren aproximaciones que muchas veces no son válidas para las muestras de tejido (por ejemplo, *scattering* isotrópico o ninguna reflexión interna entre las superficies). En general, las teorías que utilizan los métodos indirectos son Lambert-Beer, Kubelka-Munk y las aproximaciones de la Teoría Difusa (Cheong, 1990). Estos métodos son los más utilizados en la actualidad ya que son simples, imponen restricciones menores sobre el tipo de la muestra y tienen soluciones analíticas y, por esto, son las que hemos utilizado para la determinación de las propiedades ópticas de los modelos de estroma corneal humano artificial en la presente Tesis Doctoral.

Una de las propiedades más importantes de la córnea nativa es su capacidad de transmitir la luz incidente en el rango del espectro visible. Por esta razón, una córnea generada mediante Ingeniería Tisular debe ser transparente desde el punto de vista óptico para poder refractar la luz hacia la retina, imitando el comportamiento natural de una córnea nativa. La magnitud que describe esta propiedad es la transmitancia óptica, que se define como la fracción de luz incidente, a una longitud de onda específica, que pasa a través de un medio. En la córnea nativa, la transmitancia depende tanto de las células (número y área) del estroma corneal (que constituye el

90% del espesor corneal) como de la alta organización de la matriz extracelular, ya que estos factores influyen principalmente en la dispersión y absorción de la luz que pasa a través del tejido. (Meek et al., 2003).

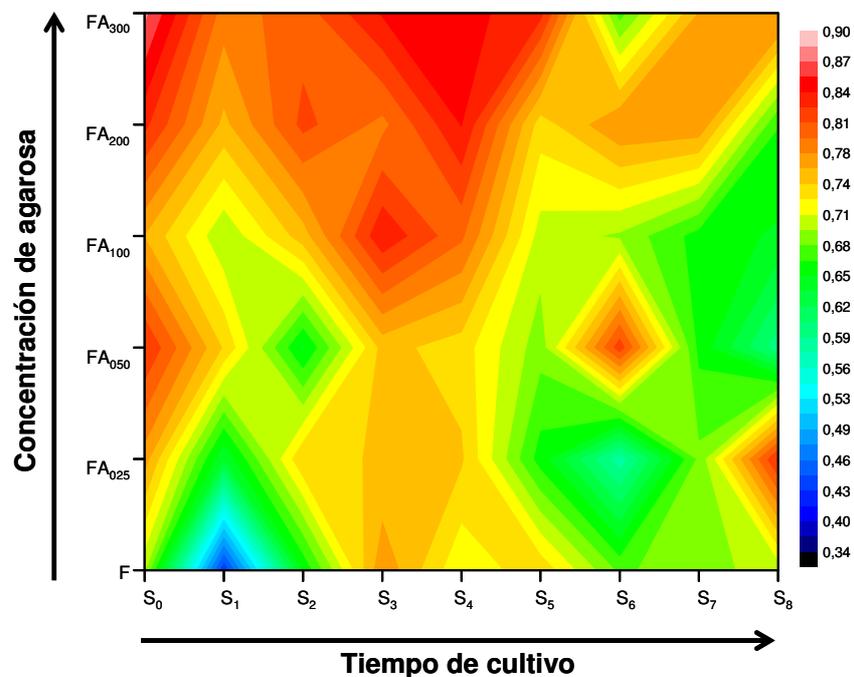
Una córnea humana normal es altamente transparente para el rango visible. Sin embargo, debido a la dificultad que supone diferenciar entre la luz dispersada y la luz absorbida son pocos los trabajos que justifican el valor de esta transparencia en términos de *scattering* y absorción. Así, para solucionar este problema, algunos trabajos evitan el efecto del *scattering* colocando el detector muy próximo a la muestra (Beems and van Best, 1990) o utilizando muestras muy delgadas (Kolozsvari et al, 2002). En términos generales, parece poco probable que la absorción juegue un papel significativo en la atenuación de la luz transmitida por la córnea en el rango del espectro visible (Freegard, 1997).

Varios autores han estudiado la luz dispersada (*scattering*) por la córnea utilizando diferentes técnicas, pero sin especificar la longitud de onda. Lindström et al. (1973) encontró que la mayor intensidad de la luz dispersada en la córnea de conejo provenía de las regiones más próximas a las capas límite, especialmente las anteriores, debido a la menor organización regular de las fibras de colágeno en esas zonas. Olsen (1982) midió la luz dispersada angular *in vivo* a través de la parte central de una córnea humana de espesor completo y mostró que el incremento de la cantidad de luz dispersada con la edad era debido al desorden de las fibras de colágeno. Hay que señalar que, aunque la mayor intensidad de luz dispersada se origina en las capas límite de la córnea (epitelio y endotelio), el mayor *scattering* se produce en el estroma, debido a su mayor espesor (McCally y Farrell, 1976).

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral muestran que la transmitancia óptica de los modelos de estroma corneal humano artificial, en general, presentan un comportamiento espectral similar entre todos ellos, independientemente del tiempo de cultivo y concentración de agarosa (VAF>97% en todos los casos). Dicho comportamiento espectral coincide con el de la córnea nativa predicho por Meek et al. (2003) obtenido mediante el método DSF (en el rango

espectral de 400 a 700nm), aunque los valores de la transmitancia obtenidos para los modelos de estroma corneal son inferiores, especialmente para las longitudes de onda cortas, no alcanzan el 90% en ninguno de los modelos ni tiempos de desarrollo analizados, siendo este el valor patrón normal de la córnea nativa (Figura 1.8). Es decir, el valor de la transmitancia de los constructos se corresponden con el 90% de la transmitancia de la córnea nativa. Por otra parte, si comparamos el comportamiento espectral de nuestros modelos de estroma corneal humano artificial con los resultados sobre la transmitancia de la córnea humana *in vivo* empleando técnicas espectrofotométricas (Beems y van Best, 1990; van Best et al., 1988) encontramos que, aunque los valores presentan un rango similar, el comportamiento espectral difiere para las longitudes de onda cortas, donde el crecimiento es más acusado para la córnea nativa.

La Figura 5.2, mediante un mapa de color, muestra conjuntamente la distribución de los valores de la transmitancia para las diferentes concentraciones de agarosa y tiempos de cultivo. Como se observa en la Figura, el valor de la transmitancia es siempre inferior al 90% y superior al 50% en la mayoría de los modelos analizados.



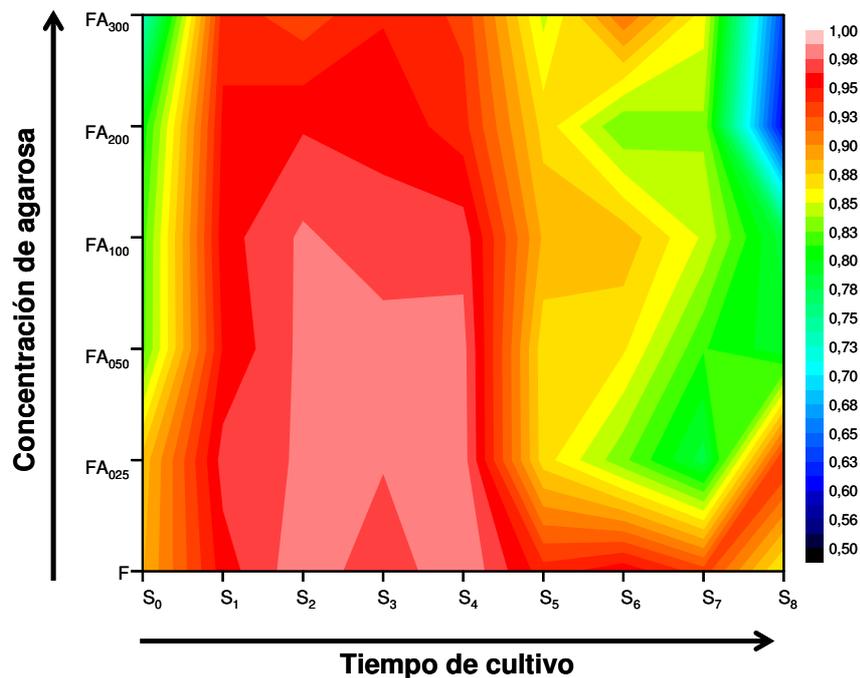
**Figura 5.2.** Mapa de áreas de color correspondiente a la transmitancias obtenidas para todos los modelos de estroma corneal humano artificial estudiados.

Se observa fácilmente que, excepto en la etapa inicial de cultivo, donde realmente el tejido aún no está completamente desarrollado, los modelos de estroma corneal humano que presentan mayor transmitancia son los de mayor concentración de agarosa y, en concreto, aquellos que se han mantenido en cultivo durante las 3-5 semanas. Puesto que el desarrollo de las córneas humanas artificiales requiere un tiempo medio de cultivo de cuatro semanas para la maduración epitelial (Gonzalez-Andrades et al., 2009) estos resultados refuerzan la idea de que los constructos corneales humanos generados en laboratorio deberían ser implantados clínicamente entre la 3-5 semanas de desarrollo. De acuerdo con nuestro análisis histológico este periodo corresponde con niveles intermedios de proliferación celular (aproximadamente, 250 cél/mm<sup>2</sup>). Probablemente, mayores niveles de celularidad suponen una mayor atenuación de la luz por parte del medio y por tanto menor transmitancia.

Una vez determinada la transmitancia nos vamos a centrar en el estudio de los parámetros que influyen sobre ésta. El coeficiente de albedo nos informa sobre cuál de los coeficientes de *scattering* y absorción es predominante y el que determina realmente sobre la transmitancia. Los valores obtenidos para el coeficiente de albedo de transporte, en general superiores a 0,76 (Figura 4.4), indican que el *scattering* es el principal responsable de la transmitancia en los constructos estudiados. Este resultado es concordante con estudios previos que demuestran que la transmitancia de la córnea humana nativa está fuertemente influenciada por el *scattering*, excepto en las longitudes de onda extremadamente cortas, donde la absorción empieza a ser importante (van Den Berg y Tan, 1994). Además, como hemos señalado anteriormente, el mayor *scattering* se produce en el estroma corneal (McCally y Farell, 1976).

Existe un ligero crecimiento del coeficiente de albedo de transporte con la longitud de onda. Así, la dependencia de la transmitancia con el *scattering* es ligeramente superior para las longitudes de onda largas.

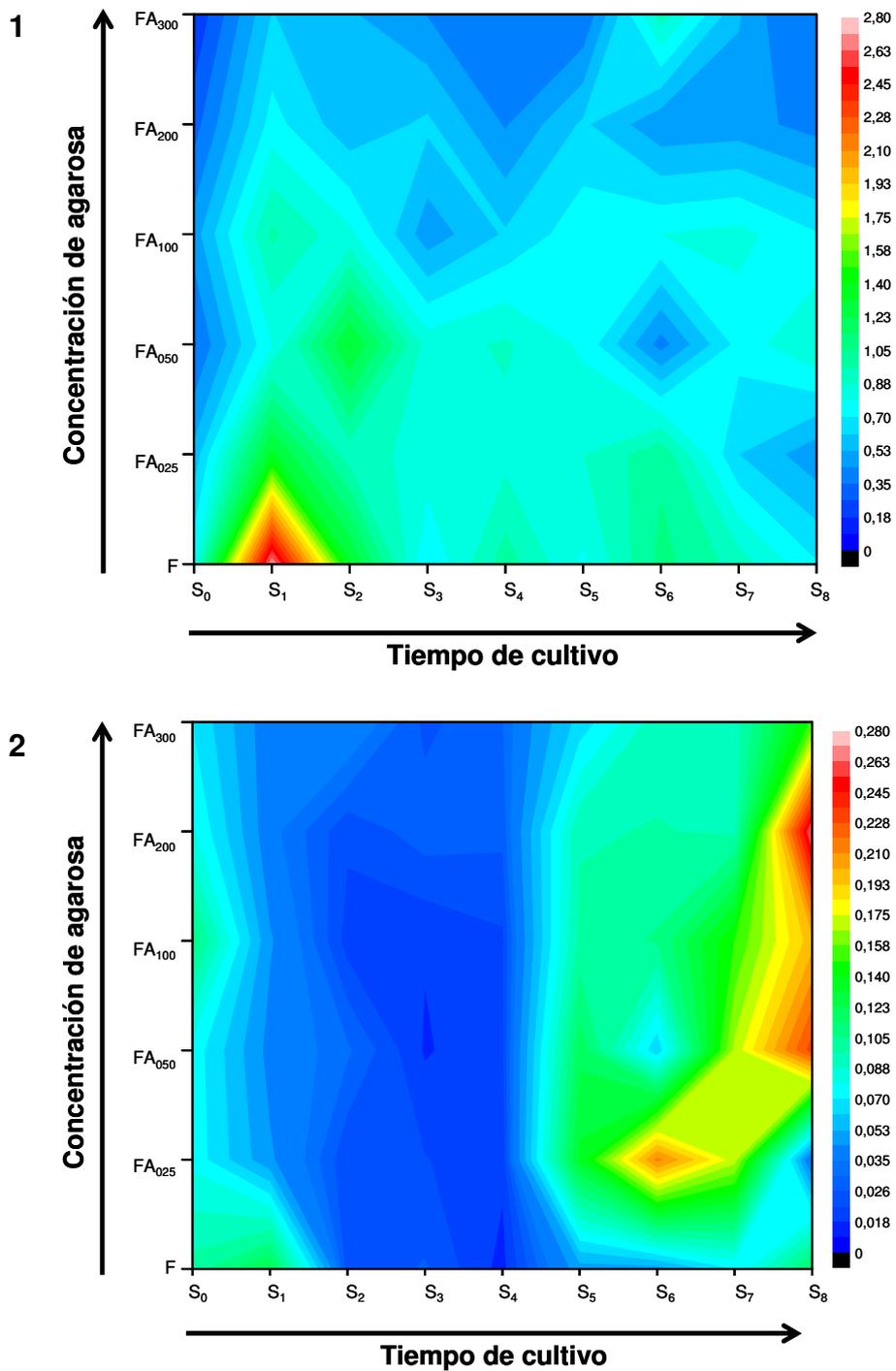
Para establecer la importancia del tiempo de cultivo y de la concentración de agarosa, la Figura 5.3. muestra el mapa de color para el coeficiente de albedo de transporte. Como se observa, la mayor influencia de *scattering* se produce entre las semanas 1 a 5 con especial relevancia para los de menor concentración de agarosa (F, FA<sub>025</sub>, FA<sub>050</sub>, FA<sub>100</sub>), lo cual corrobora los valores de la transmitancia anteriormente citados.



**Figura 5.3.** Mapa de áreas de color correspondiente a los albedos de transporte obtenidos para todos los modelos de estroma corneal humano artificial estudiados.

Este resultado, junto con el obtenido para la transmitancia, sugiere que los tejidos generados mediante Ingeniería Tisular a base de Fibrina-Agarosa en concentraciones de 0,1% y 0,2% y tras 3-4 semanas de desarrollo en cultivo podrían, en una primera aproximación, ser comparables con los de la córnea humana nativa, en la que predomina el *scattering*.

Nuestro análisis demuestra que la concentración de agarosa y el tiempo de desarrollo en cultivo son factores importantes que influyen sobre los valores de los coeficientes de *scattering* y absorción de los modelos corneales aunque su influencia en el comportamiento espectral es limitada. Además, los resultados obtenidos demuestran que la concentración de Agarosa de los modelos de estroma corneal humano artificial es un factor más importante que el tiempo de cultivo sobre los valores del *scattering* (Figura 5.4.-1), al contrario de lo que ocurre con los valores del coeficiente de absorción (Figura 5.4.-2). Esto es debido, posiblemente, al hecho de que en los modelos de estroma corneal con mayor concentración de Agarosa el número de las células es menor que en el resto de modelos. Esto está de acuerdo con los resultados de Mourant et al (2000) quien, utilizando un modelo numérico, relaciona la forma y el tamaño de las células con la cantidad de luz dispersada. Por tanto, el diferente número de células encontrado entre los modelos de estroma corneal humano artificial de Fibrina y Fibrina con Agarosa en diferentes concentraciones podría explicar el diferente comportamiento de estos tejidos. Destacar que la adición de Agarosa a la Fibrina podría contribuir a la mejora de las propiedades mecánicas del constructo corneal, pero esto supondría la desaceleración de la proliferación de los queratocitos estromales humanos inmersos en el constructo, lo que daría lugar a un diferente número de células para un mismo tiempo de desarrollo en cultivo en cada uno de los modelos y por tanto un menor valor del *scattering*. (Figura 4.1.-1).



*Figura 5.4. Mapa de áreas de color correspondiente a los coeficientes de scattering (1) y absorción (2) obtenidos para todos los modelos de estroma corneal humano analizados.*

### ***Sobre el comportamiento de los modelos de estroma corneal humano artificial expuestos a la radiación ultravioleta***

Debido a la disminución de la capa de ozono, la radiación ultravioleta (UV) en la atmósfera ha aumentado durante las últimas décadas (Longstreth et al., 1998). El ojo, al ser un órgano externo, está directamente expuesto a la acción de la radiación UV. La córnea, al ser la capa más externa del ojo, es la mayor responsable de la absorción de la radiación UV y de la protección de los tejidos internos del ojo contra daños oxidativos. En términos de la absorción, el epitelio corneal actúa como un filtro UV, principalmente debido a su contenido en ascorbato (Ringvold, 1997; Ringvold, 1998). Podskochy (2004) mostró previamente que el epitelio corneal sirve para proteger estructuras corneales más profundas frente a daños producidos por la radiación UV, probablemente mediante la absorción de una cantidad sustancial de la energía de la radiación UV aplicada al ojo. Esto es particularmente importante sobre todo en la técnica de cirugía refractiva de queratotomía fotorrefractiva (PRK), donde el epitelio, la capa de Bowman y parte del estroma anterior son seccionados por el láser excimer, el cual ha llegado a ser un procedimiento rutinario en la práctica oftalmológica. Después de la PRK, el resto del estroma corneal se deja sin protección contra la radiación UV, al menos temporalmente, hasta que se cure el epitelio (Kolozsvari et al., 2002). También se mostró que el epitelio y la membrana de Bowman tienen coeficientes de absorción significativamente más altos que el estroma en el espectro UV menor de 300nm. Sin embargo, de acuerdo a los cálculos de Kolozsvari et al.(2002), el estroma tiene absorancias mayores en este rango de UV, debido principalmente a su espesor, el cual es aproximadamente 10 veces mayor que el resto de las otras capas.

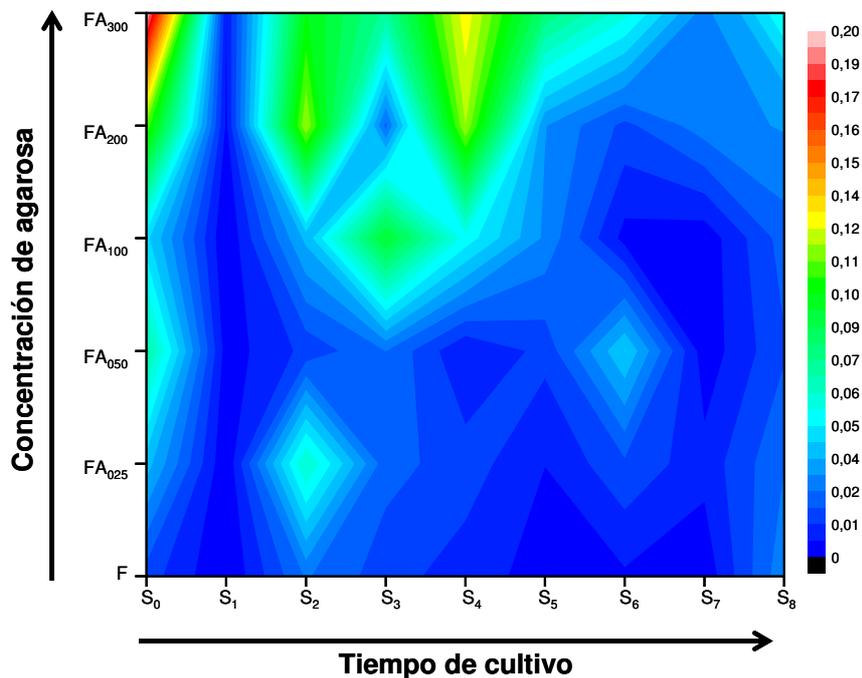
Kolozsvari et al, encontraron que el estroma era el responsable de aproximadamente el 70%-75% de la absorción del UV de la córnea. La exposición de la córnea a la irradiación UV induce cambios patológicos en su estructura (Bergmanson, 1990; Doughty and Cullen, 1989). Exposiciones prolongadas a esta radiación producen la formación de foto-oftalmítis, donde la exposición crónica y

repetida produce queratopatías que afectan al epitelio y a la parte anterior del estroma corneal. Además de estos cambios patológicos, la radiación UV puede afectar a todas las capas de la córnea produciendo patologías que podrían conducir a la ceguera.

El grado de daño provocado por una exposición prolongada a la radiación UV depende de varios factores, como son el espectro de la radiación UV aplicada y la duración de la exposición (Suh et al, 2008; Cullen, 2002; Pitts, 1970). Existen sólo un número limitado de estudios concernientes a la absorción de la radiación UV en las diferentes capas de la córnea. Algunos estudios (Kinsey, 1948; Sherashov, 1970) han encontrado que longitudes de onda por debajo de los 290nm son completamente absorbidas por el epitelio y no penetran más profundamente en las estructuras subyacentes de los ojos. En contraste, se conoce que el rango del UV medio (300-320nm) es absorbido por el estroma corneal y el cristalino. Sin embargo, otro estudio (Schive et al., 1984) ha mostrado que no existen diferencias en la absorción del UV entre el epitelio y el estroma. Recientemente, Kolozsvari et al. (2002) mostraron que la absorción del UV-B (280-320nm) es 1,8 veces mayor en las 100µm anteriores de la córnea humana que en las capas posteriores y que el epitelio y la membrana de Bowman tienen un coeficiente de absorción significativamente mayor al estroma en el espectro del ultravioleta menor que 310nm.

En la presente Tesis Doctoral, los resultados obtenidos muestran, principalmente, la influencia del nivel de agarosa en la transmitancia de la radiación UV en los modelos de estroma corneal humano artificial. No obstante, aunque los constructos generados con un alto porcentaje de agarosa pueden llegar a presentar valores de transmitancia próximos al 20% en el UV, especialmente en la primera y cuarta semana de cultivo, en la mayoría de los casos la transmitancia toma valores inferiores al 10% para estos tejidos. Además, para concentraciones inferiores al 0,1% de agarosa, todos los valores de transmitancia son inferiores al 10%, con independencia del tiempo de cultivo (Figura 5.5.). Resultados previos (Kolozsvari et al., 2002) sobre la medida de la transmitancia de la radiación UV para los diferentes

tejidos corneales muestran que la córnea nativa presenta valores entre 1% y 10% (para 280-400nm), orden de magnitud similar al encontrado para los constructos de estroma corneal humano artificial. Este resultado es de gran interés, ya que los constructos diseñados se corresponden a la capa estromal, la cual es aproximadamente 20-40 veces mayor que la capa de Bowman.



**Figura 5.5.** Mapa de áreas de color correspondiente a la transmitancia en UV obtenida para todos los modelos de estroma corneal humano.

Como hemos mencionado anteriormente, existen en la literatura trabajos (Kolozsvari et al., 2002) que determinan la absorbanza de la radiación UV-A (330-400nm), UV-B (280-330nm) y UV-C (240-280nm) de las diferentes capas corneales, encontrando que las capas anteriores son particularmente importantes en la prevención del daño producido por la radiación UV-B.

Para conocer si los modelos de estroma corneal humano artificial presentan las mismas características que una córnea nativa en cuanto a la absorbanza para la radiación ultravioleta y, por tanto, para evaluar su adecuación clínica, hemos

determinado la absorbancia de algunos de los tejidos analizados, en concreto para los modelos corneales de Fibrina (F), Fibrina-Agarosa al 0,1% (FA<sub>100</sub>) y Fibrina-Agarosa al 0,2% (FA<sub>200</sub>) a la cuarta semana de desarrollo en cultivo, siguiendo la metodología empleada por Koloszvari et al. (2002). En concreto, la dependencia con la longitud de onda de la intensidad de la radiación incidente y transmitida para los modelos de estroma corneal fue medida utilizando un espectrofotómetro OSM-400 UV/VIS evitando el *scattering* de la radiación mediante la colocación del detector muy próximo al tejido corneal (Freegard, 1997). La absorbancia (A) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

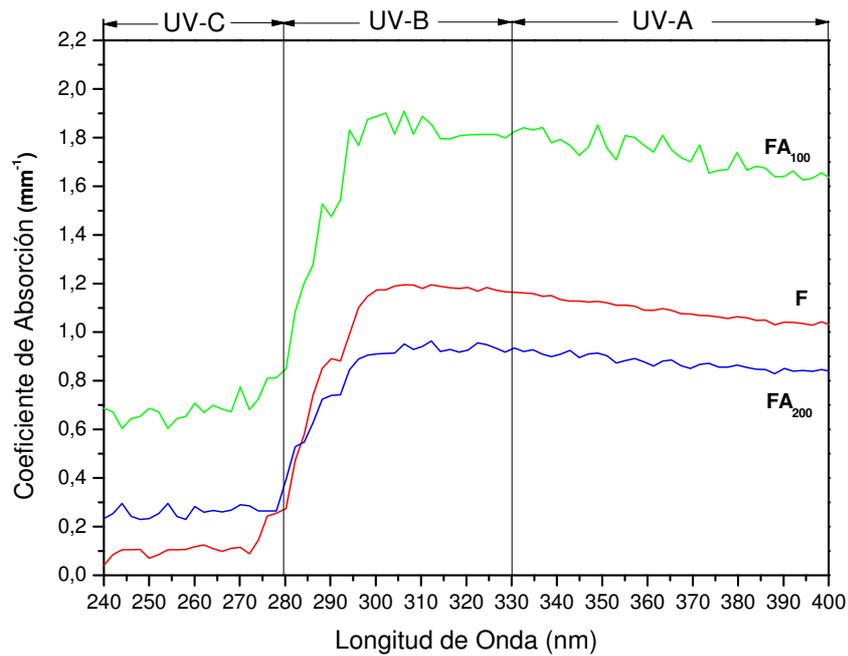
$$I = I_0 10^{-A} \Rightarrow A = \lg \frac{I_0}{I}$$

donde  $\lg(I_0 / I)$  corresponde al logaritmo de la intensidad de la radiación incidente dividida por la intensidad de la radiación transmitida. Como la absorbancia no es una característica constante del material, calculamos también el coeficiente de absorción ( $\mu_a$ ) de cada modelo analizado mediante la relación:

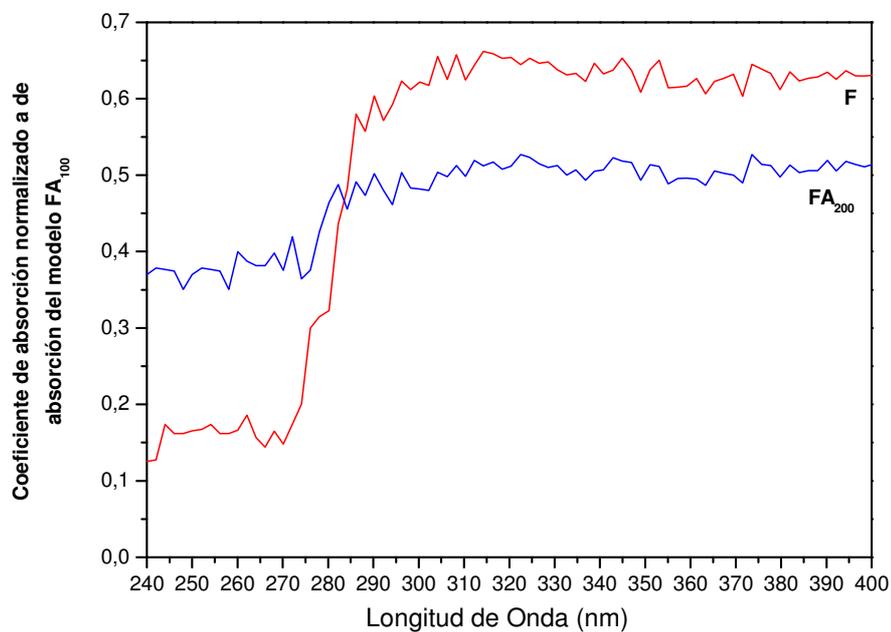
$$I = I_0 10^{-A} = I_0 \exp(-\mu_a d) \Rightarrow \mu_a = \frac{A}{d \lg e}$$

donde  $d$  es el espesor del modelo de estroma corneal.

La Figura 5.6. muestra el coeficiente de absorción de los modelos de estroma corneal humano artificial como una función de longitud de onda en el rango 240-400nm. Los rangos de longitudes de onda UV-A, -B y -C son también indicados. Se observa que el coeficiente de absorción del modelo de FA<sub>100</sub> es mayor que el de F, que a su vez es mayor que el coeficiente de absorción de FA<sub>200</sub>. El comportamiento espectral del coeficiente de absorción es similar para los tres modelos de estroma corneal en el rango de longitudes de onda UV-C, aumentando con la longitud de onda hasta 300nm y decreciendo ligeramente para longitudes de onda mayores.



**Figura 5.6.** Coeficiente de absorción en el UV para los constructos F, FA<sub>100</sub> y FA<sub>200</sub>.



**Figura 5.7.** Coeficiente de absorción en el UV normalizado al modelo FA<sub>100</sub> para los constructos F y FA<sub>200</sub>.

A partir de los resultados de la Figura 5.6. calculamos los coeficientes de absorción de F y  $FA_{200}$  normalizados al coeficiente de absorción de  $FA_{100}$  (Figura 5.7,) ya que en trabajos previos se ha considerado este último como una referencia (Alaminos et al., 2006; González-Andrades et al., 2009). Los resultados muestran que el coeficiente de absorción en el UV para el modelo de  $FA_{200}$  es aproximadamente la mitad que el de  $FA_{100}$ . En cambio, llama la atención que el comportamiento del modelo de Fibrina difiere dependiendo del rango del espectro. Así, entre 240-280nm las diferencias son notables (del orden de 15%) y para longitudes de onda entre 280-400nm estas diferencias son menores que para el modelo de  $FA_{200}$  (aproximadamente 60%). El bajo valor encontrado para longitudes de onda inferiores a 280nm para la F respecto a los modelos de FA podría demostrar que los modelos de Fibrina-Agarosa son más eficientes que los de Fibrina para filtrar la radiación UV-C.

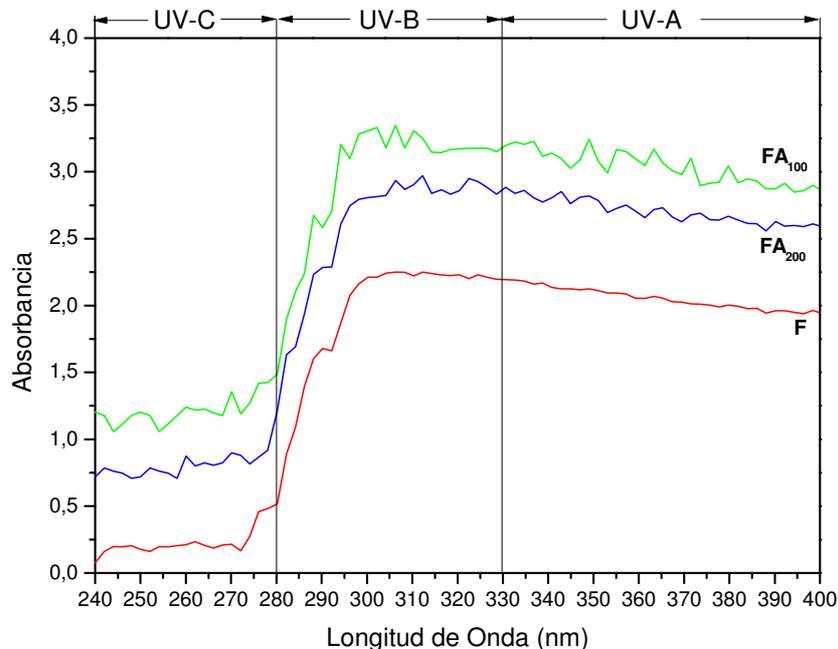
De acuerdo con nuestros resultados, la distribución espectral de la absorbancia es similar a la de los coeficientes de absorción, pero el orden de los valores de la absorbancia en los rangos UV-A y UV-B para el modelo de  $FA_{200}$  cambia con respecto al orden de los valores de los coeficientes de absorción del mismo (Figura 5.8), debido a las pequeñas diferencias de espesor entre los modelos.

Para los tres modelos de estroma corneal humano artificial analizados, el rango de valores de la absorbancia (Figura 5.8.) es similar al del estroma corneal humano (Kolozsvari et al., 2002), sugiriendo que estos tejidos artificiales podrían tener utilidad clínica y una capacidad de absorción de la radiación ultravioleta adecuada.

Destacar que el modelo  $FA_{100}$  tuvo la mayor absorbancia de la radiación UV de los tres modelos de estroma corneal humano artificial estudiados, lo que apoyaría, en una primera aproximación, el uso de  $FA_{100}$  para la generación de córneas artificiales mediante Ingeniería Tisular. La mayor absorbancia se encontró en los rangos UV-B y UV-A, especialmente en el UV-B. Estos resultados sugieren que nuestros modelos de estroma corneal humano artificial podrían ser particularmente eficaces en la prevención de daños producidos por esta radiación, que es considerada la más dañina para el ojo humano. Estudios anteriores (Kolozsvari et al., 2002) muestran que la

mayoría de la radiación UV-C que alcanza de la córnea está filtrada por las capas más externas de la córnea, el epitelio y la membrana Bowman que tienen el más alto coeficiente de absorción para UV-C. Por esta razón, la generación de sustitutos artificiales de córnea de espesor completo mediante la Ingeniería Tisular tendría probablemente eficiencia de filtrado de la radiación UV-A, UV-B y UV-C. Basándonos en todos estos datos, podríamos argumentar que el modelo de estroma corneal FA<sub>100</sub> tiene las mejores propiedades de filtrado de la radiación ultravioleta.

Estudios previos (Alaminos et al., 2006; González-Andrades et al., 2009) han demostrado que el modelo de estroma corneal artificial de Fibrina-Agarosa cumple la mayoría de los requisitos para la construcción de una córnea artificial mediante Ingeniería Tisular, especialmente los relacionados con el desarrollo y la diferenciación de las células corneales en el constructo. Sin embargo, para que estas córneas artificiales sean potencialmente útiles desde un punto de vista clínico, los niveles de biocompatibilidad, permeabilidad al oxígeno y proteínas, elasticidad y el resto de características que definen la córnea humana nativa deberán ser determinados para estos tejidos artificiales.



**Figura 5.8.** Absorbancia en el rango del UV para los constructos F, FA<sub>100</sub> y FA<sub>200</sub>.

### ***Sobre el índice de refracción y la calidad de imagen retiniana***

Es bien conocido que el *scattering* de la luz en un tejido biológico depende de los índices de refracción de las componentes internas de los mismos. Para conocer el comportamiento de la luz, que incluye el transporte y la interacción con el tejido, es necesario conocer con exactitud el índice de refracción del tejido y de sus componentes. Con este objetivo varios trabajos han sido desarrollados para medir adecuadamente  $n$  en estos medios (Bolin et al., 1989; Tearney et al., 1995; Muller et al., 1981; Jin et al., 2006; Sardar et al., 2004; Sardar et al., 2005)

En concreto, todas las teorías que explican la transparencia corneal se centran en la propagación de la luz en la matriz extracelular estromal. Benedek (1971) propone que la luz difundida aparece debido a las fluctuaciones del índice de refracción, las cuales deben ser mayores que la semilongitud de onda de la luz en el medio. Las fluctuaciones del índice de refracción pueden ser producidas por alteraciones microestructurales, organización irregular de la matriz extracelular o por las propias células del tejido. Muchos estudios (Mourant et al., 2000; Farrell y McCally, 2000; Fregard, 1997) han tratado de relacionar la forma, densidad y tamaño de las células con el patrón de la luz dispersada. Mourant et al. (2000) sugiere que las propias células serían responsables del *scattering* en ángulos pequeños, los núcleos lo serían en ángulos medianos y, por último, las pequeñas organelas como mitocondrias y lisosomas, las responsables del *scattering* en ángulos grandes.

Un estudio reciente (Patel et al., 2004) para un grupo de sujetos de edad entre 19 y 65 años a los que se le ha practicado una cirugía LASIK muestran que el índice de refracción de la superficie anterior del estroma corneal humano *ex vivo* presenta un rango de valores entre 1,372 y 1,381.

Los modelos de estroma corneal humano artificial presentan, en general, para la primera y segunda semana de cultivo, valores de  $n$  inferiores a los encontrados por estos autores. Sin embargo, a partir de la tercera semana, los valores se encuentran,

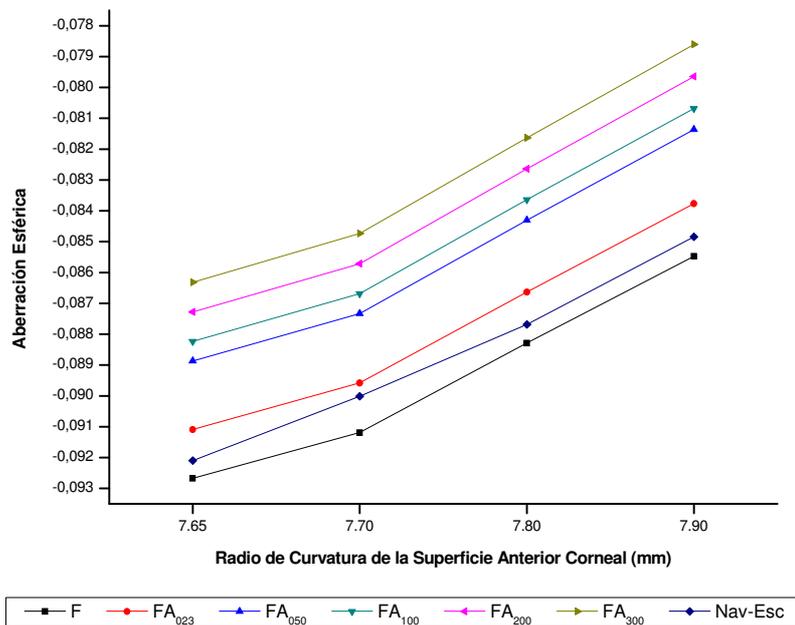
en la mayoría de los casos en este rango. El índice de refracción aumenta hasta la tercera semana de cultivo y para cada una de las concentraciones de agarosa. A partir de la tercera semana, se produce un decrecimiento, excepto para FA<sub>200</sub> y FA<sub>300</sub> donde la disminución se produce a partir de la cuarta semana. Si comparamos los valores obtenidos para el índice de refracción realizando una sencilla interpolación para 550nm, observamos que todos los constructos presentan, para la primera y segunda semana, un valor del  $n$  inferior al del estroma corneal *ex vivo* y, a partir de la tercera semana, los valores son cercanos en la mayoría de los casos a los establecidos por Patel. Probablemente este hecho se debe al escaso número de células existente en los modelos de estroma corneal humano artificial en las primeras semanas de cultivo, alcanzándose un número significativo de células a partir de la tercera semana. Curiosamente, los datos del índice de refracción muestran un aumento desde las semanas S<sub>1</sub> a S<sub>3</sub> y una disminución progresiva desde S<sub>4</sub> hasta S<sub>8</sub>, lo cual coincide con la distribución del área celular de nuestros modelos de estroma corneal humano artificial que se muestran en la Figura 4.1-2.

El índice de refracción de los medios biológicos es un parámetro fundamental para las aplicaciones ópticas. En concreto, para el caso de los modelos de estroma corneal humano artificial, nos planteamos, de acuerdo a los objetivos de esta Tesis Doctoral, estimar la calidad de la imagen retiniana de un sujeto tras el posible trasplante de estos tejidos. Para ello, se han estimado las aberraciones oculares que se producirían tras el implante de estos tejidos después de 4 semanas de desarrollo en cultivo. Esta estimación fue realizada mediante el software OSLO LT, el cual permite la estimación y visualización de las aberraciones de un sistema óptico diseñado previamente.

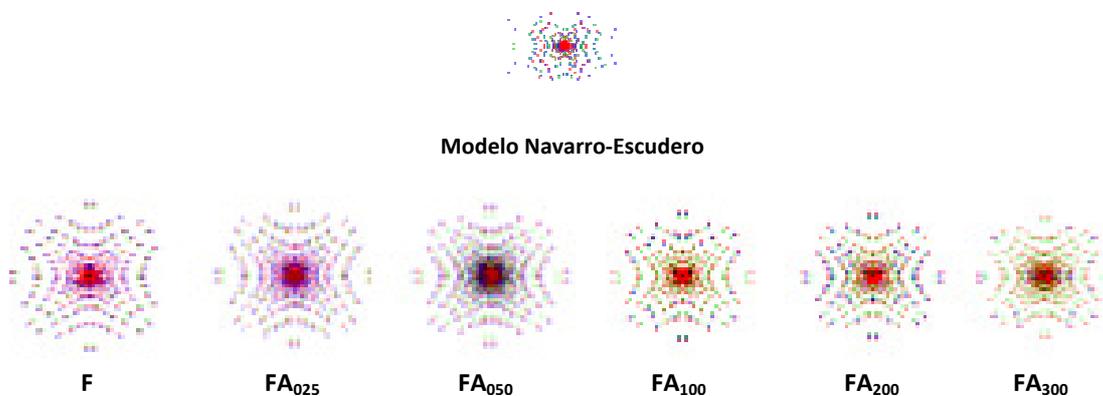
En nuestro estudio, el sistema óptico empleado para simular el ojo, es el modelo esquemático de Navarro-Escudero (Escudero-Sanz y Navarro, 1999) donde el índice de refracción de la superficie anterior de la córnea es el correspondiente a los diferentes modelos de estroma corneal humano artificial desarrollados durante 4 semanas de cultivo. Otro estudio de interés es la evaluación del efecto que ligeras

modificaciones en el radio de la superficie anterior de la córnea producirían sobre las aberraciones oculares.

Nuestros resultados muestran que el valor de la aberración esférica (AE) disminuye ligeramente a medida que aumenta la concentración de agarosa en el modelo corneal y el radio de la superficie anterior de la córnea. Cabe destacar que los modelos de F y  $F_{0.25}$  son los que presentan valores de la aberración similares a los correspondientes al modelo de Navarro-Escudero del ojo humano (Figuras 5.9-5.10).

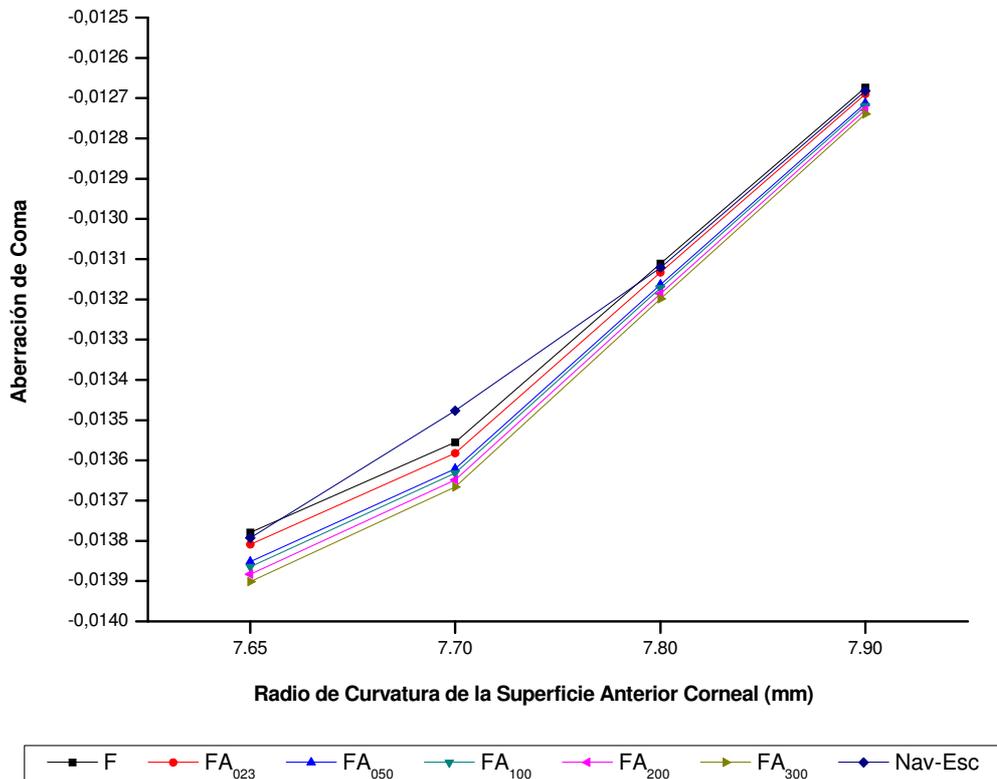


**Figura 5.9.** Variación de la aberración esférica para las distintas muestras, según el radio de curvatura.

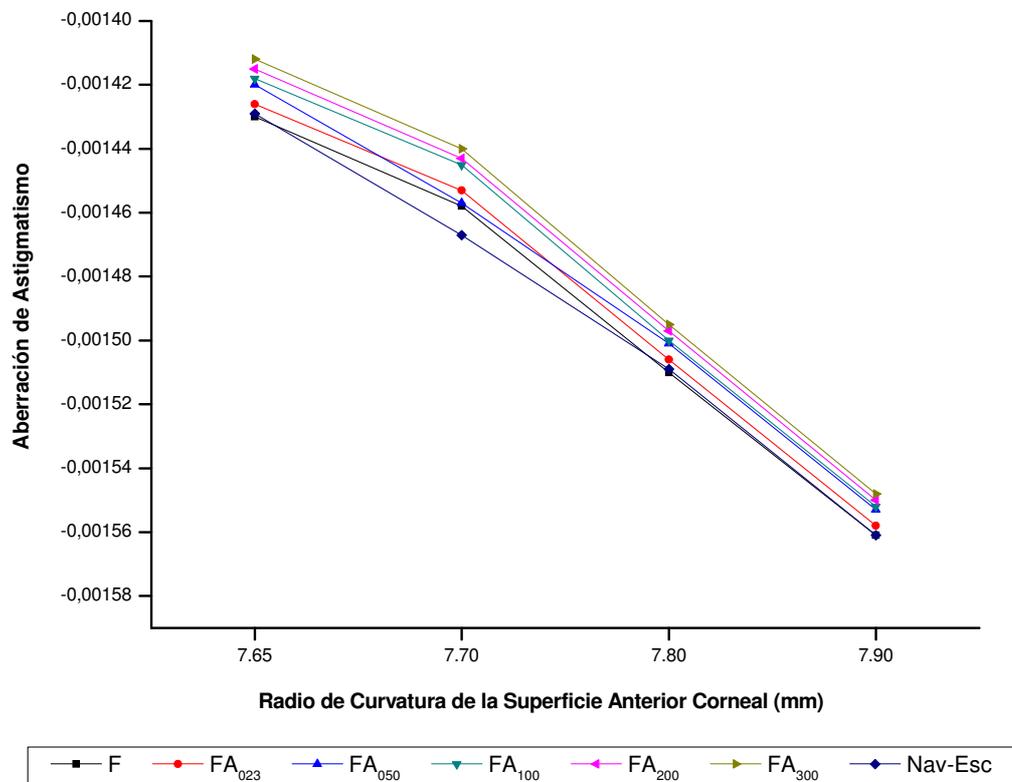


**Figura 5.10.** Variación de los "spots" en el eje óptico para un radio de 7,6mm5 para cada uno de los modelos (llamamos "spots" a la imagen de un punto que se formaría en la retina considerando el radio de curvatura y el índice de refracción utilizados).

Las aberraciones de coma y astigmatismo no están influenciadas por la concentración de agarosa de los modelos de estroma corneal humano artificial y sus valores son próximos al modelo esquemático que representa el ojo humano. Señalar que a medida que el radio de la superficie anterior de la córnea aumenta, la aberración en coma aumenta, al contrario de lo que ocurre con el astigmatismo (Figuras 5.11 y 5.12).



**Figura 5.11:** Variación de la aberración de coma según los radios de curvatura para las distintas muestras en estudio.



**Figura 5.12.** Variación del astigmatismo para cada una de las muestras según el radio de curvatura.

En resumen, los resultados obtenidos parecen indicar que no existe una importante influencia de la concentración de agarosa sobre las aberraciones oculares y por tanto sobre la calidad de la imagen retiniana lo que implica que, desde el punto de vista de la calidad de imagen, cualquiera de los constructos, al tiempo de cultivo estudiado, podría ser útil para el uso clínico.

# Capítulo 6

## Conclusiones



**A continuación, se exponen las conclusiones principales derivadas del presente trabajo de investigación.**

1. La aplicación de los métodos y técnicas descritos en esta Tesis Doctoral permitió aislar eficientemente los queratocitos de la córnea humana, los cuales se utilizaron para la generación de cultivos primarios de estas células estromales. Posteriormente, los queratocitos mantenidos en cultivo se cocultivaron tridimensionalmente con biomateriales biológicos de Fibrina y Agarosa a diferentes concentraciones para elaborar un modelo de estroma corneal artificial con queratocitos humanos en su interior y concentraciones crecientes de Agarosa en la matriz extracelular de Fibrina humana.

2. La evaluación histológica del modelo de estroma corneal humano artificial elaborado en esta Tesis Doctoral reveló un adecuado desarrollo de la matriz extracelular de Fibrina-Agarosa y un crecimiento progresivo de las células inmersas en su interior, lo cual sugiere que la estructura histológica de estos sustitutos tisulares era análoga a la del estroma corneal humano nativo. El análisis temporal mostró un crecimiento exponencial de los queratocitos en el estroma corneal humano artificial a partir de la primera semana y hasta la octava semana de desarrollo, llegando a existir entre 400 y 700 células por  $\text{mm}^2$  de matriz extracelular en la octava semana de cultivo, dependiendo del modelo evaluado. El volumen medio de cada célula se incrementó progresivamente hasta la cuarta semana de desarrollo, disminuyendo progresivamente a partir de ese momento debido al elevado número de células existente en el estroma corneal humano artificial.
  
3. La evaluación y caracterización óptica de los modelos de estroma corneal humano artificial generados mediante Ingeniería Tisular, permite afirmar que el *scattering* es el fenómeno físico más importante que afecta la propagación de la luz a través de ellos, de forma análoga a lo que ocurre en tejidos corneales nativos. Por otra parte, los valores del albedo de transporte encontrados indican mayor relevancia de la absorción para las longitudes de onda cortas como sugieren estudios que evalúan la absorción del estroma corneal humano. De forma general, existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los coeficientes de *scattering* y absorción de los modelos estromales que muestran la influencia del nivel de concentración de Agarosa y el tiempo de desarrollo en cultivo sobre estos coeficientes. Altos niveles de Agarosa implican un menor *scattering* debido al menor nivel de celularidad, mientras tiempos de cultivo intermedios (3-5 semanas) implican una menor absorción.

4. El comportamiento espectral de la transmitancia de los sustitutos biogenerados analizados, en el rango del visible, no es dependiente ni del nivel de Agarosa ni del tiempo de desarrollo en cultivo ( $VAF > 96\%$ ), excepto en su etapa inicial, siendo similar al de la córnea nativa, es decir, existe un aumento progresivo en los valores de la transmitancia con la longitud de onda. No obstante, los constructos de estroma corneal presentan un crecimiento menos acusado que los de la córnea nativa para las longitudes de onda cortas. Sin embargo, el nivel de Agarosa y el tiempo de cultivo influyen en el valor de la transmitancia, encontrando que los modelos de estroma corneal con niveles de Agarosa superiores al 0.1% y tras 3 a 5 semanas de cultivo son los que presentan los valores más cercanos a los de la córnea humana nativa, en concreto, presentan valores que se corresponden con el 90% del valor de la transmitancia corneal.
  
5. De forma global, los constructos estromales presentan un rango de valores de la absorbancia para la radiación ultravioleta similar a la de la córnea nativa. Es de destacar que, la radiación ultravioleta, especialmente la radiación UV-B, considerada la más dañina para el ojo humano, es fuertemente absorbida por los constructos estromales de Fibrina con 0,1% concentración de Agarosa, lo que sugiere la posible utilidad clínica y una eficiente capacidad de filtrado de esta radiación para estos tejidos.
  
6. A partir de la tercera semana de desarrollo, los modelos de estroma corneal humano artificial presentan un valor del índice de refracción similar al de una córnea ex vivo. La estimación de las aberraciones oculares, a partir de los valores de los índices de refracción de estos constructos muestra, dentro de las limitaciones de este estudio, que la calidad de la imagen retiniana, ante la posibilidad de un trasplante de estos tejidos, no se vería afectada. Además, el nivel de Agarosa no parece ser un factor relevante.

7. En base a las características histológicas y ópticas anteriormente descritas y analizadas podemos concluir que los modelos de estroma corneal humano artificial de Fibrina-Agarosa con una concentración de 0,1% ó 0,2% y tras 3 a 5 semanas de desarrollo en cultivo podrían ser empleados como base para generación de una córnea humana artificial de espesor completo. Además, estos modelos serían los más indicados para la construcción de un implante parcial en los tratamientos de queratoplastias lamelar y podría representar equivalentes corneales de origen animal o humano para la experimentación con diferentes fármacos sin la necesidad de utilizar animales vivos o córneas humanas aptas para trasplante.

# Capítulo 7

## **Bibliografía**



1. **Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Muñoz-Ávila JI, Serrano D, Medialdea S, Carreras I, Campos A.** Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarose scaffold. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 2006; 47: 3311-3317.
2. **Ameen DB, Bishop MF, McMullen T.** A lattice model for computing the transmissivity of the cornea and sclera. *Biophys J.* 1998; 75: 2520–2531.
3. **Arnfield MR, Tulip J, McPhee MS.** Optical Propagation in tissue with anisotropic scattering. *Trans Biomed Eng.* 1988; 35: 372-381.
4. **Atala A.** Tissue engineering of artificial organs. *J. Endourol.* 2000; 14: 49-50.
5. **Aufderheide AC and Athanasiou KA.** Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus. *Tissue Eng.* 2005; 11:1095.
6. **Auger FA, López Valle CA, Guignard R et al.** Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cell Dev.* 1995; 31(6): 432-439.
7. **Bell E.** Deterministic models of tissue engineering. *J.Cell Eng.* 1995; 1: 28-34.
8. **Benedek GB.** Theory and transparency of the eye. *Appl Opt.* 1971; 10: 459–473.
9. **Bergmason JG.** Corneal damage in photokeratitis: why is it so painful?. *Optom Vis Sci.* 1990;67:407-413
10. **Berny F and Slansky S.** Wavefront determination resulting from Foucault test as applied to the human eye and visual instruments in optical instruments and techniques. *J.H. Dickenson. Ed. Oriel, Newcastle, UK.* 1969. 375-386.
11. **Berny F, Slansky S, Dickon JH.** Optical Instruments and Techniques. *Oriel Press,* London. 1969.
12. **Boulnois JL.** Photophysical processes in recent medical laser developments: a review. *Lasers Med. Sci.*1986; 1: 47-66.
13. **Brinkworth BJ.** Interpretation of the Kubelka-Munk coefficients in reflection theory. *Appl Opt* 1972; 11: 1434-1435.

14. **Castoro JA, Bettelheim AA and Bettelheim FA.** Water concentration gradients across bovine cornea. *Invest Ophthalmol Visual Sci.* 1998; 29:963.
15. **Chen J, Li Q, Xu J, Huang Y, Ding Y, Deng H, et al.** Study on biocompatibility of complexes of collagen–chitosan–sodium hyaluronate and cornea. *Artificial Organs.* 2005; 29: 104.
16. **Cheong W, Prah SA, Welch AJ.** A review of the optical properties of Biological Tissues, *J Quant Elec.* 1990; 26: 2166-2185.
17. **Chirila TV.** Modern artificial corneas; the use of porous polymers. *Trens Polym Sci.* 1994; 2: 296-300.
18. **Doillon CJ, Watsky MA, Hakim M, et al.** A collagen-based scaffold for a tissue engineered human cornea: physical and physiological properties. *Int J Artif Organs.* 2003; 26(8):762-773.
19. **Doughty MJ, Cullen AP.** Long-term effects of a single dose of ultraviolet-B on albino rabbit cornea-I. in vivo analyses. *Photochem Photobiol.* 1989; 49:185-196.
20. **Duan X, Klenker BJ, Sheardown H.** Progress in the development of a corneal replacement: keratoprotheses and tissue engineered corneas. *Expert Rev Med Devices.* 2006; 3(1):59-72.
21. **Duan X, Sheardown H.** Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: Mechanical properties and corneal epithelial cell interactions. *Biomaterials.* 2006; 27(26):4608-4617.
22. **Duan X, Sheardown H.** Incorporation of cell-adhesion peptides into collagen scaffolds promotes corneal epithelial stratification. *J Biomater Sci Polym.* Ed 2007; 18(6): 701-711.
23. **Escudero-Sanz I and Navarro R.** Off axis aberrations of a wide-angle schematic eye model. *J Opt Soc Am A.* 1999; 16:1881-1891.
24. **Farrell RA, McCally RL.** Corneal transparency. In: Albert DM, Jakobiec FA (eds). *Principles and Practice of Ophthalmology.* 2000, Chap. 57. 629–643.

25. **Feuk T.** On the transparency of the stroma in the mammalian cornea. *IEEE Trans Biomed Eng.* 1971; BME17: 1866–1890.
26. **Flock ST, Patterson MS, Wilson BC, Wyman DR.** Monte Carlo modeling of light propagation in highly scattering tissues I: model predictions and comparison with diffusion theory. *Trans biomed Eng.* 1989; 36: 1162-1168
27. **Flock ST, Wilson BC, Patterson MS.** Total attenuation coefficients and scattering phase functions of tissues and phantom materials at 633nm. *Med Phys.* 1987; 14: 835-841.
28. **Freegard TJ.** The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye.* 1997; 11: 465-471.
29. **Freund DE, Mc Cally RL, Farrel RA, Crisol SM, L'Hernault NL and Edelhauser HF.** Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. *Inv Ophthalmol Vis Sci.* 1995; 36: 1508.
30. **Freund DE, McCally RL, Farrell RA.** Direct summation of fields for light scattering by fibrils with applications to normal corneas. *Appl Opt.* 1986; 25: 2739–2746.
31. **Gascón MI.** Desarrollo del sistema de cohesión intercelular en el epitelio corneal humano generado por ingeniería tisular. Estudio genético e histológico. *Tesis doctoral. 2008. Universidad de Granada.*
32. **Gate LF.** Comparison of the photon diffusion model and Kubelka-Munk equation with the exact solution of the radiative transport equation. *Appl Opt.* 1974; 13: 236-238.
33. **Gemert van MJC, Welch AJ, Star WM, Motamedi M, Cheong WF.** Tissue optics for a slab geometry in the diffusion approximation. *Lasers Med Sci.* 1987; 2: 295-302.
34. **Giovanelli RG.** Reflection by semi-infinite diffusers, *Opt Acta.* 1955; 2: 153-162.
35. **Gordon RA and Donzis PB.** Refractive development of the human eye. *Arch Ophthalmol.* 1985; 103: 785-789.

36. **Gozález-Andrades M, Garzón I, Gascón MI, Muñoz-Ávila JI, Sánchez-Quevedo MC, Campos A, Alaminos M.** Sequential development of intercellular junctions in bioengineered human corneas. *J Tissue Eng Regen Med.* 2009;3(6):442-449.
37. **Griffith M, Osborne R, Munger R, et al.** Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. *Science.* 1999; 286(5447):2169-2172.
38. **Griffith, LG. Naughton, G.** Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002; 295(5557): 1009-1014.
39. **Hart RW, Farrell RA.** Light scattering in the cornea. *J Opt Soc Am.* 1969; 59: 766–774.
40. **Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, et al.** Transplantation of tissue-engineered epithelial cell sheets after excimer laser photoablation reduces postoperative corneal haze. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47 (2): 552-557.
41. **Ibusuki S, Halbesma GJ, Randolhp MA, et al.** Photochemically cross-linked collagen gels as three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007; 13(8):1995-2001.
42. **Jacques SL.** Diffuse reflectance from a semi-infinite medium. *NewsEtc, Oregon Medical Laser Center.* 1999.
43. **Jester JV, Moller-Pedersen T, Huang J, et al.** The cellular basis of corneal transparency: evidence for 'corneal crystallins'. *J Cell Sci .* 1999; 112: 613–622.
44. **Jin YL, Chen JY, Xu L, Wang NP.** Refractive index measurement for biomaterial samples by total internal reflection. *Phys Med Biol.* 2006; 51: N371-N379.
45. **Joyce NC.** Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22: 359-389.
46. **Katz M.** The human eye as an optical system. In: Tasman W, Jaeger EA, editors: Duane's clinical ophthalmology, vol 1, Philadelphia, 1989, JB Lippincott Co.

47. **Khademhosseini, A. Langer, R. Borenstein, J. et al.** Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103 (8): 2480-2487.
48. **Kinsey VE.** Spectral transmission of the eye to ultraviolet radiations. *Arch Ophthalmol*. 1948;39:508–513.
49. **Koizumi N, Nishida K, Amano S, et al.** Progress in the development of tissue engineering of the cornea in Japan. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2007; 111(7):493-503.
50. **Koizumi N, Sakamoto Y, Okumura N, et al.** Cultivated corneal endothelial cell sheet transplantation in a primate model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007; 48(10):4519-4526.
51. **Kortüm G.** *Reflectance Spectroscopy*, translated by J. E. Lohr (Springer, New York, 1969).
52. **Kubelka P, Munk F,** Ein Beitrag zur optic der farbanstriche. *Zeitschrift für Technische Physik*. 1931;12: 593-601.
53. **Kubelka P.** New Contributions to the Optics of Intensely Light-Scattering Materials. *Part I. J Opt Soc Am*. 1948; 38 (5): 448-457.
54. **Lai JY, Chen KH, Hsu WM, et al.** Bioengineered human corneal endothelium for transplantation. *Arch Ophthalmol*. 2006; 124(10):1441-1448.
55. **Langer R, Vacanti JP.** Tissue engineering. *Science*. 1993; 260 (5110): 920-926.
56. **Larsen CP, Elwood ET, Alexander DZ, Ritchie SC, Hendrix R, Tucker- Burden C, et al.** Long-term acceptance of skin and cardiac allografts by blockade of the CD40 and CD28 pathways. *Nature*. 1996; 381: 434-438.
57. **Lavker RM, Dong G, Cheng SZ, Kudoh K, Kotsarelis G and Sun TT.** Relative proliferative rates of limbal and cornea epithelia: implications of corneal epithelial migration, circadian rhythm and suprabasally located DNA-synthesizing keratinocytes. *Invest Ophthalmol Visual Sci*. 1991; 32: 1864.

58. **Lee YK.** Influence of scattering/absorption characteristics on the color of resin composites. *Dental Materials*. 2007, 23; 124-131.
59. **Leibowitz HM, Trinkaus-Randall V, Tsuk A and Franzblau C.** Progress in the development of a synthetic cornea. *Prog Retinal Eye Research* 1994; 13: 605-621.
60. **Li F, Carlsson D, Lohmann C, et al.** Cellular and nerve regeneration within a biosynthetic extracellular matrix for corneal transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(26): 15346-15351.
61. **Liu W, Merrett K, Griffith M, et al.** Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials*. 2008; 29(9): 1147-1158.
62. **Liu Y, Gan L, Carlsson DJ, et al.** A simple cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006; 47(5):1869-1875.
63. **Llames SG, del Río M, Larcher F, et al.** Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*. 2004; 77(3): 350-355.
64. **Marijnissen JPA, Star WM.** Phantom measurements for light dosimetry using isotropic and small aperture detectors: Porphyrin localization and treatment of Tumors. *Prog Clin Biol Res*. 1984;170:133-48.
65. **Maurice DM.** The structure and transparency of the cornea. *J Physiol*. 1957; 136: 263.
66. **McLaughlin BJ, Caldwell RB, Sasaki Y and Wood TO.** Freeze fracture quantitative comparison of rabbit corneal epithelial and endothelial membranes. *Curr Eye Res*. 1985; 4: 951.
67. **Meana A, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al.** Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*. 1998; 24: 621.
68. **Mie G.** Beitrage zur optic truber medien speziell kollodialer matallosungen, *Ann Phys*. 1908; 25: 377-445.

69. **Minami Y, Sugihara H, and Oono S.** Reconstruction of cornea in three dimensional collagen gel matrix culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1993; 34: 2316.
70. **Miyashita H, Shimmura S, Kobayashi H, et al.** Collagen-immobilized poly(vinyl alcohol) as an artificial cornea scaffold that supports a stratified corneal epithelium. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006; 76(1):56-63.
71. **Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B and Krepler R.** The catalog of human cytoqueratins, patterns of expression in normal ephitelia, tumors and culture cells. *Cell.* 1982; 31: 11-24.
72. **Moller-Pedersen T, Ehlers N.** A three-dimensional study of the human corneal keratocyte density. *Curr Eye Res.* 1995; 14: 459–464.
73. **Moreno-Barriuso E, Marcos S, Navarro R; et al.** Comparing Laser Ray Tracing, the Spatially Resolved Refractometer, and the Hartmann-Shack Sensor to Measure the Ocular Wave Aberration. *Optom Vis Sci.* 2001; 78: 152-156.
74. **Muñoz-Ávila JI.** Utilidad de la Ingeniería tisular en el tratamiento de enfermedades corneales. *Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 2006.*
75. **Naughton G.** Skin: The first tissue engineered products-The Advanced Tissue Sciences story. *Sci. Am.* 1999; 280 (4): 84-85.
76. **Nerem RM and Sambanis A.** Tissue engineering: From biology to biological substitutes. *Tissue Eng.* 1995; 1: 3-13.
77. **Newsome DA, Foidart JM, Hasell JR, et al.** Detection of specific collagen types in normal and keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981; 20: 738-750.
78. **Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, et al.** Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosa epithelium. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1187-96.
79. **Nishida, K.** Tissue engineering of the cornea. *Cornea.* 2003; 22, S28.

80. **Nishida, K., Yamato M., Hayashida, Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al.** Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation*. 2004; 77: 379.
81. **Orwin EJ and Hubel A.** In vitro culture characteristics of corneal epithelial endothelial, and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng*. 2000; 6: 307.
82. **Parenteau N.** Skin: The first tissue engineered products-The Organogenesis history. *Sci. Am*. 1999; 280 (4): 83-84.
83. **Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W.** Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001; 42: 333–339.
84. **Pfister RR.** The normal surface of corneal epithelium: a scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol*. 1973; 12: 654.
85. **Porter RA, Brown RA, Eastwood M, Occeleston NL and Khaw PT.** Ultrastructural changes during contraction of collagen lattices by ocular fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 1998; 6: 157.
86. **Prahl SA, Gemert van MJC, Welch AJ.** Determining the optical properties of turbid media using the adding-doubling method. *Appl Opt*. 1993; 32: 559-568.
87. **Prahl SA.** Light transport in tissue. PhD Thesis, *University of Texas at Austin*, Austin. 1988
88. **Rayleigh L.** On the light from the sky, its polarization and colour, *Philos Mag*. 1871; 41: 107-120.
89. **Reichl S, and Muller-Goymann CC.** The use of a porcine organotypic cornea construct for permeation studies from formulations containing befunolol hydrochloride. *Int J Pharm*. 2003; 250: 191.

90. **Reichl S, Bednarz J, and Muller-Goymann CC.** Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies. *Br J Ophthalmol.* 2004; 88: 5608.
91. **Robb RM and Kuwabara T.** Corneal wound healing I. The movement of polymorphonuclear leukocytes into corneal wounds. *Arch Ophthalmol.* 1962; 68: 636-642.
92. **Sardar DK, Salinas FS, Perez JJ, Tsin ATC,** Optical characterization of bovine retinal tissues. *J Biomed Opt.* 2004; 9: 624–631.
93. **Sardar DK, Yow RM, Tsin ATC, Sardar R.** Optical scattering, absorption, and polarization of healthy and neovascularized human retinal tissues. *J Biomed Opt.* 2005; 10 (5): 051501-1-8.
94. **Saunderson JL.** Calculation of the color pigmented plastics. *J Opt Soc Am.* 1942; 32: 727.
95. **Sayers Z, Koch MHJ, Whitburn SB, Meek KM, Elliott GF, Harmsen A.** Synchrotron X-ray diffraction study of the corneal stroma. *J Mol Biol.* 1982; 160: 593–607.
96. **Schive K, Kavli G, Volden G.** Light penetration of normal and photokeratitis induced rabbit cornea. *Acta Ophthalmol.* 1984;62: 309–314.
97. **Schneider AI, Maier-Reif K and Graeve T.** Constructing an in vitro cornea from cultures of the three specific corneal cell types. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999; 35: 515.
98. **Sher S, Hull B, Rosen S, Churh D, Friedman L and Bell E.** Acceptance of allogenic fibroblast in skin equivalent transplants. *Transplantation.* 1983; 36: 552-557.
99. **Singh S.** Refractive index measurement and its applications. *Physica Scripta.* 2002; 65: 167-180.
100. **Smith JW, Frame J.** Observations on the collagen and proteopolysaccharide complex of rabbit cornea stroma. *J Cell Sci.* 1969;4(2):421–436.

101. **Solter D and Gearhart J.** Putting stem cells to work. *Science*. 1999; 283: 1468-1470.
102. **Star WM, Marijnissen JPA, Gemert van MJC.** Light dosimetry in optical phantoms and in tissues: I. Multiple flux and transport theory. *Phys Med Biol*. 1988; 33: 437-454
103. **Svaasand LO, Doiron DR, Profio AE.** Light distribution in tissue during photoradiation therapy. *USC Instit Phys imaging Sci*. 1981; USC-IPIS: 900-902
104. **Tegtmeyer, S, Papantoniou, I and Muller-Goymann CC.** Reconstruction of an in vitro cornea and its use for drug permeation studies from different formulations containing pilocarpine hydrochloride. *Eur J Pharm Biopharm*. 2001; 51: 119.
105. **Thennadil SN.** Relationship between the Kubelka-Munk scattering and radiative transfer coefficients., *J Opt Soc Am A*. 2008; 25: 1480-1485.
106. **Thibos LN.** Principles of Hartmann-Shack aberrometry. *Journal of Refractive Surgery*. 2000.
107. **Torbet J, Malbouyres M, Builles N, et al.** Orthogonal scaffold of magnetically aligned collagen lamellae for corneal stroma reconstruction. *Biomaterials*. 2007; 28(29): 4268-4276.
108. **Twersky V.** Transparency of pair-correlated, random distributions of small scatterers, with applications to the cornea. *J Opt Soc Am*. 1975; 65: 524–530.
109. **Vaezy S and Clark JI.** Quantitative analysis of the microstructure of the human cornea and sclera using 2-D Fourier methods. *J Microsc* 1994; 175: 93–99.
110. **Vargas WE and Niklasson GA.** Applicability conditions of the Kubelka-Munk theory. *Appl Opt*. 1997; 36: 5580.
111. **Vrana NE, Builles N, Kocak h, et al.** EDC/NHS cross-linked collagen foams as scaffolds for artificial corneal stroma. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2007; 18(12): 1527-1545.

112. **Waring WO, Laibson PR and Rodrigues M.** Clinical and pathologic alterations of Descemet's membrane, with emphasis on endothelial metaplasia. *Surv Ophthalmol.* 1974; 18: 325.
113. **Yoon G.** Absorption and scattering of laser light in biological media – mathematical modeling and methods for determining optical properties, *PhD Thesis, University of Texas at Austin, Austin.* 1988.
114. **Zernike F.** Integrated Optics. *Springer-Verlag* .New York. 1975.
115. **Zieske JD, Mason VS, Wasson ME, Meunier SF, Nolte CJ, Fukai N, Olsen BR, and Parenteau, NL.** Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 621.
116. **Zigman S.** Environmental near-UV radiation and cataracts. *Optom Vis Sci.* 1995;72:899-901.
117. **Zigman S.** Ocular light damage. *Photochem Photobiol.* 1993; 57: 1060-1068.



# Capítulo 8

## Producción Científica



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del *Departamento de Óptica y el Laboratorio de Óptica de Biomateriales* de la Universidad de Granada. Parte de los procedimientos y resultados expuestos en esta Memoria han sido publicados en los siguientes medios:

**a) ARTÍCULOS CIENTÍFICOS CON JCR:**

1. **UV Absorbance of a Bioengineered Corneal Stroma Substitute in the 240-400nm Range.** Ionescu AM, **Cardona JC**, González Andrades M, Alaminos M, Campos A, Hita E, Pérez MM. *Cornea*, 2010. En prensa.
2. **Generation of Bioengineered Corneas with Decellularized Xenografts and Human Keratocytes.** Gonzalez-Andrades M, **Cardona JC**, Ionescu AM, Campos A, Pérez MM, Alaminos M. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010. Aceptado con revisiones.
3. **Optical Characterization of a Fibrin and Fibrin-Agarose Corneal Stroma Substitute Generated by Tissue Engineering.** **Cardona JC**, Ionescu AM, Gómez-Sotomayor R, González-Andrades M, Campos A, Alaminos M, Pérez MM. *Experimental Eye Research*. Sometido.

**b) MEETING-ABSTRACT CON JCR:**

1. **Development of a Novel Non-Invasive Method for Evaluating the Optical Quality of the Bioengineered Corneal Construct.** **Cardona JC**, Pérez MM, Pozo AM, Rubiño AM, González-Andrades M, Campos A, Alaminos M. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009;6:S128.

2. **Optical Quality Control Of Corneas Developed by Tissue Engineering: Retinal Image Quality.** Cardona JC, Ionescu AM, González A, Muñoz-Ávila JI, Campos A, Alaminos M, Pérez MM. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009; 6: S112.
3. **Influence of Agarose Concentration on the Optical Penetration Depth in Fibrin-Agarose Constructs.** Cardona JC, Pérez MM, Ionescu AM, Díaz C; Muñoz-Ávila JI; Alaminos M, Campos A. *Tissue engineering and Regenerative Medicine*. 2009; 6: S269.
4. **Effect of the Agarose Concentration on the viscoelastic Behaviour of a Corneal Stroma Substitute Before and After Dehydration.** Gómez-Sotomayor R, Cardona JC, Durán JDG, López-López MT, Campos A, Alaminos M. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009; 6: S268.
5. **Optical Properties of Nanostructured Corneal Stroma Constructs as Determined by the Adding Doubling Method.** Cardona JC, Ionescu AM, Ghinea R, Muñoz-Ávila JI, Gonzalez-Andrades M, Alaminos M, Pérez MM. *Histology and Histopathology*. 2009; 24 Supl 1:110.
6. **Refractive Index of Fibrin-Agarose Corneal Substitutes.** Ionescu AM, Cardona JC, Pérez-Ocón F, González-Andrades M, Alaminos M, Campos A, Pérez MM. *Histology and Histopathology*. 2009; 24 Supl 1: 94-95
7. **UV Absorbance of the Corneal Stroma Constructs in the 240 to 400 nm Range.** Ionescu AM, Cardona JC, Ghinea R, González-Andrades M, Alaminos M, Pérez MM. *Histology and Histopathology*. 2009; 24 Supl 1:109.
8. **Influence of Thickness on the Transmittance in Fibrin-Agarose Corneal Constructs.** Gómez-Sotomayor R, Alaminos M, Pérez MM, Ionescu AM, Cardona JC, Campos A. *Tissue Engineering*. 2008; 14: 869.
9. **Optical Characterization of Fibrin and Fibrin Agarose Corneal Construct: The Coefficients of Absorption, Scattering and Extinction.** Gómez-Sotomayor R, Pérez MM, Muñoz-Ávila JI, Alaminos M, Ionescu AM, Cardona JC, Campos A. *Tissue Engineering*. 2008; 14: 891-892.