

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGÍA

**GENERACIÓN DE SUSTITUTOS BIO-ARTIFICIALES DE ESCLERÓTICA
PARA LA REPARACIÓN MICROQUIRÚRGICA DE LA TÚNICA OCULAR
EXTERNA**

PROGRAMA DE DOCTORADO DE BIOMEDICINA



Tesis doctoral de:

Gerson Vizcaíno López

Realizado bajo la dirección de:

Dr. Antonio Campos Muñoz

Dr. Víctor Carriel Araya

2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Gerson Vizcaíno López
ISBN: 978-84-1306-440-6
URI: <http://hdl.handle.net/10481/59756>

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en los laboratorios del Grupo de Ingeniería Tisular del Departamento de Histología de la Universidad de Granada y financiada parcialmente por los Proyectos de Investigación FIS PI14/0955 y FIS PI15/2048 del fondo de Investigación Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio Español de Economía y Competitividad).

Parte de los resultados expuestos en esta memoria han sido publicados en los siguientes artículos científicos originales:

- 1) **Carriel V***, **Vizcaíno-López G***, Chato-Astrain J, Durand-Herrera D, Alaminos M, Campos A, Sánchez-Montesinos I, Campos F. SCLERAL SURGICAL REPAIR THROUGH THE USE OF NANOSTRUCTURED FIBRIN/AGAROSE-BASED FILMS IN RABBITS.
Exp. Eye Res. 2019 Jun 29; 186:107717. doi:10.1016/j.exer.2019.107717.
*** Ambos autores contribuyeron equitativamente.**
Factor de Impacto: 2.998; Área: Medicine, Ophthalmology; Q1, Percentil: 91
- 2) Campos F, Bonhome-Espinosa AB, **Vizcaino-López G**, Rodriguez IA, Duran-Herrera D, López-López MT, Sánchez-Montesinos I, Alaminos M, Sánchez-Quevedo MC, Carriel V.GENERATION OF GENIPIN CROSS-LINKED FIBRIN-AGAROSE HYDROGEL TISSUE-LIKE MODELS FORTISSUE ENGINEERING APPLICATIONS.
Biomed Mater. 2018 Feb 8;13(2):025021.
Factor de Impacto: 3.440; Área: Engineering Biomedical; Q2, Percentil: 74

***“No sé si quien lea este libro aprenda algo, yo
sí... haciéndolo.”***

Dr. Alfredo Gómez Leal

AGRADECIMIENTOS

El sacrificio de muchos es la recompensa de unos pocos en muchas ocasiones. Hoy agradezco a todos los involucrados en este proyecto y con los cuales me identifico, como fuente de inspiración, soporte o consejo para lograr este objetivo.

Quiero iniciar agradeciendo a las universidades involucradas. La Universidad de Granada, por permitirme ser parte del grupo de profesionales que se benefician de sus programas formativos. A la Universidad Autónoma de Santo Domingo por siempre permitirme seguir mi formación profesional y docente dando los permisos necesarios en esta ocasión para este proyecto y la Universidad Nacional Autónoma de México por ser motivarme a seguir buscando el conocimiento en tierras extranjeras.

Al Centro Cardio-Neuro Oftalmológico y Trasplante (CECANOT), por impulsarme a seguir. A esa familia gigantesca que sueña con ser grande, porque su personal lo sea e imprime su sello de progreso y futuro provechoso. Sus autoridades por brindarme ese apoyo de hijo favorito, los colegas y compañeros de trabajos (médicos, enfermeras y personal en general). A los más pequeños que vienen y van durante cuatro años de su vida. Por aportar tanto con sus noveles ideas haciendo replantearnos paradigmas y cambio de pensamientos para ir a la par. Los que me enseñan tanto de tecnología y novedades muchas útiles y otras para divertirnos. ... gracias no sería yo sin ustedes.

A mis directores de Tesis Doctoral, por ser la motivación inicial y continua en este camino. Por incentivar me a aprender lo desconocido y usar mis habilidades para lograr esta y otras metas.

Prof. Antonio Campos Muñoz, gracias por la pasión y entrega. Una vida comprometida con la ciencia, la cultura, el progreso y la certeza de que el futuro del conocimiento siempre será mejor para la humanidad, y que el enigmático mundo de la histología e ingeniería tisular tiene tanto por ofrecer que solo espera ser encontrado. Gracias mil una y otra vez.

Prof. Víctor Carriel Araya, gracias por inducir me a buscar problemas aun no resueltos en el mundo de la oftalmología. Su entrega en el trabajo, la decisión de seguir adelante en todo lo has emprendido es digno de imitar. Gracias.

Gracias al Prof. Miguel Alaminos Mingorance, conocer a ese ser humano y profesional maravilloso es un honor y su dedicación al trabajo ajeno motiva a buscarle, seguirle e imitarle gracias, por el tiempo y esfuerzo dedicado.

También, quiero agradecer al equipo de profesores de profesores y profesoras del departamento de histología de la Universidad de Granada. Me he sentido en casa todo el tiempo que he estado con ustedes, gracias por apoyarme y ser parte de este equipo.

Al grupo de doctorando con los que conocí la ingeniería tisular y la ciudad. A quienes estuvieron conmigo siempre, les deseo lo mejor, éxitos presente y futuro. En mí tienen un amigo.

A mis familias, si mis familias a todas ellas en la que nací, la que heredé, las que me adoptaron y la que comparto mi tiempo libre, el trabajo, los proyectos de vida, éxitos y fracasos los que me conocen y me siguen donde vaya pidiendo al todo poderoso que me acompañe siempre.

Al Laboratorio de Patología Ocular, ese grupo de chiquillos y chiquillas que con más o menos tiempo se dedican de corazón a dar lo mejor de sí (los considero mis hijos). En esta ocasión especialmente a la Dra. Gianna Gil, por ser mi acelerador y freno en el laborioso proceso de elaboración de esta tesis.

A los pacientes que he dejado de dedicar tiempo para estar lejos en este proyecto, pero que en el futuro se benefician del avance de la ciencia y el desarrollo de la bioingeniería.

A la memoria dos personas que dejaron su huella en mí, los Doctores Alfredo Gómez Leal y Francisco Alejo.

Gracias, de todo corazón, muchas gracias.

RESUMEN

GENERACIÓN DE SUSTITUTOS BIO-ARTIFICIALES DE ESCLERÓTICA PARA LA REPARACIÓN MICROQUIRÚRGICA DE LA TÚNICA OCULAR EXTERNA

INTRODUCCIÓN: La túnica ocular externa está compuesta por la conjuntiva, esclera, córnea y el limbo (1). La esclera es la estructura más rígida de la misma, concediéndole la forma e integridad al ojo (2). No obstante, esta última se puede ver afectada con patologías como el trauma, infecciones, enfermedades autoinmunes y neoplasias que la invaden, cuyo desenlace final terapéutico es el injerto en la zona escleral afectada. En la actualidad, en la práctica médica rutinaria se utilizan injertos cadavéricos, pero el manejo y los resultados no son del todo satisfactorios (3). En este sentido, las técnicas de ingeniería tisular ofrecen la posibilidad de crear nuevos sustitutos para la reparación de defectos estructurales del globo ocular, y por tanto el objetivo de esta tesis doctoral fue generar y caracterizar un nuevo modelo biomimético de esclerótica artificial basado en la utilización de biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados para la reparación quirúrgica de defectos de esclera en un modelo animal.

MATERIALES Y MÉTODOS: Se utilizaron 18 conejos de raza New Zealand, machos, los cuales se distribuyeron en 6 grupos, con tres conejos cada uno. Se realizó la elaboración de los biomateriales de hidrogel de fibrina agarosa (HFAN), combinándose con cross-linking químico con glutaraldehído al 0.5 % o genipín al 0.1%. Previa asepsia y antisepsia, bajo anestesia, se procedió a la resección quirúrgica parcial de la esclera de los conejos. Se evaluó el injerto a los 40 días, momento en el cual los conejos fueron sacrificados. Se analizaron las características morfológicas macroscópicas, histológicas e histoquímicas. Los grupos se separaron según el injerto colocado de la siguiente manera: HFAN, HFAN-GP, HFAN-GA, injerto cadavérico (C-CTR). Además, se dejó evolucionar la lesión sin reparación como control negativo (N-CTR). El ojo derecho sano de cada animal se utilizó como control sano (H-CTR).

RESULTADOS: Las características de biocompatibilidad y biodegradación del HFAN fueron mejores que los materiales contrastados ($p < 0.005$). A la evaluación a los 40 días, la respuesta inflamatoria fue mayor en los biomateriales con cross-linking químico, siendo nula para el C-CTR. El tejido regenerado más similar al H-CTR fue el del HFAN. En cuanto a la integración del injerto, el grupo C-CTR presentó una integración incompleta del injerto. El hecho de no reparar el defecto (N-CTR) provoca una disminución del 50% del grosor escleral final ($p = 0.000$) (consultar los resultados en extenso la referencia 4).

CONCLUSIÓN: Este estudio demuestra, por primera vez, que la utilización de biomateriales es una alternativa prometedora para la reconstrucción de esclerales. Los resultados fueron especialmente prometedores tras la utilización de hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurada. Este biomaterial mostró un alto grado de biocompatibilidad, biodegradación y regeneración tisular a los 40 días posterior a la cirugía. Finalmente, este estudio sugiere que la fibrina-agarosa nanoestructurada podría ser un biomaterial idóneo para la reparación de defectos esclerales. Sin embargo, estudios futuros determinaran la potencial traslación clínica de este producto en la cirugía reconstructiva del globo ocular.

ÍNDICE

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	8
2.1. Anatomía de la túnica ocular externa del humano	12
2.2. Histología de la túnica ocular externa del humano	16
2.3. Fisiología de la túnica ocular externa del humano	20
2.4. Anatomía ocular comparada entre humanos y conejos.....	22
3. Patologías de la esclerótica susceptibles de tratamiento sustitutivo	28
3.1. Afecciones traumáticas.....	31
3.2. Afecciones neoplásicas	34
3.3. Afecciones inmunológicas	38
3.4. Afecciones infecciosas	40
4. Ingeniería tisular	43
4.1. Historia de la ingeniería tisular	43
4.2. Técnicas de ingeniería tisular.....	44
4.3. Ingeniería tisular en oftalmología.....	46
4.4. Diseño de esclera	48
OBJETIVOS	50
MATERIALES Y MÉTODOS	52
6.1 Animales de laboratorio	53
6.2 Generación de biomateriales.....	53
6.3 Cirugía	56
6.4 Grupos experimentales	57
6.5 Análisis postquirúrgico clínico.....	60
6.6 Histología	60
6.7 Morfometría y estadística.....	61
RESULTADOS	62
7.1 Aspectos clínicos	63
7.2 Regeneración tisular	64
7.3 Morfometría	69
DISCUSIÓN	71
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	79

INTRODUCCIÓN

La búsqueda constante de soluciones a problemas de salud no resueltos en la actualidad y los que tienen una resolución parcial o insatisfactoria hacen que la ingeniería tisular rompa paradigmas en la medicina tradicional, convirtiéndose en una fuente innovadora de la investigación médica. Los avances en este campo proporcionan estrategias y soluciones impensables hasta hace poco tiempo; pues sus aportes marcan un hito en la solución de problemas.

La ingeniería tisular establece por tanto una herramienta fundamental en las estrategias de salud del futuro. La patología del globo ocular constituye un importante problema de salud pública a nivel mundial, y algunas de dichas patologías carecen de soluciones satisfactorias. El desarrollo de la ingeniería tisular está permitiendo abordar la solución a alguno de estos problemas desde la perspectiva de la terapia sustitutiva.

En la presente tesis doctoral abordamos la terapia sustitutiva de la túnica esclerótica mediante la generación de sustitutos bio-artificiales que permitan la reparación de la misma en circunstancias patológicas de distinta naturaleza para las que hasta el momento no se han obtenido resultados terapéuticos eficaces. Para el desarrollo de esta tesis abordaremos, en un primer capítulo, el estado actual del conocimiento de la anatomía, histológica y la fisiología de la túnica esclerótica. En un segundo capítulo, nos ocuparemos de la patología y el tratamiento actual de la esclerótica, y especialmente de aquella que es susceptible de una terapia sustitutiva.

En un tercer capítulo, desarrollaremos el concepto y las técnicas actuales de ingeniería tisular y su significación en el contexto de la medicina. A continuación, expondremos los objetivos que se pretenden alcanzar en la presente tesis doctoral, así como sucesivamente la metodología utilizada al respecto, los resultados experimentales obtenidos, y finalmente, la discusión de los mismos en el contexto de la bibliografía existente. Finalmente, enumeraremos las conclusiones y la relación de referencias utilizadas en el desarrollo de la tesis doctoral.

2. Anatomía, histología y fisiología de la túnica ocular externa

El sistema visual es el encargado de capturar la información de la composición luminosa de las estructuras y ubicaciones topográficas de la realidad, su registro y organización. Además, correlacionar la información visual para su uso e interacción con el mundo que nos rodea. El ojo ejerce su función de manera similar al de una cámara, ya que posee lentes, un sistema de apertura y la retina ejerce la función equivalente a la película. El proceso de acomodación del cristalino permite enfocar imágenes a diferentes distancias. Esto lo logra gracias a ligamentos y fibras musculares que lo suspenden a su alrededor que ejercen su función mediados por el sistema parasimpático. La pupila se cierra y abre para controlar la cantidad de luz que entra al globo ocular dependiendo de la iluminación externa, aumentando la profundidad del enfoque cuanto más se cierre (1).

El globo ocular contiene 2 tipos de líquidos que mantienen su presión interna en conjunto con las estructuras sólidas. El humor acuoso, que se encuentra delante del cristalino, y el humor vítreo, detrás de este (2). El humor acuoso es producido por el cuerpo ciliar en cantidades de 2.5 μ l/min por minuto y es drenado por el conducto de Schlemm que lo conduce a las venas extraoculares. La presión intraocular normal se encuentra entre los 12 mmHg hasta 20 mmHg (3).

La capa más interna del ojo es la retina. Esta posee conos y bastones, los cuales son células encargadas de recibir las señales de luz. Dichas señales pueden ser de colores, en el caso de los conos, y blanco y negro percibidas por los bastones. La retina lleva la información a través de fibras neuronales que van al nervio óptico. Esto se logra gracias a los pigmentos en los bastones, rodopsina; y en los conos, pigmentos de color (3). Los cuales al recibir la luz cambian su composición y producen señales eléctricas que serán enviadas al cerebro para producir las imágenes visuales. Las señales eléctricas viajan a través de los nervios ópticos, llegan al quiasma óptico, los tractos ópticos, núcleos geniculados laterales dorsales y por último al lóbulo occipital a las cortezas visuales primaria y secundaria, donde es almacenada la información (Figura 1) (4).

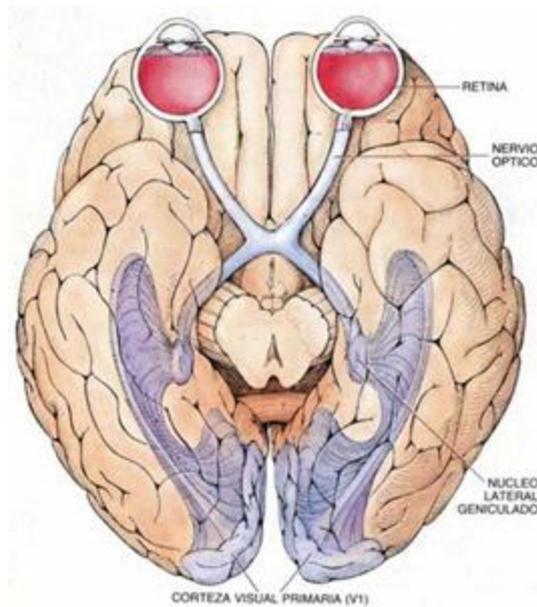


Figura 1. Vías visuales. Fuente: http://neuroaprende.blogspot.com/2016/07/par-craneal-ii-nervio-optico_32.html

El globo ocular es un órgano fotosensible y hueco. Su forma es consecuencia directa de la tracción de los músculos que se insertan en él, la grasa periorbitaria y las distintas estructuras que lo conforman, razón por la cual no posee una forma totalmente esférica. Las órbitas se encuentran a ambos lados de las fosas nasales, tienen forma de pirámide cuadrangular, con la base en dirección anterior y cuyo vértice corresponde a la ubicación del conducto óptico. Su eje se dirige hacia atrás y hacia dentro, con un ángulo con respecto al plano medial de 23 grados (5, 6, 7).

En los recién nacidos, el globo ocular tiene un tamaño de un tercio del globo ocular del adulto. Este crece aceleradamente durante los primeros 5 años de vida y para antes de que empiece el aumento de la estatura. Se encuentra en dirección sagital y oblicua en plano postero-anterior y está rodeado por la cápsula de Tenon, cuya función es separarlo de las órbitas. Su contenido está clasificado en 2 áreas, dentro y fuera del cono muscular (5, 6). Posee 6 músculos encargados de girarlos: 2 rectos horizontales, 2 rectos verticales y 2 músculos oblicuos. El trabajo conjunto de contracción y relajación de los músculos extraoculares guía el ojo hacia la dirección que se desee mirar (8).

El globo ocular está lleno de líquidos transparentes. El vítreo se encuentra posterior al cristalino y el humor acuoso, delante del cristalino. El iris se toma como división de las cámaras anterior y posterior del ojo (6).

2.1. Anatomía de la túnica ocular externa del humano

La conjuntiva es la capa correspondiente al tejido mucoso que cubre la cara interna de los párpados y la cara anterior del globo ocular (Figura 2.a). Es una continuación de la córnea que empieza en el limbo y continúa en los puntos lagrimales con el tejido de estos. La conjuntiva palpebral surge del borde libre donde están las glándulas de Meibomio. El fondo de saco superior es de tejido conjuntivo laxo, se encuentra de 8 a 10 mm del limbo y en él se adhiere una expansión del elevador y del recto superior, mientras que el fondo de saco inferior está a 8 mm del limbo y a él llega el ligamento de Lockwood. El fondo de saco externo se encuentra a 14 mm del limbo, en él se adhiere el reborde orbitario externo. La conjuntiva bulbar, en relación con el globo ocular se divide en escleral y pericorneal. La pericorneal tiene 3 mm de ancho alrededor de la córnea y está muy adherida a la cápsula de Tenon, mientras que la escleral está separada de la cápsula de Tenon por tejido subconjuntival (6).

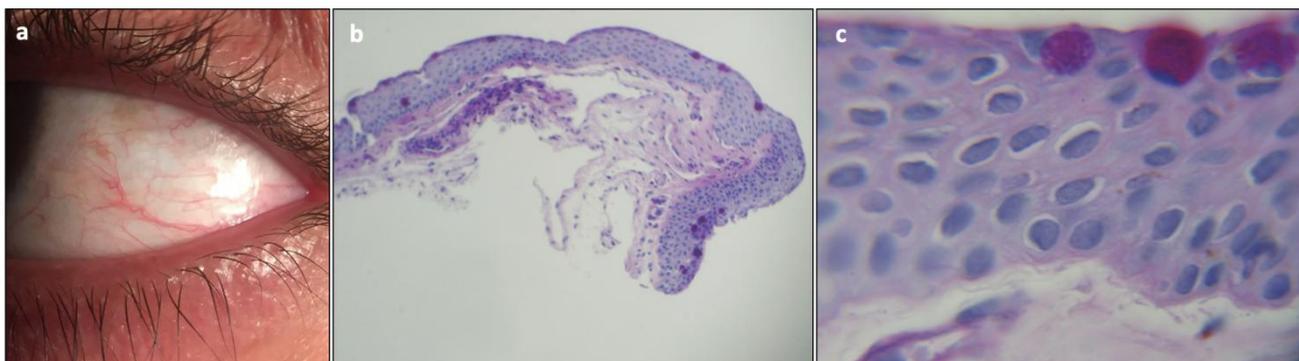


Figura 2. Conjuntiva. a. Biomicroscopía de la conjuntiva. b. Microscopia 4x. c. Microscopia 40x. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

Desde el punto de vista histológico posee un epitelio y un corion (Figura 2.b). El epitelio es cilíndrico con una capa superficial de células con núcleos ovalados y basales. En su capa profunda contiene células planas de núcleo ovalado horizontal (Figura 2.c). Además, posee células caliciformes encargadas de secretar mucina. En el corion se pueden diferenciar 2 capas también: la superficial adenoide, posee linfocitos; y la capa fibrosa profunda con fibras de colágeno y elásticas. Las múltiples glándulas de la conjuntiva tienen la función de lubricar, hay diferentes tipos: glándulas de Henle, de Wolfring, de Krause y de Manz. La vascularización de este tejido está proporcionada por

las arterias palpebrales y ciliares anteriores. El drenaje está dado por varias venas palpebrales y ciliares anteriores. Posee un drenaje linfático superficial debajo del epitelio y uno profundo debajo de la capa fibrosa. La inervación de esta área está proporcionada por ramas nasales, lagrimales, frontales y sub orbitarias (6).

El ojo se suele dividir en 3 tunicas o capas: interna, media y externa. La túnica ocular externa está conformada por 2 componentes la córnea y la esclera. El limbo esclerocorneal es el área de transición entre estas 2 zonas. Esta zona se caracteriza por la presencia de fibras colágenas con disposiciones variables que dan su transparencia en el caso de la córnea y opacidad, en el caso de la esclera. Además, de otros componentes y características que se describirán más adelante (9).

La córnea está constituida principalmente por tejido extracelular, colágeno y proteoglicanos, y su función es esencialmente refractiva. La córnea posee un diámetro de 11.5 mm en su eje vertical y 12.5 mm en el eje horizontal en los recién nacidos. Las medidas correspondientes desde los 2 años de edad en ojo humano ascienden a un diámetro horizontal de 9.5 a 10.5 mm. Por otra parte, su grosor que varía desde 0.5 a 1.0 mm. La córnea presenta un radio de curvatura menor que el del globo ocular. Dentro de sus funciones destaca como lente convergente y posee una capacidad refringente de 45 dioptrías. Dentro de sus propiedades, la córnea se caracteriza por ser transparente y produce reflejo corneal al ser tocado debido a su abundante inervación nerviosa (Figura 3) (7, 10, 11).

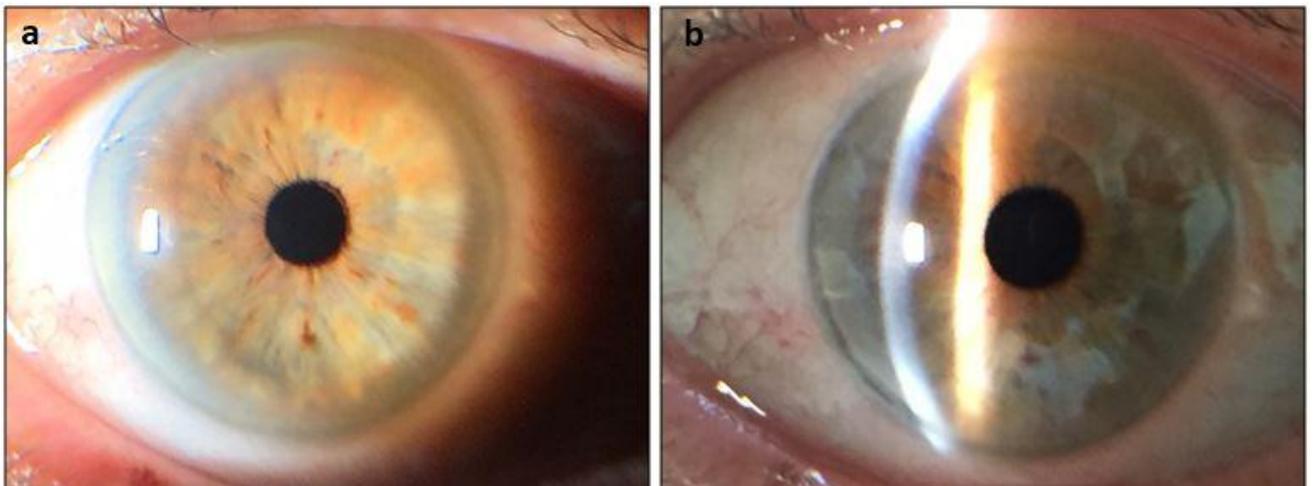


Figura 3. Córnea. a. Biomicroscopía. b. Biomicroscopía con haz de hendidura. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

La córnea es avascular y se divide en 5 capas:

- Epitelio escamoso: muestra de 5 a 7 capas celulares.
- Membrana de Bowman: acelular, compuesto por fibrillas en material amorfo.
- Estroma: posee fibras de colágeno en organización lamelar y queratinocitos.
- Membrana de Descemet: posee fibras hexagonales y estriaciones transversales (5).
- Endotelio: el cual es una capa de células hexagonales (7, 10, 11).

La esclera está formada por tejido conjuntivo denso de colágeno tipo 1 con escasas fibras elásticas entrelazadas. Las bandas fibrosas que lo conforman tienen un ancho de 10 a 16 micras y una longitud de 100 a 140 micras, estas tienen disposiciones en malla de balón y en abanico dependiendo del área. La esclera cubre $\frac{4}{5}$ partes del globo ocular y tiene forma de anillo (Figura 4.a). Para su análisis anatómico suele dividirse en cara externa e interna, borde anterior y borde posterior. Posee una apertura anterior para la córnea y una posterior para el nervio óptico (Figura 4.b)(12).

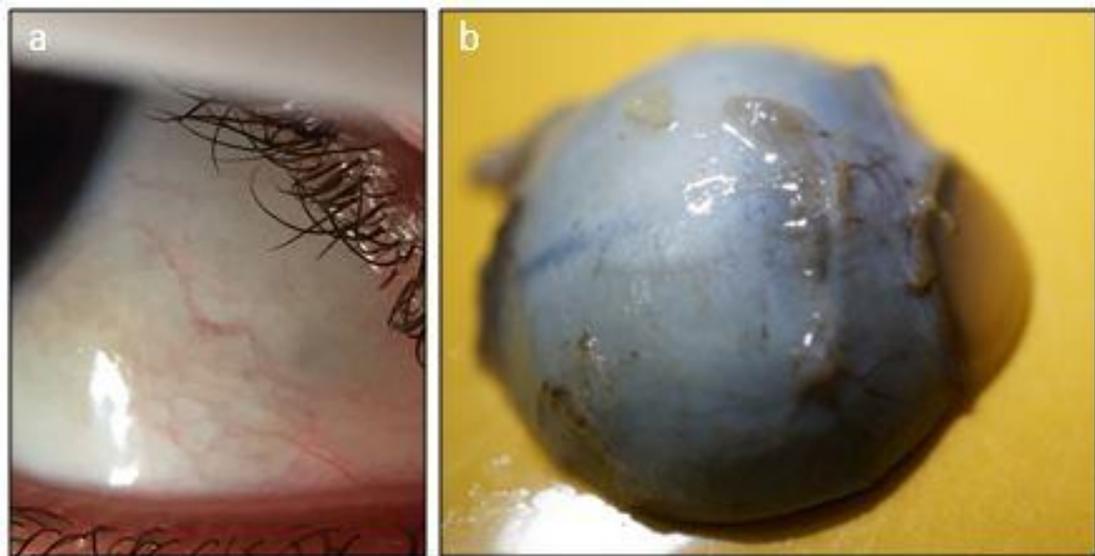


Figura 4.Esclera. a. Biomicroscopía de ojo con atención a conjuntiva y esclera. b. Corte anteroposterior horizontal del ojo enfocado en esclera. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

En general, la esclera tiene pocos vasos sanguíneos, por lo que consigue nutrientes de las capas vecinas. La esclera, que se encuentra rodeada por la cápsula de Tenon, le confiere la forma del ojo debido a la dureza de su estructura. Además, está conformada

por una serie de capas. Entre estas se encuentra la epiesclera, que es una capa vascularizada con presencia de colágeno que está en relación con la cápsula de Tenon y la conjuntiva. Asociada a esta se encuentra el estroma, que se compone principalmente por fibras de colágenas oblicuas y entrelazadas, y algunos elementos celulares. Esta última es la capa que contribuye al color blanco y la opacidad de la esclera. Otra de las capas esclerales es la lámina fusca, que se conforma por melanocitos. La capa emisaria, contiene tejido uveal pigmentado, vasos sanguíneos (arterias ciliares anteriores, posteriores, venas ciliares, venas vórtex) y nervios (rama del nervio de Axenfeld) pasan a través de esta (5, 6, 7, 11, 13).

La esclera es más fina en las áreas de inserción de los músculos rectos y en el limbo. La importancia de lo anteriormente citado se encuentra en el momento de realizar procesos quirúrgicos. Ejemplo de estos son la corrección de estrabismo y desprendimientos de retina. El espesor de la esclera varía de 0.3 a 1 mm. Es más fina en donde se insertan los rectos 0.3 mm; más gruesa alrededor de la entrada del nervio óptico, 1 mm; alrededor del ecuador tiene un ancho de 0.4 a 0.5 mm; y 0.6 mm anteriormente en las demás inserciones musculares. Alrededor del nervio óptico se encuentra el círculo arterial de ZinnHaller, conformado por ramas de las arterias ciliares posteriores. Está inervada por ramas de los nervios ciliares largos que penetran alrededor del ecuador, los nervios suelen formar bucles subiendo y bajando entre las diferentes capas (5, 6, 7, 11, 13).

El limbo esclerocorneal constituye la zona de transición entre la córnea y la esclera (Figura 5). Su color varía de manera gradual de transparente a blanco en un área con un ancho de 1 a 1.5 mm. Su importancia radica en su relación con la cámara anterior del ojo y su uso para intervenciones quirúrgicas. En el limbo se encuentran la conjuntiva, la cápsula de Tenon, la epiesclera, el estroma esclerocorneal y la estructura de flujo acuoso (14).

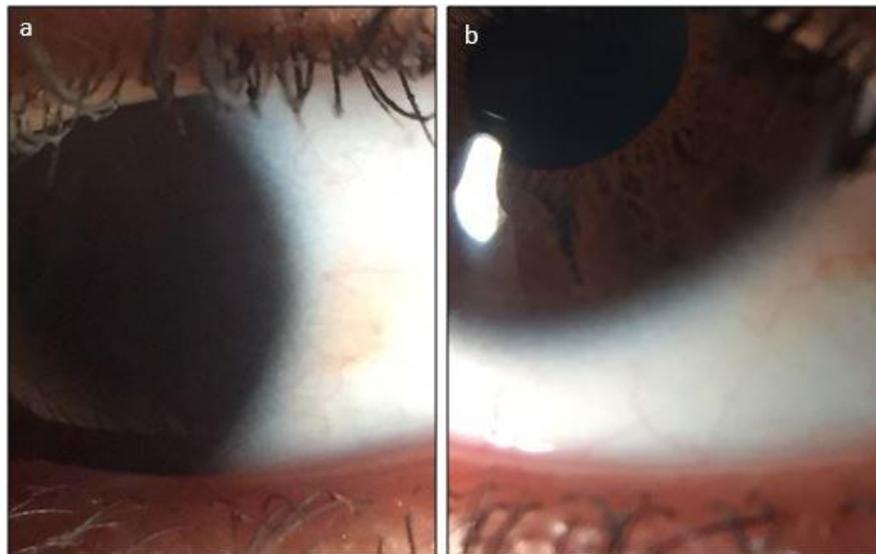


Figura 5. Limbo esclerocorneal. a. Biomicroscopía con vista del limbo nasal. b. Biomicroscopía del limbo inferonasal. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

Su inicio se encuentra en unión con la membrana de Bowman y la línea de Schwalbe. Esta área comienza en el espolón escleral y termina la membrana de Descemet. Desde el punto de vista quirúrgico se divide en: zona anterior, de color gris azulado sobre la córnea transparente, y en la zona posterior, de color blanco, sobre la malla trabecular o la raíz del iris (13).

2.2. Histología de la túnica ocular externa del humano

En la túnica fibrosa externa se pueden encontrar diversos tipos de tejidos en sus diferentes componentes, formado por varias capas con estructuras especializadas para otorgar al ojo las propiedades que necesita para mantener su forma y recibir la luz del exterior.

La córnea es básicamente material extracelular cubierto por 2 capas de células anterior y posteriormente. En su parte anterior, se disponen varias capas de epitelio. Mientras que posteriormente se encuentra una capa simple de endotelio (Figura 6) (15). *In vivo*, se puede observar sobre el ojo una lámina de lágrima, la cual posee 3 capas. Estas capas se distribuyen de la siguiente manera: una de glicoproteínas proveniente de la conjuntiva, una de agua provenientes de los tejidos lagrimales y una de aceite externa producida por las glándulas de Meibomio, Moll y Zeis (6).

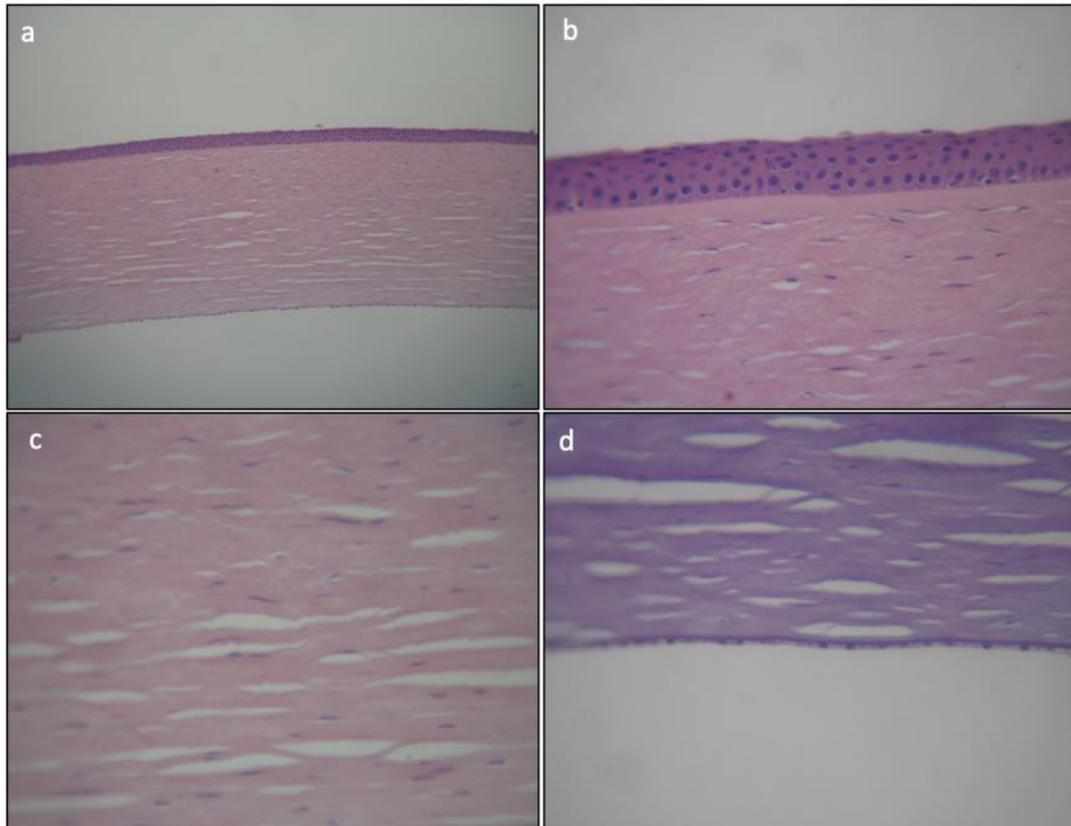


Figura 6. Córnea. Microscopia a 4x con tinción H-E de la córnea donde se observa la distribución de sus cinco capas. b. Microscopia a 10x con tinción H-E con atención a epitelio, membrana basal, membrana de Bowman y porción del estroma. c. Microscopia a 40x con tinción H-E del estroma corneal. d. Microscopia a 40x con tinción PAS de estroma corneal, membrana de Descemet y endotelio corneal. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

Se pueden observar en un corte de la córnea 5 capas:

- Epitelio con membrana basal: mide 32 micras de grosor, es no queratinizado y posee 5 capas de epitelio escamoso con la mayor organización regular encontrada en todo el cuerpo; la membrana basal consiste en células columnares irregulares con núcleos centrales y hemidesmosomas como uniones. Se puede dividir en capa basal, posee células claras deformes y planas y células oscuras alargadas; capa intermedia, posee 2 o 3 capas de células con una cara basal cóncava y citoplasma granuloso; y superficial, posee 2 a 3 capas de células aplanadas, citoplasma acidófilo, denso y núcleos aplanados. Se continúa con la conjuntiva bulbar y el limbo.
- Membrana de Bowman: tiene un grueso de 8 a 14 micras, es tejido conectivo de fibras de colágeno dispuestas de manera irregular, es una capa especializada de estroma, posee diversos canales y poros para permitir que los nervios lleguen al

epitelio. Su cara anterior es regular y la posterior irregular, termina en el limbo con un borde redondeado con puntas.

- Estroma: tiene 500 μm de grosor, posee fibras de colágeno oblicuas en forma de lamelas que le otorgan una apariencia de panal de abejas, tiene un 5 % de fibroblastos, sus núcleos son aplanados y alargados que ocupan la mayor parte del citoplasma.
- Membrana de Descemet: con un espesor entre 5 a 10 μm , está constituido por diversos tipos de fibras colágenas y glicoproteínas secretadas por el endotelio. Tiene propiedades elásticas y también se considera una membrana basal hiper desarrollada.
- Endotelio: compuesto por células planas hexagonales unidas por uniones terminales estrechas en los ápex de las células, la membrana plasmática de las células basales es plana (6, 15).

La esclera es una continuación de la córnea compuesta en su mayoría por material extracelular y fibrocitos aplanados en menor cantidad. Posee la capa emisaria, en esta pasan los vasos sanguíneos y nervios a través de canales, posee tejido uveal pigmentado; la epiesclera, compuesta por unas cuantas capas de colágeno vascularizado debajo de la cápsula de Tenon; el estroma, compuesto por fibras de colágeno de diferentes diámetros (10 a 16 micras de ancho por 100 a 140 micras de largo) oblicuas y entrelazadas; la lámina fusca, compuesta por capas sueltas con melanocitos. La opacidad de la esclera se debe en parte a su alto contenido de agua (Figura 7) (6).

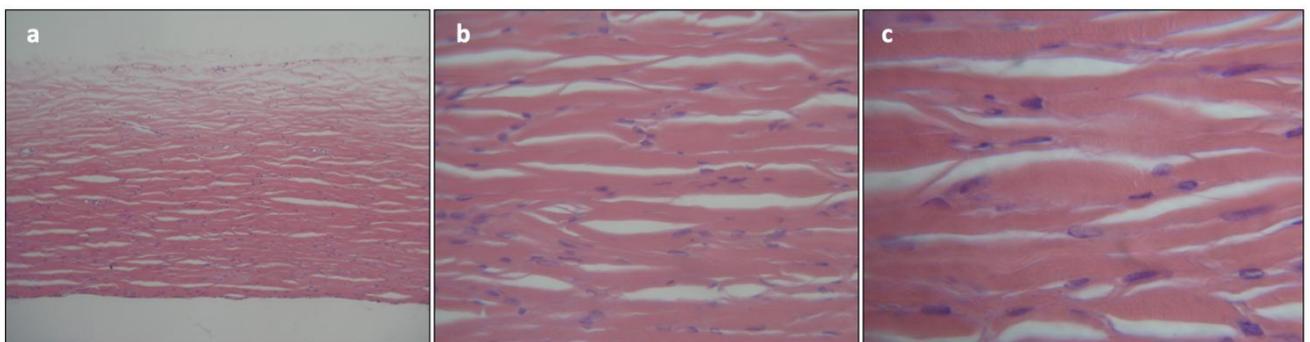


Figura 7. Esclera. a. Microscopia a 10x con tinción H-E. b. Microscopia a 40x con tinción H-E. c. Microscopia a 100x con tinción H-E Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

La esclera se compone por tejido conjuntivo denso, formado principalmente por fibroblastos y matriz extracelular (MEC), donde prevalece el colágeno tipo I (16). Las características de la esclera dependen del área analizada. Se ha observado que tanto la organización como el grosor de las fibras varían en toda la esclera. Las regiones de la esclera se dividen en calota anterior, posterior y región ecuatorial (6).

La presencia de fibras de colágeno tipo I caracteriza a la MEC de la esclera. En cuanto a la MEC escleral, dispuestas de manera irregular en múltiples direcciones. Del mismo modo, se puede observar en la MEC la presencia de una fina malla de fibras elásticas y de fibras de colágeno del tipo III y IV. En la calota anterior las fibras externas se disponen en forma circunferencial. Consecuentemente, le confiere a esta región la rigidez necesaria para la implantación de la córnea y los músculos rectos extraoculares. Por el contrario, la región ecuatorial es la zona más delgada. En esta última se agrupan las fibras de colágenos y las fibras elásticas (6).

La calota posterior tiene una distribución diferente de la calota anterior, y las fibras externas se abren en forma de malla de balón, mientras que las internas lo hacen en forma de abanico. Además, los haces de fibras contienen células, con núcleo irregular, que se unen entre sí. Por otra parte, la sustancia fundamental escleral se encuentra en menor proporción. Su composición está dada principalmente por proteoglicanos y glicoproteínas (6).

Debido a que el limbo esclerocorneal es un área de transición, no tiene una histología que lo diferencie de forma exclusiva. Histológicamente tiene las características de las estructuras que convergen en esta área con cambios graduales (6, 17, 13). A nivel microscópico, el limbo se observa de forma triangular con base corneal. Su disposición es más irregular a medida que da paso a la esclera, donde se evidencian algunos vasos sanguíneos y adosamiento de la úvea (Figura 8).

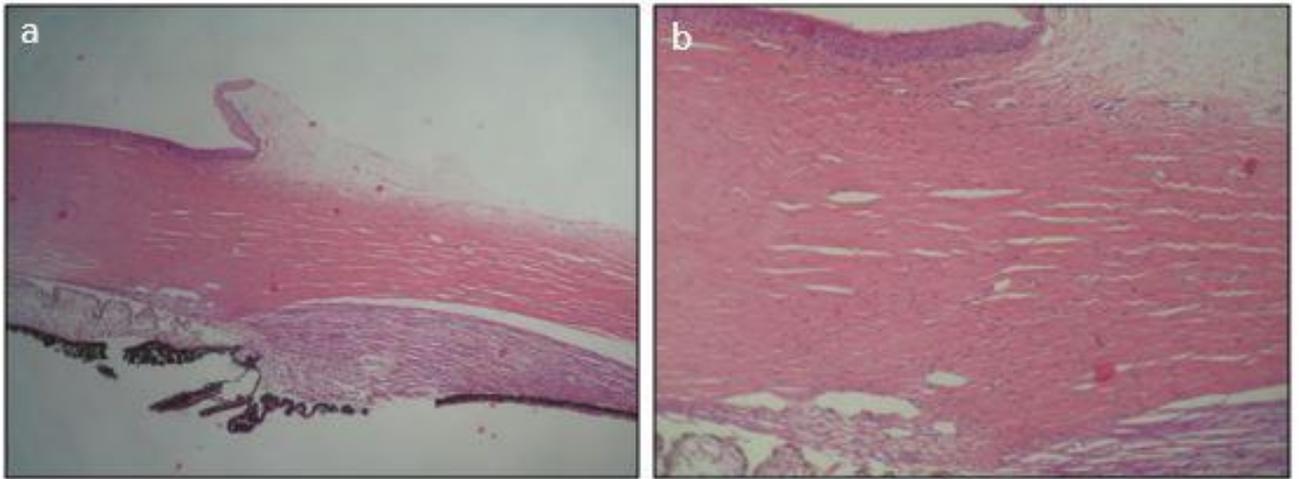


Figura 8. Limbo esclerocorneal. a. Microscopia a 4x, donde se observan las estructuras relacionadas: conjuntiva, córnea, esclera y por dentro el cuerpo ciliar. b. Microscopia a 10x, donde se observan estructuras de transición. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

2.3. Fisiología de la túnica ocular externa del humano

La túnica fibrosa logra llevar a cabo sus funciones de refracción, protección y rigidez gracias a su alta composición en fibras colágenas con disposiciones, tamaños y entrelazamientos específicos según el área. La refracción de la luz ocurre en la cara anterior de la córnea y el cristalino. La córnea tiene un índice refractivo de muy parecido al del humor acuoso. La luz que pasa por la córnea se refracta en la cara corneal anterior debido a su radio de incurvación de aproximadamente 8 mm y por la diferencia con el índice de refracción del aire. La capacidad óptica de la córnea es de 40 a 45 dioptrías. Su tercio central es casi totalmente esférico y posee un diámetro de 4 mm. El epitelio corneal superficial tiene sus células conectadas por medio de zónulas, estas ofrecen la semipermeabilidad de esta capa, al microscopio se puede observar que tiene una superficie muy irregular debido a la presencia de microvellosidades, pero resulta emparejada por la lámina de lágrimas que producen las glándulas. Las células epiteliales migran continuamente de su área basal y de manera centrípeta desde las células madres en el limbo, si estas sufren algún daño se producen defectos epiteliales superficiales crónicos. En el epitelio corneal también se pueden encontrar histiocitos, macrófagos, linfocitos, melanocitos y células de Langerhans (6).

En el estroma corneal se podrán encontrar queratinocitos productores de colágeno y lamelas de colágeno orientadas oblicuamente con entrelazamientos moderados en la parte anterior y lamelas paralelas en el área posterior. Estas fibras dan la vuelta a la córnea de manera circunferencial. Estas son muy uniformes y consisten en colágeno tipo 1, 3, 5 y 6; el tipo 7 puede ser encontrado en las fibras que anclan el epitelio. La sustancia fundamental es alta en glucosaminoglucanos como el queratán sulfato, encargado de las propiedades inflamatorias del estroma (6).

La esclera junto a la córnea, forma la cubierta ocular externa, en conjunto dan la forma y estructura del globo ocular. Sirviendo como medio de contención para aislar el globo ocular del medio exterior. La esclera presenta varias áreas las cuales ejercen funciones diferentes (6).

El borde anterior de la esclera se continúa con el limbo y este su vez con la estructura corneal. La esclera en el borde anterior sirve de anillo de sujeción a las fibras corneales en su porción central. Mientras, que la porción superficial permite el adosamiento de la conjuntiva y con ello logra la impermeabilización selectiva de sustancias a través de sí. La esclera perilimbar en su tercio superficial posee el canal de Schlemm, este tiene la función de sistema de drenaje del humor acuoso y comunicación del sistema venoso utilizando las venas acuosas episclerales. En esta zona sirve de paso a los vasos nutricios de la úvea anterior e inervación de la córnea. La porción anterior profunda de la esclera sirve de inserción de la raíz del iris, y el cuerpo ciliar a través del espolón escleral. Con esto se logra mantener todos los componentes internos del globo ocular en su lugar permitiendo su funcionalidad (6).

El tercio anterior externo en sus regiones superior, inferior, externa e interna sirve para la inserción de los tendones músculos rectos lo que le confiere propiedades de polea, junto antes del ecuador. En la región superior externa posterior al ecuador le sirve de inserción al oblicuo mayor y el oblicuo inferior se inserta detrás del ecuador en la región ínfero-externa. Todas las áreas esclerales donde se insertan los tendones; sirven de bucle para la inserción de las fibras en la esclera para el desplazamiento del globo ocular en su centro de rotación (6).

La porción posterior ya delgada, se empieza a engrosar en el polo posterior y da pasos a las fibras nerviosas del nervio óptico a través de la organización perpendiculares de las fibras. En resumen, las funciones esclerales se agrupan en proporcionar, contención y forma ocular. Además, permite el acceso de vasos y nervios en ambas vías aferentes y eferentes al ojo y servir de medio de sujeción de los músculos para la motilidad ocular y hacer eficiente la visión, función final del globo ocular (6).

El limbo es una zona de transición entre la córnea y la esclera, donde se encuentran las células madre corneales. En el limbo también se unen la conjuntiva y el cuerpo ciliar. Esta unión ayuda al mantenimiento de la forma del globo ocular. Al unirse la córnea con la conjuntiva se impide el paso de microorganismos nocivos para el ojo debido a la impermeabilización que se logra gracias a estas estructuras. Por otra parte, al unirse la córnea con la esclera, hay fibras que se organizan en forma arqueada y circular para mantener las estructuras fijadas en su lugar correspondiente. Además, sirve de adhesión de los componentes uveales anteriores (iris y cuerpo ciliar) (18).

2.4. Anatomía ocular comparada entre humanos y conejos

Los conejos son animales ampliamente utilizados en las investigaciones de oftalmología con fechas que datan desde el siglo XVII (19). Con fines para investigaciones clínicas son criados bajo condiciones especiales, dependiendo de su objetivo. La selección del conejo para estudios científicos está dada por su similitud anatómica y fisiológica con los ojos humanos, además de que son animales de fácil manejo y cuidado. Las razas más utilizadas son los conejos albinos Nueva Zelanda y los conejos Dutch Belt, siendo los primeros los más estudiados. No se han encontrado diferencias significativas en los estudios de ojos entre conejos New Zealand proveniente de conejos hembras y machos. No obstante, la edad de los conejos ha representado un factor importante en la respuesta inflamatoria postquirúrgica. Al igual que en los niños humanos, los conejos más jóvenes suelen desarrollar en el postquirúrgico más signos de inflamación (20).

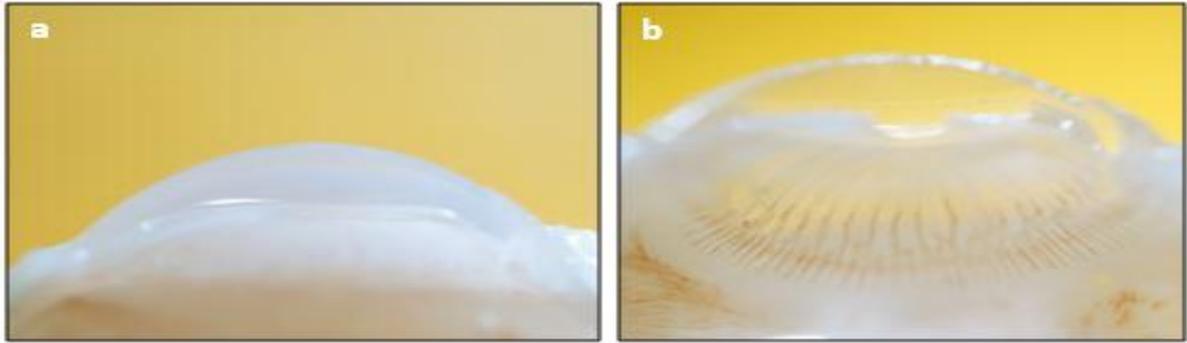


Figura 9. Vista macroscópica del globo ocular normal de conejo. a. Cámara anterior. b. Cuerpo ciliar. Fuente: Conejo de experimentación de la tesis doctoral.

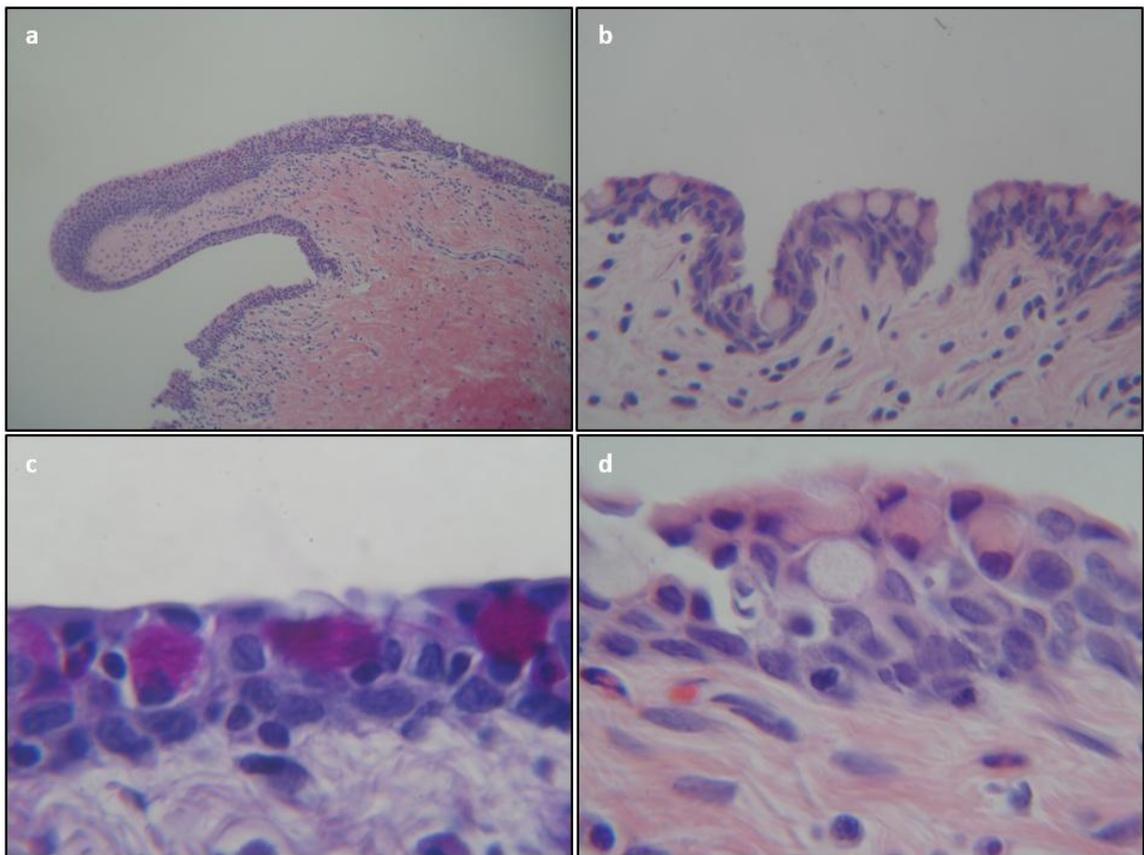


Figura 10. Conjuntiva de conejo. a. Microscopia a 4x. b. Microscopia a 20x. c. Microscopia a 40x. d. Microscopia a 40x. Fuente: Conejo de experimentación de la tesis doctoral.

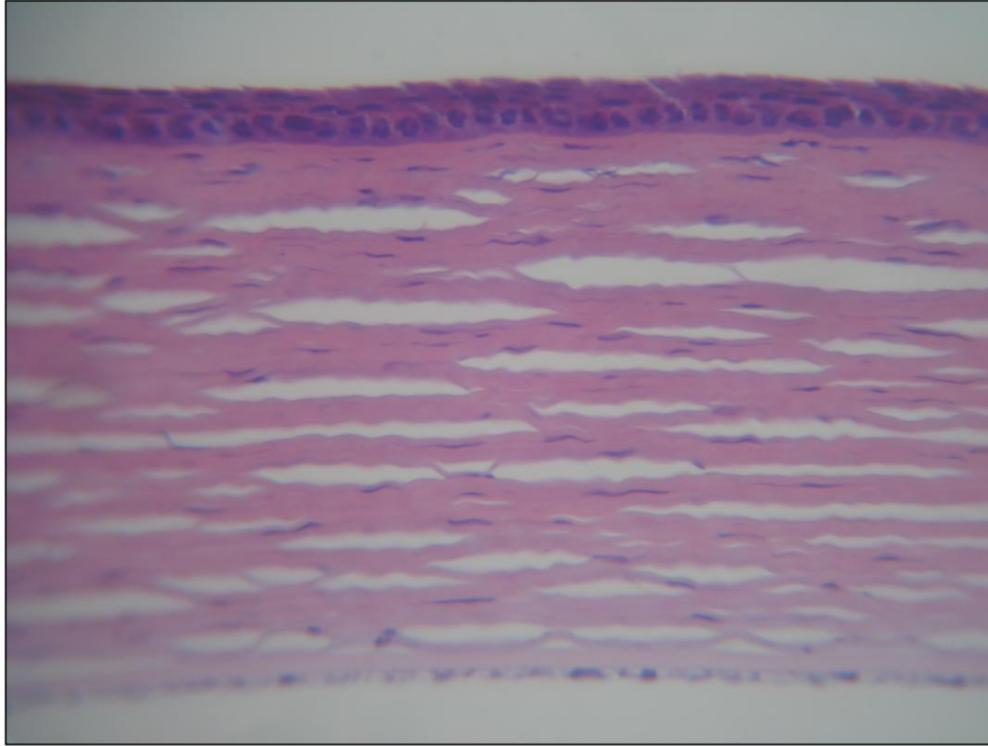


Figura 11. Córnea de conejo. Microscopia a 10x. Fuente: Conejo de experimentación de la tesis doctoral.

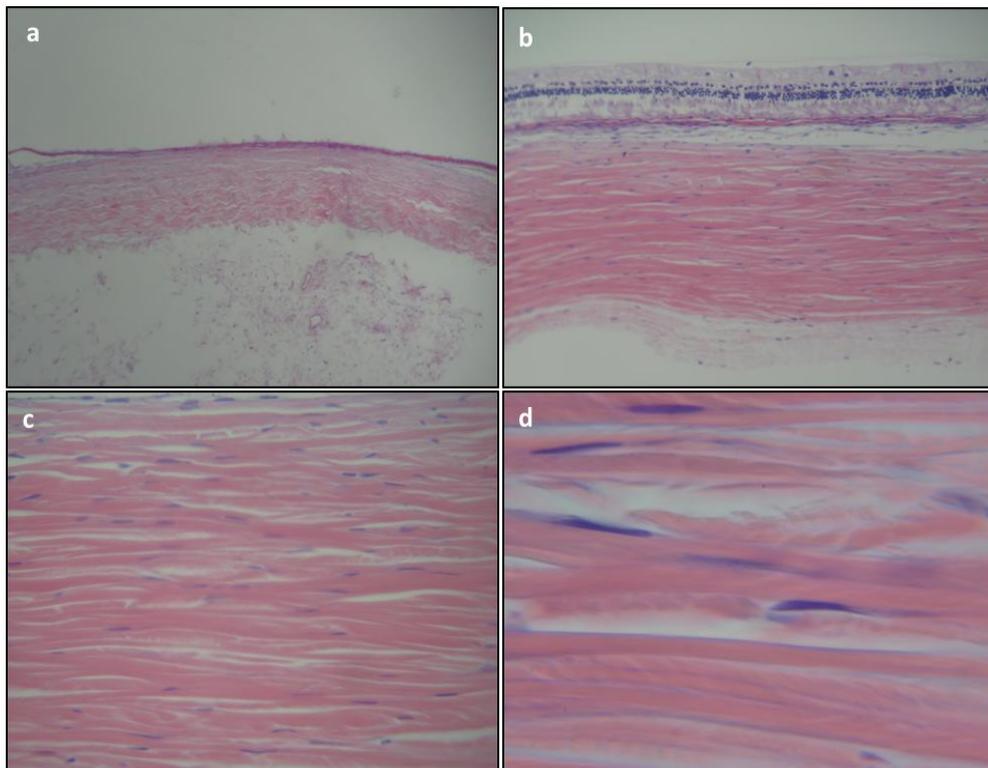


Figura 12. Esclera de conejo. a. Microscopia a 4x. b. Microscopia a 10x. c. Microscopia a 40x. d. Microscopia a 100x. Fuente: Conejo de experimentación de la tesis doctoral.

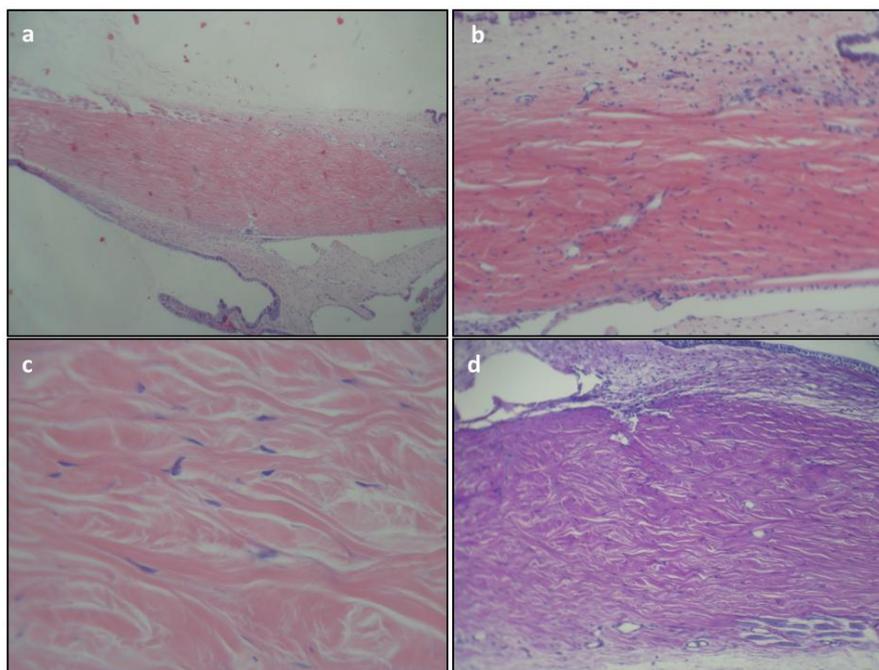


Figura 13. Limbo de ojo de conejo. a. Microscopia a 4x, estructuras que conforman el limbo. b. Microscopia a 10x. c. Microscopia con PAS a 100x. d. Microscopia a 10x. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López

En algunas características, el ojo de humano es similar al del conejo por ejemplo en su diseño general, pero en algunos aspectos es diferente. A continuación, se mostrará las similitudes y diferencias de las características generales entre los ojos humanos y conejo con enfoque dirigido a las particularidades de la túnica ocular externa y los componentes involucrado en su funcionamiento y composición (6).

En cuanto a la ubicación orbitaria el ojo humano se localiza en la órbita con una separación entre la línea media y la pared laterales que forman un ángulo de 30 grados, ubicando ambos ojos en la región centro-facial, mientras que las órbitas de los conejos están colocadas a 85 grados permitiendo una mayor amplitud del campo visual. Los globos oculares están ubicados dentro de la órbita humana haciendo que los párpados cierren la cavidad, mientras que en esta especie animal son prominente logrando una rotación que abarque una superficie territorial de evaluación más compleja (ojo usado en anatomía del globo ocular y esclera) (6).

Características anatómicas	Humano	Conejo
Órbita		
Número de Paredes	4	5
Presencia de cartílago	No	Si
Eje de visión lateral	85°	120°
Globo ocular		
Medida anteroposterior (mm)	24,0 – 26,0	17,0 - 18,5
Medida del ecuador (mm)	23,5	14,5 – 16,5
Córnea		
Eje vertical (mm)	11	11,5 - 14,0
Eje horizontal (mm)	11,7	12,5 – 14,0
Grosor	0,5-0,6	0,3 – 0,5
Esclera		
Grosor		
Próximo al limbo (mm)	0,8	0,4
En el ecuador (mm)	0,4 – 0,6	0,2
Posteriormente (mm)	1,0	0,3
Inserción a los músculos extraoculares (mm)	0,3	0,2

Tabla 1. Anatomía comparada del globo ocular del conejo con atención a túnica externa fibrosa.

En cuanto a la forma del globo ocular en humano es mayor en su eje antero posterior y el conejo particularmente esférico con eje antero posteriores parecidos a los diámetros verticales y horizontales con un promedio de 17.5 mm. Mientras que el ojo humano tiene un eje de 23.5 mm el conejo en promedio tiene y ecuador 20 mm o menos (21).

En cuanto a la envoltura del globo ocular, ambas especies son similares ya que presentan tres túnicas, fibrosa externa constituida por la córneo-escleral, la úvea y la retina, el contenido es muy similar en componentes aun cuando difieren en tamaño y algunas variantes de su organización. La especie evaluada se caracteriza por no mostrar pigmento haciendo transparente la mayor parte de sus estructuras mientras que el humano la úvea es muy pigmentada e impregna de pigmento las estructuras adyacentes (21, 22).

El cristalino animal y humano tiene el mismo diámetro de 10 mm en promedio mientras que el grosor del humano es de 4 mm y en el conejo es de 7 mm. No obstante, el cristalino en el humano ocupa una posición más anterior, mientras en el conejo es más central y grueso. Entonces, el cristalino del conejo ocupa más espacio del contenido

total del globo ocular. Por otra parte, la cámara anterior es más estrecha y desplazada anteriormente por el cristalino, siendo en el humano más profunda por protrusión anterior de la córnea que le confiere mayor capacidad dióptrica central. La cavidad vítrea en ambas especies el vítreo es transparente y gelatinoso y ocupa todo el espacio retrolental (21, 22).

Las características vasculares son similares pues la vascularización intraocular en el humano va a tener varios vasos aferentes como son arteria central de la retina, las arterias ciliares cortas, arterias largas y las arterias musculares perforantes y el conejo su vascularización se origina y distribuye en las estructuras oculares de la misma forma (23).

El globo ocular es movido por los músculos extraoculares, que se insertan en sus capas externas. en el humano se insertan los cuatro rectos por delante del ecuador y los oblicuos por detrás, mientras que en el conejo están colocados delante del ecuador y al tener un diámetro antero posterior inferior, tiene un mayor campo de rotación (24).

La córnea en ambos especímenes es arqueada en su forma, mientras que el radio de curvatura de la córnea de conejo es mayor que la del humano. La disposición de sus capas en la córnea de conejo la membrana basal del epitelio es delgada similar a cualquier membrana basal, no así con la córnea humana llegando a formar una membrana densa que recibe el nombre de membrana de Bowman (21).

La esclerótica debe proporcionar suficiente elasticidad para resistir cualquier fluctuación. En la presión intraocular. Estos requisitos se cumplen mediante una matriz de tejido conectivo de muchas laminillas superpuestas de ramificación, cada una de las cuales consta de fibrillas de colágeno de diámetro variable, establecido en alineación paralela y en el humano las disposición de las fibras varían las anteriores a los músculos se disponen paralelas y circunferenciales y las posteriores en óvalos abiertos en forma de balón de fútbol (6, 25).

El conejo y la esclerótica humana se componen de una serie de superposiciones, ramificaciones y entrelazando las laminillas, cada una formada por muchas fibrillas de colágeno en alineación paralela en algunas áreas. Poseen fibras de elastina muy

delgadas y escasas con algunos fibrocitos dispersos también se encuentran dentro de la esclerótica. El estroma se atraviesa en algunas regiones por vasos sanguíneos y estructuras neurales ampliamente espaciados entre los elementos. Se observó una considerable variación en el diámetro de las fibrillas de colágeno escleral, tanto regionalmente en cualquier nivel y también entre diferentes niveles dentro del tejido. En el conejo, las fibrillas en el estroma externo oscilaron entre 75 nm y 220 nm, mientras que el estroma interno las fibrillas generalmente contenidas de menor diámetro, 81 nm en promedio, con un tamaño más estrecho distancia. En la esclerótica humana, las fibrillas exhibieron un tamaño general más pequeño y oscilaron desde 58 nm a 160 nm en el exterior, y de 50 nm a 76 nm en las láminas internas (25). En el estroma escleral humano, las fibrillas de colágeno individuales son en promedio más finas y más densamente empaquetado que en las regiones correspondientes de la esclerótica en el conejo (23).

El ojo de conejo es la mejor opción para la investigación oftalmológica humana; el animal es dócil, fácil de tratar, disponible y en numerosos tamaños. Todas estas razones que ofrecen tranquilidad. El ojo de conejo ha demostrado ser beneficioso para la evaluación de cada una de las nuevas tecnologías, así como la cirugía oftalmológica. El conejo blanco de Nueva Zelanda (NZW) Se utiliza regularmente en evaluación de cirugía oftalmológica. (26)

3. Patologías de la esclerótica susceptibles de tratamiento sustitutivo

El ojo posee mecanismo de defensa contra las agresiones externas que se pudieran presentar. Este puede soportar la inflamación hasta cierto grado. Las inflamaciones producidas por mecanismos inmunitarios pueden causar daños en el globo ocular. Se considera como mecanismo evolucionario logrado mediante la selección natural la inflamación limitada que se expresa en el ojo. La respuesta inmunitaria que producida en el ojo es similar a las de otras mucosas del organismo (27).

La conjuntiva tiene una función fundamental en la inmunidad, ya que sirve como barrera. Este posee vasos sanguíneos y canales linfáticos que llevan a las células del sistema inmune. Se pueden encontrar células principalmente dendríticas (Langerhans y

no Langerhans), células T, células B, linfocitos, mastocitos y neutrófilos. Los linfocitos T son los principales actores en casos de reacciones de hipersensibilidad o citotoxicidad. Puede encontrarse células plasmáticas en las glándulas lagrimales (27). Las células plasmáticas utilizan como inmunoglobulina principal la IgA, la cual es un componente excretado en la lámina de lágrima, ejerciendo la función de cubrir los receptores superficiales que pudieran ser puerta de entrada para virus y bacterias. Cuando se presenta un antígeno desconocido se activan la respuesta innata y la adaptativa. Las células T helper IgA estimulan los linfocitos B IgA para producir células plasmáticas secretoras de IgA, constituyendo el sistema de tejido linfoide asociado a conjuntivas y glándulas lagrimales (27).

Los mastocitos se encuentran predominantemente alrededor del limbo y la conjuntiva bulbar, estos liberan sustancias vasoactivas en respuestas a alérgenos y lesiones. Las lágrimas también poseen lisozimas para destruir la pared celular de ciertas bacterias. La inmunoglobulina G de las lágrimas puede neutralizar virus y bacterias y formar complejos inmunes, mientras que la lactoferrina es bactericida y bacteriostática (27).

Las enfermedades autoinmunes que pueden afectar a la conjuntiva son el penfigoide cicatricial, el pénfigo vulgar mediante reacciones de hipersensibilidad tipo 1 en enfermedades órgano específicas; el eritema multiforme y colagenopatías mediante reacciones de hipersensibilidad tipo 3 y 4 en enfermedades órgano inespecíficas. Estas enfermedades hacen que la capa fibrosa externa se afecte logrando trascender la conjuntiva (27).

La córnea central y periférica se diferencian en sus reacciones inmunológicas debido a que la córnea periférica está más cerca de los vasos sanguíneos, por lo que algunas inmunoglobulinas y células se encuentran a mayores concentraciones en la periferia. Lo cual convierte a la córnea periférica en un área más vulnerable frente a la inflamación y enfermedades. Por otro lado, la esclera obtiene sus nutrientes principalmente de la coroides. En esta área se utilizan como mecanismos de defensa inmunitarios las diferentes vías del complemento y se pueden encontrar linfocitos, macrófagos, células de Langerhans y neutrófilos que se activan si sucede alguna injuria al tejido (27).

El edema y las cicatrices alteran la transparencia de la córnea debido a que las reacciones inflamatorias producidas pueden alterar la disposición de sus fibras al tratar de regenerar el tejido dañado. Bacterias, virus, hongos y protozoos pueden producir queratitis, úlceras (Herpes, Acanthamoeba); o ampollas (queratopatía ampollosa) consecuencia del edema. En la córnea se producen los anillos de Kayser-Fleischer por depósito de cobre en la membrana de Descemet (28).

Por otro lado, están las llamadas degeneraciones no hereditarias entre las que se puede mencionar la queratopatía en banda calcificada en la cual se acumula calcio en la membrana de Bowman. La queratopatía en banda actínica por la alta exposición a rayos ultravioleta se produce elastosis en las capas exteriores. La pinguécula que suele producirse consecuente con la exposición solar por daño del colágeno. Mientras que las distrofias son hereditarias y entre estas se destacan, la distrofia de Reis-Bückler, afecta la capa de Bowman; la distrofia polimorfa posterior, afecta el endotelio. La distrofia endotelial de Fuchs, en la cual ocurre una pérdida de las células endoteliales provocando edema y ampollas corneales, logrando un aspecto de vidrio esmerilado y las distrofias estromales que ocasionan depósitos que dañan la transparencia de la visión (28).

La esclera es blanco de infecciones bacterianas (celulitis, escleritis), hongos (mucormicosis) o enfermedades autoinmunes o del tejido conectivo, destacando las vasculitis que suelen producir las enfermedades esclerales más graves. La inflamación crónica de la órbita conlleva a su fibrosis, infiltración por linfocitos, células plasmáticas y eosinófilos. La cicatrización de la esclerótica suele ser mala por su composición y puede sufrir adelgazamiento luego de períodos de inflamación o presión intraocular elevada (28, 29).

En la epiescleritis se inflama de manera súbita una región escleral, no se produce dolor, molestias, tumefacción, suele presentarse con hiperemia localizada y es un proceso autolimitado por lo general. Pero, no suele ser raro que en estos individuos se desarrolle con el tiempo algún trastorno autoinmune con afectación más profunda y extensa del ojo (30). Por ejemplo, la artritis reumatoide con depósito de inmunocomplejos y la granulomatosis de Wegener pueden llegar a producir necrosis (28, 29).

3.1. Afecciones traumáticas

Hay diversos tipos de heridas traumáticas que puede sufrir el globo ocular dependiendo del tipo de golpe o injuria que se haya presentado. Es muy importante un adecuado diagnóstico y tratamiento para poder preservar el órgano visual. Existe la clasificación de traumas oculares de Birmingham para estandarizar las lesiones y permitir un rápido diagnóstico, sin diagnosticar las lesiones específicas (Figura 14) (30).

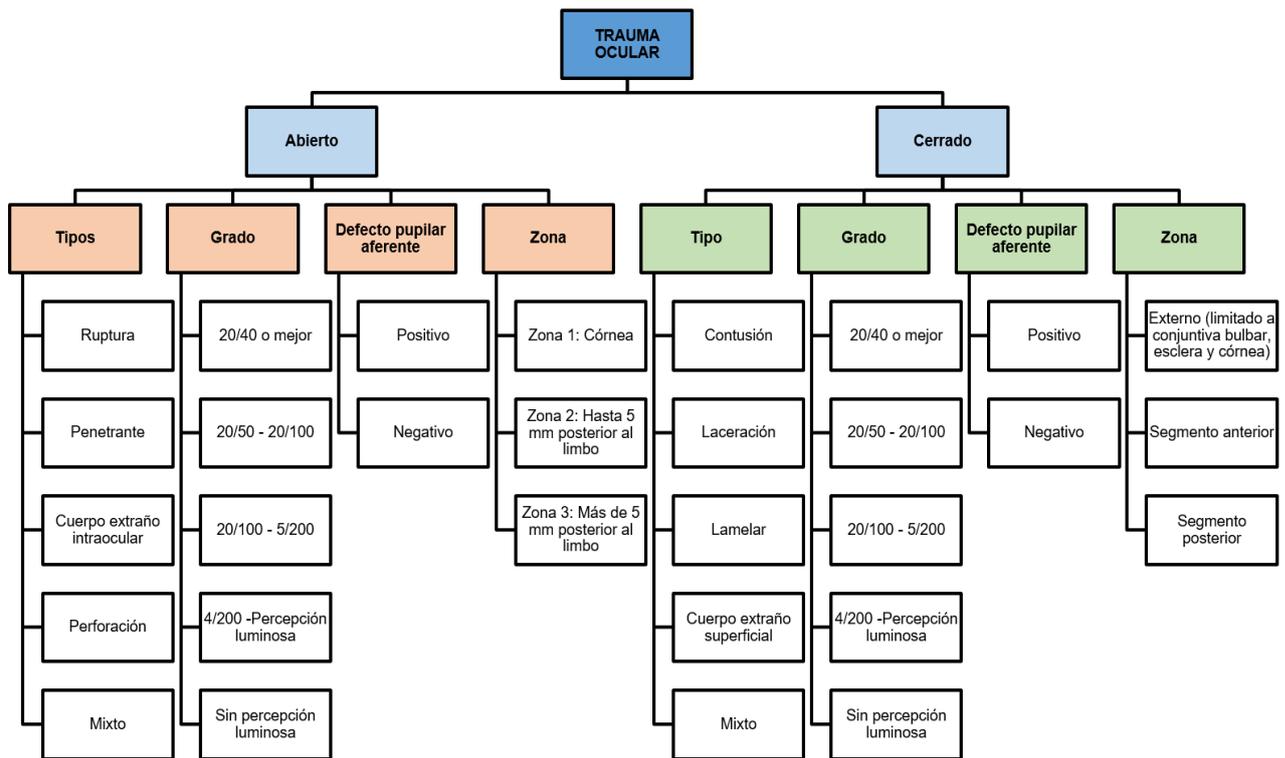


Figura 14. Clasificación de Birmingham del trauma ocular. Fuente: Kuhn F, Morris R, Withersponn D, Heinmann K, Jeffers JB, Treister G. A standardized classification of ocular trauma. Ophthalmol. 1996;103(2):240-3. (30)

Están los traumas contusos, originados por lo general por un objeto romo que causa un golpe contusional que puede afectar el ojo en diferentes grados. Este trauma ejerce una compresión del globo que al volver a su forma inicial complicará en mayor grado el trauma, es frecuente que suceda en accidentes de tránsito, domésticos o agresiones físicas. Se dividen en contusiones cerradas o abiertas dependiendo de si hay rotura de las membranas o no, entre estas últimas suceden con más frecuencia: los desgarros de la conjuntiva, las úlceras corneales, la iridociclitis, hematócornea, el hifema, el glaucoma

postraumático, las luxaciones del cristalino, las cataratas traumáticas, hemorragia vítrea y la conmoción o desprendimiento retinal (31, 32).

Los traumas penetrantes pueden dañar de manera importante la anatomía del globo ocular. Son causantes de laceraciones tisulares o heridas penetrantes. Debido a estos la córnea puede ser víctima de laceraciones simples, mayores o estrelladas, heridas con prolapso de iris, daño del cristalino o pérdida del vítreo. Por otro lado, pudieran estar presentes aunque en menor frecuencia lesiones esclerocorneales con prolapso uveal o no, pudiendo ser irreparables en ciertos casos (Figura 15) (31).

En el segmento anterior del ojo se pueden presentar como complicaciones: la iridodiálisis; el hipema; la hipotalamia; el cristalino puede sufrir cataratas, luxaciones, roturas y reabsorciones; el desprendimiento del cuerpo ciliar; y crecimiento epitelial que puede llegar a formar quistes o tumoraciones. En el segmento posterior son frecuentes las hemorragias o tractos hemorrágicos del vítreo, encarceración del vítreo en el área de entrada de la herida, desprendimiento de retina, de la coroides o pliegues esclerales por el colapso que sufren las paredes al ser descomprimidas repentinamente (33).



Figura 15. Trauma ocular. a. Trauma penetrante inferonasalesclerocorneal con úvea abocada al defecto. b. Trauma ocular abierto corneoescleral. 3 mm por dentro de la córnea hasta 2.5 mm por fuera, hipema y edema corneal. c. Herida penetrante que incluye desde el eje visual hasta 4 mm por fuera de ella, en sentido horizontal. d. Herida escleral arqueada a 2.5mm del limbo, hemorragia subconjuntival. (Zona 2 del trauma). Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

En el examen clínico resulta importante tomar en cuenta ciertos signos en la evaluación del trauma ocular con involucro escleral. Estos signos pueden ser de perforación escleral y signos de hipotonía ocular. Los signos de perforación escleral se dividen en directos, conformados por la pérdida de la continuidad de la pared ocular, e indirectos, dentro de los que se encuentran la incarceration vítreo o retiniana, el desprendimiento de retina perilesional, el hematoma coroideo, la hemorragia extraocular y la presencia vítreo extraocular (Figura 16) (33).

Por otra parte, los signos de hipotonía ocular son la protrusión del nervio óptico, el engrosamiento de la coroides, la presencia de pliegue escleral y el desprendimiento ciliar o coroideo. Estos hallazgos se pueden evidenciar en el estudio por imágenes del globo ocular, auxiliándose de la ecografía ocular (33).

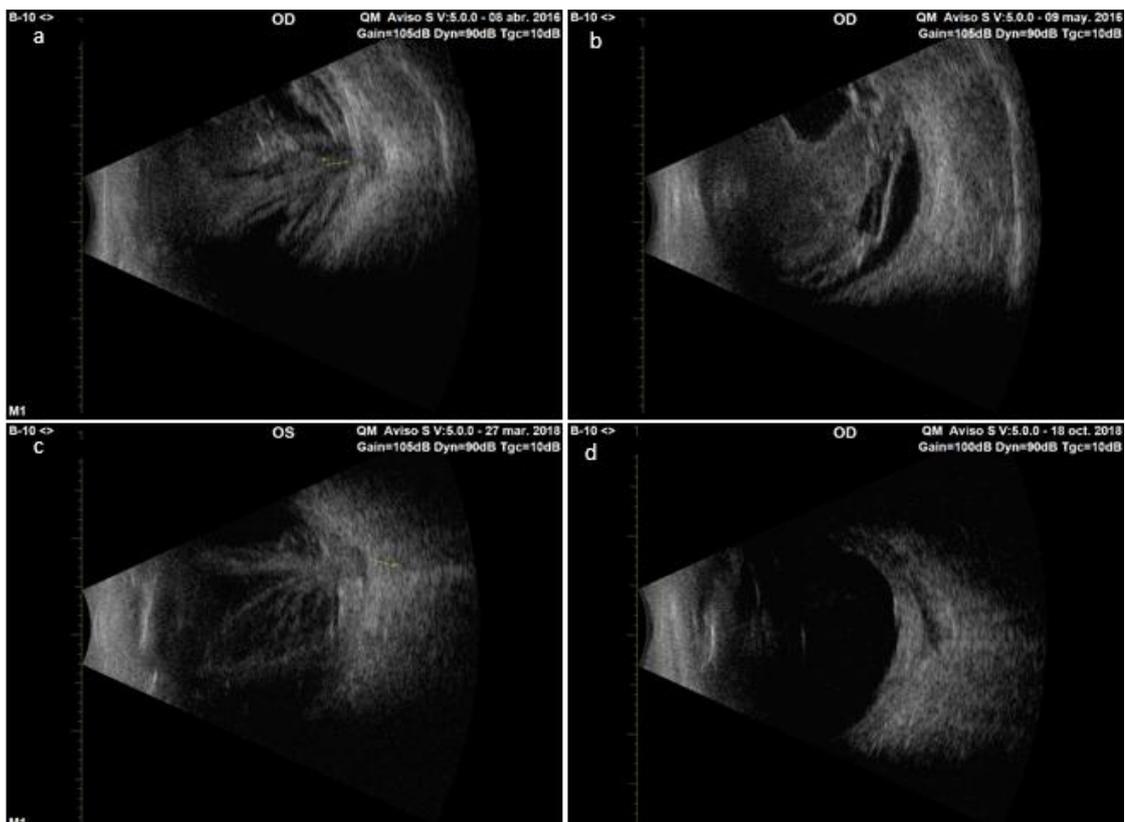


Figura 16. Evaluación por ecografía modo B de la perforación escleral. a. Incarceración vítreo. b. Incarceración vítreo. c. Incarceración vítreo. d. Ruptura escleral posterior con fluido periorcular. Fuente: Imagen cedida por la Dra. Suheidy Gutiérrez, ecografista ocular, Centro Cardio-Neuro Oftalmológico y Trasplante.

Las quemaduras químicas pueden darse consecuencia del contacto con sustancias ácidas o alcalinas, éstas últimas tienen un peor pronóstico debido a la licuefacción de las capas oculares y rápida penetración, mientras que los ácidos producen coagulación de las proteínas del ojo. Estos sucesos pueden conllevar a queratitis, glaucoma, cataratas, uveítis, perforaciones, entre otros (31).

Los cuerpos extraños pueden ser orgánicos o inorgánicos, imantables o no imantables, y dependiendo del daño que ocasionen externos si se encuentran en el párpado, conjuntiva, córnea o esclera; internos, si afectan el globo ocular en sus segmentos anterior o posterior o intraorbitarios. Se debe realizar la extracción debida del cuerpo extraño. Cabe destacar, las fracturas orbitarias, siendo las más frecuentes las del piso orbitario. Este tipo de lesiones se pueden complicar con trombosis, fístulas o celulitis orbitaria (31, 32).

Las cicatrices del estroma corneal suelen producir fibrosis. Los neutrófilos llegan desde la película de lágrimas, los bordes lesionados se inflaman, los glucosaminoglucanos se desintegran en la lesión y se produce migración de fibroblastos para producir el colágeno necesario. La esclera debido a su alta complejidad estructural, molecular y su limitada capacidad de regeneración, no suele repararse por sí sola; en casos de injurias suele producirse tejido granular que proviene de la coroides y la epiesclera, la reparación espontánea es prácticamente imposible (10, 34, 35).

3.2. Afecciones neoplásicas

Un daño genético que conlleva a un desequilibrio de proto oncogenes y genes supresores de tumores, reguladores de la reproducción celular, suele ser aceptado como causa de mayor relevancia para la producción de una neoplasia. El ojo puede ser blanco de tumores benignos o, malignos como el melanoma de la conjuntiva (Figura 17). En los adultos el tumor maligno ocular más prevalente es el melanoma uveal y en niños el retinoblastoma, tomando en cuenta que en los adultos son más frecuentes los tumores metastásicos oculares, en este último grupo ganan en frecuencia el carcinoma pulmonar en hombres, el cáncer de mama en mujeres y los carcinomas digestivos (41).

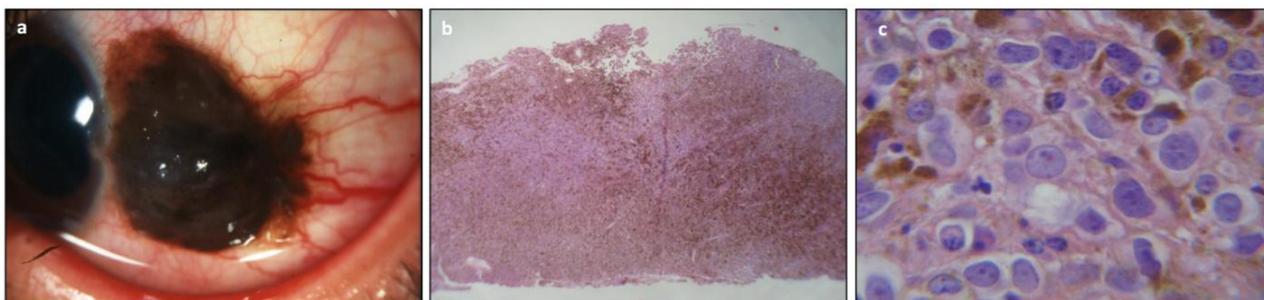


Figura 17. Melanoma conjuntival. a. Biomicroscopía de melanoma conjuntival (Imagen cedida por el Laboratorio de Patología Ocular, APEC, México). b. Vista microscopia 4x c. Vista microscopia 100x. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

Es importante resaltar que, por área, en los párpados es más frecuente el carcinoma basocelular; en la conjuntiva, el carcinoma epidermoide (Figura 18); en la glándula lacrimal, el carcinoma pleomórfico o los de origen linfoide; para el nervio óptico y la órbita son más frecuentes los gliomas; en las meninges que recubren el nervio óptico, el meningioma meningiotelial; en la infancia, el rhabdomyosarcoma; y en los adultos, el histiocitoma fibroso maligno (36).

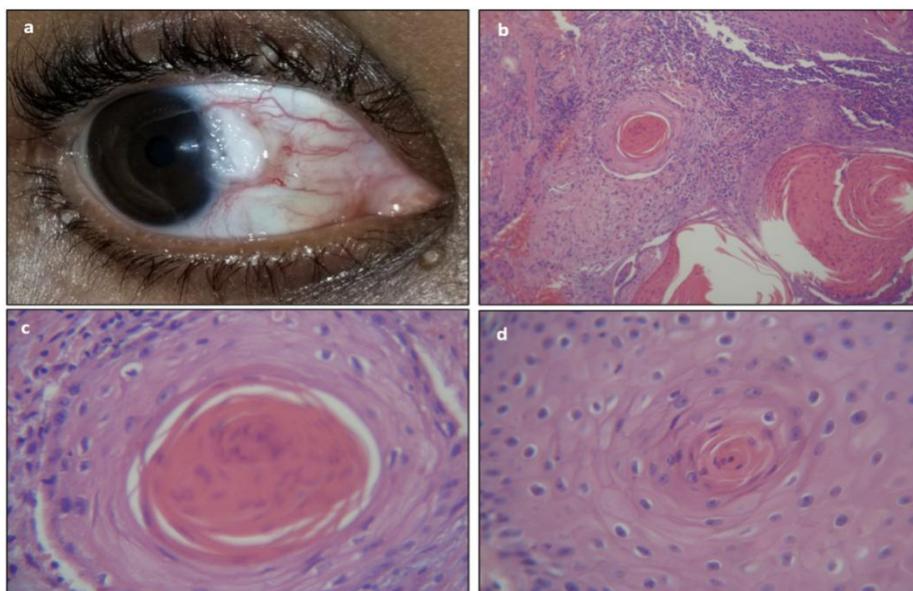


Figura 18. Carcinoma epidermoide de la conjuntiva. a. Biomicroscopía. b. Vista microscopia 10x c. Vista microscopia 4x. d. Vista microscopia 10x. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

Los tumores conjuntivales como el melanoma conjuntival y el carcinoma epidermoide (Figura 17 y 18) requieren escisión quirúrgica, pudiendo extraerse parte de la esclera con fines de obtener una pieza quirúrgica con márgenes libre de tumor. Consecuentemente, el adelgazamiento del área reseçada puede ser un foco de debilitamiento estructural del globo ocular (37).

El melanoma maligno coroideo es el tumor maligno intraocular más prevalente y es raro que se presente en la población general, pero son más frecuentes en individuos de raza blanca. Surgen de melanocitos pluripotentes del tubo neural y se identifican más frecuentemente en individuos de 60 a 70 años. Se clasifican en 5 grupos: tipo A de células fusiformes, tipo B de células fusiformes, fasciculares, de células epitelioides y mixtos (37).

El histiocitoma fibroso maligno es el tumor sarcomatoso más frecuente entre los 50 a 70 años de edad. Suele crecer como una tumoración solitaria, multilobulada, puede presentar necrosis, sangrado, metástasis y recidivas locales. Es frecuente que induzca fiebre y leucocitosis en los pacientes. Se suele dividir en tipos: pleomórfico verticilado, mixoide, de células gigantes, inflamatorio y angiomatoide. Es frecuente que surja post terapia de radiación de carcinomas mamarios, retinoblastomas, enfermedad de Hodgkin o mieloma múltiple (38).

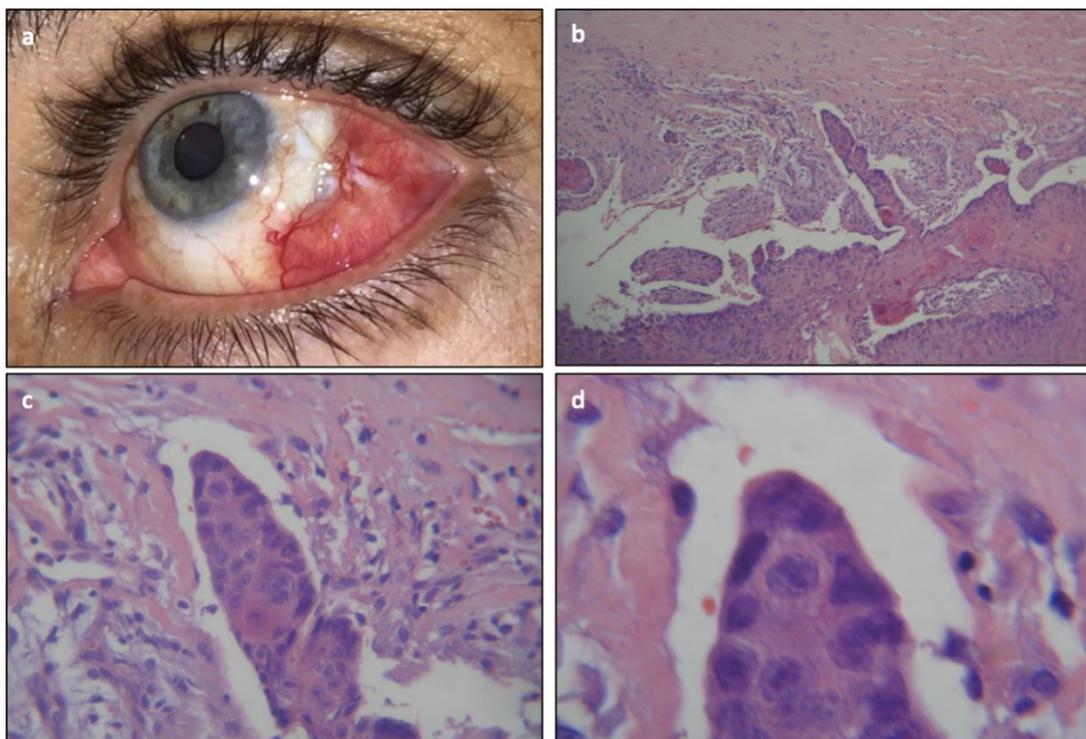


Figura 19. Carcinoma epidermoide de la conjuntiva con invasión escleral. a. Biomicroscopía. b. Vista microscopia 10x c. Vista microscopia 40x. d. Vista microscopia 100x. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

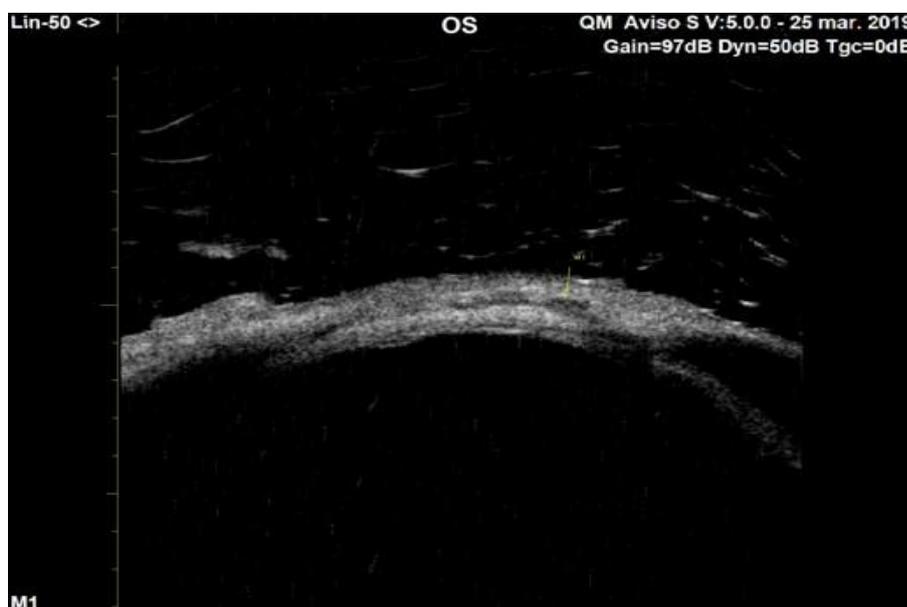


Figura 20. Carcinoma epidermoide de la conjuntiva. Ecografía ocular modo B con evidencia de invasión escleral del tumor. Fuente: Imagen cedida por la Dra. Suheidy Gutiérrez, ecografista ocular, Centro Cardio-Neuro Oftalmológico y Trasplante.

3.3. Afecciones inmunológicas

Las enfermedades sistémicas se asocian con escleritis en un 40 % a 50 % y en la mayoría de los casos son enfermedades autoinmunes (39). En los pacientes con epiescleritis un 3 % a 6 % tiene alguna enfermedad autoinmune del tejido conectivo, mientras que en aquellos con escleritis es mucho más frecuente, 10 % a 33 % de las personas con artritis reumatoide (AR). En las personas con artritis reumatoide se presentan nódulos epiesclerales solitarios y por lo general recurrentes en la misma ubicación (29).

Las escleritis pueden ser anteriores o posteriores de acuerdo a su localización (Figura 18). La escleritis puede ser la primera manifestación de la artritis reumatoide o una vasculitis y se puede presentar como enfermedad difusa, nodular o necrotizante, esta última consecuencia de la vasculitis producida, aunque también puede evolucionar entre estos estadios. La escleromalacia perforans es una condición en la cual hay pocos signos inflamatorios, ausencia de dolor y necrosis de la esclera, suele presentarse con más frecuencia en los pacientes con artritis reumatoide de sexo femenino, entre los 35 a 75 años. El globo se vuelve más frágil y propenso a las lesiones físicas (29).

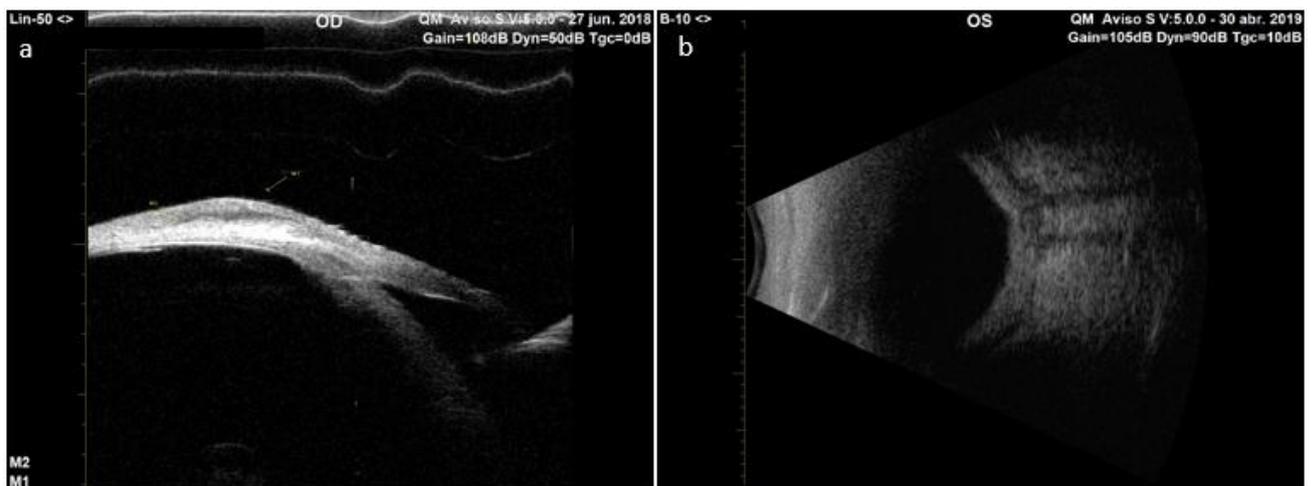


Figura 21. Escleritis. a. Ecografía ocular modo B de paciente con Escleritis Nodular anterior. b. Ecografía ocular modo B de paciente con Escleritis posterior: Signo de la T. Fuente: Imagen cedida por la Dra. Suheidy Gutiérrez, ecografista ocular, Centro Cardio-Neuro Oftalmológico y Trasplante.

Por otro lado, la córnea puede sufrir ulceraciones y necrosis central o periférica por los procesos vasculares envueltos (Figura 22.a). La presentación inicial periférica es rara, inicia con la aparición de áreas hinchadas y grises de pocos milímetros alrededor del limbo pudiendo llegar a causar una perforación. Mientras que la patología de inicio central o queratolisis es la afección corneal más severa que se puede presentar en la artritis reumatoide, es esencial cubrir el área afectada. La reparación se puede realizar con tejido conjuntivo, membranas amnióticas o escleras cadavéricas(29).

Por último, la escleritis posterior suele ser afectada por continuidad en los casos de artritis reumatoide, es infradiagnosticado y debe ser sospechado en los casos que se presente desprendimiento anular coroidal, pliegues coroidales, desprendimiento exudativo de retina y en casos con inflamación macular y de disco óptico (29). El tratamiento consiste utilizar supresores del sistema inmune, biológicos o no, antiinflamatorios no esteroideos, antihistamínicos y esteroides para evitar la reacción inflamatoria y su consecuente lesión ocular lo más antes posible (40).

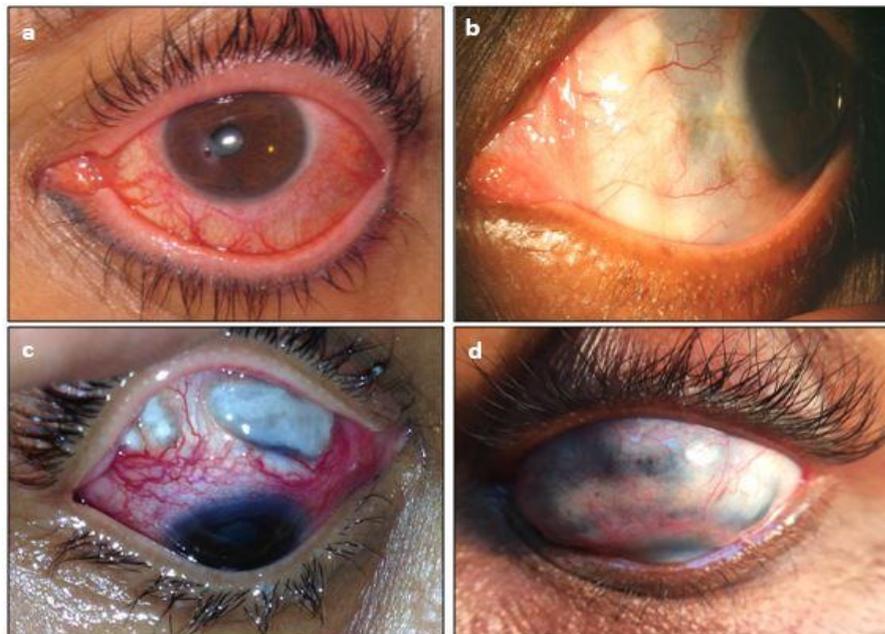


Figura 22. Afección escleral autoinmune. a. Perforación corneal autoinmune con datos inflamatorios esclerales intensos. b. Escleritis necrotizante inactiva zonal. c. Escleritis necrotizante activa. d. Escleritis necrotizante inactiva. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

El diagnóstico de la inflamación escleral es meramente clínico. En casos de uveítis crónica o necrotizante la esclera puede atrofiarse y consecuentemente puede producirse una protrusión de tejido uveal simulando una neoplasia. Por otro lado, la escleritis posterior suele presentarse con mucho dolor, pérdida de la visión e inflamación periocular. Los especialistas suelen auxiliarse de la ecografía para esclarecer el diagnóstico y descartar complicaciones (33).

La escleritis nodular o episcleritis circunscrita consiste en inflamación focal, primaria, necrotizante y granulomatosa. Son más frecuentes los nódulos únicos a los múltiples que tienden a resolverse espontáneamente. En estos casos es frecuente que los pacientes tengan artritis reumatoide activa y los nódulos son histológicamente parecidos a los nódulos reumatoideos. La escleritis necrotizante es una patología que causa adelgazamiento escleral hasta poder observar la úvea y se complican con perforaciones, estafiloma y herniación del tejido uveal. Suele asociarse con la granulomatosis de Wegener y presenta riesgo de recurrencias (38).

En los casos severos de escleritis necrotizante se produce destrucción de la esclera y córnea contigua (Figura 22.b-d). Esto sucede debido a la activación de las metaloproteinasas, enzimas con funciones proteolíticas que son reguladas por las citoquinas de los fibroblastos en la esclera, macrófagos y células T. por otro lado también actúa el factor de necrosis tumoral alfa, un inductor de las metaloproteinasas producido por las células plasmáticas. Se considera de manera general que esta enfermedad es causada por un desbalance entre estos factores (40).

3.4. Afecciones infecciosas

La esclera puede ser afectada por bacterias, virus, hongos y parásitos produciendo úlceras, pudiendo llegar inclusive a la ceguera total o pérdida del ojo, entre las más frecuentes están: la queratitis por *Acanthamoeba*, la queratitis micótica o por herpes simplex. El tratamiento consiste en evitar la cicatrización para que no suceda la opacificación de la córnea y el tratamiento erradicador del agente causal (28). El tratamiento suele retrasarse días o meses al igual que el diagnóstico y por lo general está precedido por una contaminación traumática o quirúrgica el ojo. Se encuentran en mayor riesgo aquellas personas con inmunodeficiencias (41).

El herpes zoster es una de las causas más frecuentes de escleritis y queratitis (Figura 23). Otras causas menos frecuentes son el *Treponema pallidum* y las *Pseudomonas*. La infección herpética debe ser sospechada en los casos de inicio agudo de los síntomas, dolor severo, afectación de un solo ojo y cuando se evidencia uveítis o queratitis (36). Otras causas raras de infección ocular son la tuberculosis pudiendo causar escleritis, coroiditis, vasculitis, es frecuente en pacientes que han estado en países en vías de desarrollo y pacientes con VIH o enfermedades sistémicas como la anemia falciforme, síndrome de Behcet, entre otras. Puede causar coroiditis multifocal, granulomas y abscesos en el globo ocular (33, 42).

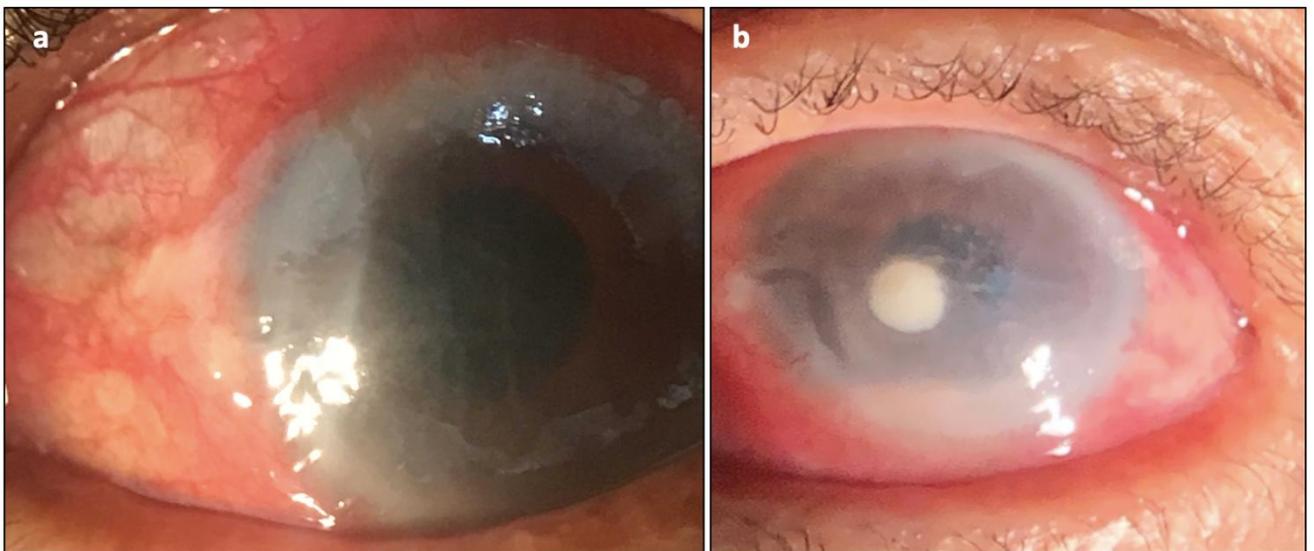


Figura 23. Escleritis secundaria a infección por herpes zoster. a. Cuadro inflamatorio de 15 de evolución con presencia de escleritis y queratitis. b. Absceso corneal asociado a escleritis con hipopion refractario a tratamiento. Fuente: Biblioteca Fotográfica Servicios de Oftalmología Dr. Gerson Vizcaíno López.

Las escleritis de causas infecciosas pueden presentarse con ciertos patrones de comportamiento. Los síntomas más comunes son el enrojecimiento, dolor y epífora; mientras que la escleritis necrotizante es la más común de sus presentaciones. La mayoría de las veces la causa es una contaminación por bacterias, destacando que en los países desarrollados las escleritis de causas fúngicas son algo más frecuentes, pero no más que las bacterianas. Las bacterias causan daño al ojo debido a que activan la vía del complemento. El agente etiológico de las escleritis bacterianas es la *Pseudomonas aeruginosa* (43).

Las escleritis infecciosas por *Staphylococcus aureus* suelen cursar con hipopion, polimiositis, adelgazamiento escleral focalizado y por lo general tienen un absceso en los miembros inferiores, debe pensarse en resistencia a la meticilina en casos que tengan una mala respuesta al tratamiento convencional. En niños y adultos con infecciones cardiovasculares, gastrointestinales, genitourinarias o articulares es más común encontrar *Streptococcus pneumoniae* como causa de escleritis. Esta última también suele ser frecuente en pacientes sometidos a cirugías de pterigión con exposición a radiación beta o mitomicina C (43).

La infección por tuberculosis puede causar microangiopatía, escleritis inflamatoria, inflamación granulomatosa no caseosa; suele presentarse en pacientes con alguna situación de inmunosupresión. La lepra lepromatosa suele causar daño unilateral, uveítis anterior granulomatosa y queratitis intersticial. La toxoplasmosis, enfermedad causada por el parásito *Toxoplasma gondii*, debe ser sospechada en caso de pacientes con escleritis en conjunto con retinocoroiditis, tomando en cuenta que es más prevalente en pacientes inmunosuprimidos (43).

Por otro lado, destacando las infecciones virales, han sido relacionados con daño corneal y escleritis el herpes simple y la varicela. Los pacientes con escleritis causado por herpes se caracterizan por ser mujeres adultas con dolor moderado a severo, la afectación suele ser difusa con desvascularización alrededor del limbo, adelgazamiento de la córnea periférica. Algunos casos pueden llegar a presentar uveítis y estos pacientes tienen un riesgo elevado de presentar pérdida de la visión que casos idiopáticos de escleritis (43).

Con respecto a las escleritis por hongos, estas se caracterizan porque tienen peor pronóstico en comparación con las bacterianas y virales, los patógenos más prevalentes son *Nocardia* y *Aspergillus*. Esta patología predomina en pacientes que viven en ambientes calientes, húmedos y que han sido sometidos a cirugía o trauma ocular. Se caracterizan por inflamación de la córnea en todo su grosor en conjunto que inflamación escleral en el área adyacente. Algunos casos muestran progreso de la afección a cataratas, desprendimientos de retina, endoftalmitis y evisceración, todo esto a pesar del tratamiento. Las infecciones por *Nocardia* son más prevalentes en pacientes agricultores (43).

4. Ingeniería tisular

La ingeniería tisular es la rama de la medicina encargado de la regeneración de tejidos y órganos. Se basa en utilizar manipular el microambiente celular para producir una proliferación de un tejido, proceso muy complicado porque se deben manejar un sin número de señales celulares endocrinas, paracrinas, autocrinas, de la matriz extracelular, estimulaciones físicas, entre otros. Para la producción de un tejido se utilizan fuentes alogénicas, aloplásticas o xenogénicas. Aunque algunos tipos tienen un uso limitado por la probabilidad de rechazo de parte del receptor. La ingeniería de tejidos es uno de los pilares de la medicina regenerativa y busca reducir la morbilidad y complicaciones en los pacientes. Consecuencia de las limitaciones de los trasplantes de tejidos y la escasez de donantes han aumentado las investigaciones en esta área, logrando cada vez tejidos más semejantes a los fisiológicos (44).

Para el sistema de señalización se deben implementar citoquinas, hormonas y factores de transcripción para incentivar la diferenciación de las células y su crecimiento. Estos pueden incluirse en el constructo tisular a implementar o añadirse a la matriz de este. Ciertas propiedades determinantes del constructo que deben tomarse en cuenta son la capacidad de carga, patrón de distribución de sustancias bioactivas, afinidad de unión, cinética de liberación, estabilidad y actividad biológica de las biomoléculas. Además, los constructos deben cumplir varios requisitos como biocompatibilidad, soportar la adhesión y proliferación de las células, poder incorporar factores inductivos, promover el crecimiento vascular, proporcionar integridad mecánica, permitir la degradación no tóxica de los componentes de desecho y poder ser manejados mediante técnicas de impresión 3D para crear tejido del tamaño necesario para suplir las necesidades prevalentes (44, 45).

4.1. Historia de la ingeniería tisular

La ingeniería tisular busca generar sustitutos bioartificiales con el fin último de que puedan ser utilizados para el tratamiento de diversas patologías. A pesar de que se considera una disciplina emergente, los primeros informes de su aplicación remontan del año 3000 a.C. ubicados en los escritos de Sanscrit de la India, tratando los injertos

de piel. Posterior a esto, en 1794 se reportan el uso de injertos de piel autólogo en Europa, siendo en 1881 donde se incluyen los injertos cadavéricos de piel (46).

En el Siglo XX, con la introducción del microscopio y el estudio celular con mayor detalle, para 1949 se estudió la criopreservación de las células con temperaturas inferiores al 0°. En la década de 1970, un ortopeda pediátrico realizó experimentos no exitosos para generar nuevo cartílago a partir de condrocitos implantados en ratones (47). No obstante, no fue hasta 1987 donde el término "Ingeniería Tisular" fue por primera vez acuñado (46). En 1991, un niño con síndrome de Poland en el Hospital de Boston fue el primero en recibir un tejido sintético cultivado con implante de condrocitos autólogos para reemplazar su ausencia de esternón (47).

En 1994 se formó la Sociedad de Ingeniería Tisular (TES) fundada por los doctores Charles A. y Joseph P. Vacanti en Boston. A esta sociedad se unieron las directivas de Asia y Europa, conformando la Sociedad Internacional de Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa (TERMIS) en 2005 (47). En 2006, se fabricó la primera vejiga bioartificial cultivada *in vitro*, que posteriormente fue implantada *in vivo* de manera exitosa (46). Paralelamente se han aplicado técnicas de ingeniería tisular para la creación de tejidos y órganos en las distintas áreas de la medicina.

4.2. Técnicas de ingeniería tisular

Un constructo ideal debe ser biocompatible y biodegradable, permitiendo a las células adherirse y proliferar, pero con una respuesta inflamatoria mínima. Este constructo debe permitir a las células reemplazarlo, sirviendo como andamio para su proliferación. Sus propiedades mecánicas y estructurales deben ser similares a las del tejido donde será implantando (48).

Dentro de los biomateriales se encuentran más utilizados los hidrogeles, los cuales son matrices de polímeros hidrofílicos. La cantidad de agua en el gel varía, estimándose que pueden absorber hasta miles de veces su peso seco. Estos andamios poseen poros y su ambiente acuoso protege las células a su alrededor. Los hidrogeles son ampliamente utilizados en modelos para Ingeniería tisular por ser biocompatible. Su aplicabilidad va en aumento en la generación de múltiples tipos de tejidos. Además, se

ha implementado en la administración dirigida de drogas y diagnóstico por imagen. No obstante, las facultades mecánicas de los hidrogeles no son las óptimas, por lo que se han diseñado técnicas potenciadoras aplicando agentes físicos o químicos (49, 50, 51, 52).

La nanoestructuración consiste en un método físico por el cual se incrementa la resistencia y densidad de las fibras de un determinado biomaterial. Lo anterior es el resultado de compresión y deshidratación controlada (53).

En el área de la ingeniería tisular, los constructos más utilizados son los ortofosfatos de calcio, los cuales se han utilizado para tejidos óseos; el b-fosfato tricálcico (B-FTC), un tipo de cerámica biodegradable utilizado para tejidos óseos, ya que es reabsorbido por este, es famoso su uso en cirugías maxilofaciales; la hidroxiapatita, usado más comúnmente para defectos óseos por su alta adsorción. Por otro lado, está el vidrio bioactivo, son muy reactivos, aumentan la adhesión de las proteínas al material y se ha utilizado en procedimientos reconstructivos debido a que se une directamente a los huesos. Los polímeros naturales o sintéticos poseen como ventaja el reconocimiento biológico del organismo. Algunos ejemplos de los biopolímeros son el colágeno, matriz tridimensional porosa, de tejidos, hidrogel termosensible y las microesferas porosas. Por otra parte, existen constructos naturales minerales, vegetales o animales como la fibrina, el colágeno, la agarosa, el quitosán, el alginato, el ácido hialurónico, la seda, la gelatina, entre otros. Estos tienen la ventaja de ser biodegradables, bioactivos y fáciles de obtener (44, 45).

Destacando que el fin más común en la actualidad de la ingeniería tisular es la producción *in vitro* de tejidos autólogos para utilizarlos con fines terapéuticos y devolver funcionalidad al órgano y el individuo u organismo. En los últimos años, las investigaciones en esta área han tenido más auge debido a que la producción de tejidos autólogos reduce la transmisión de enfermedades e infecciones, presentan ausencia de rechazo autoinmune y reducen la morbilidad y mortalidad de los donantes de tejidos u órganos (45).

El grupo de ingeniería tisular de la Universidad de Granada logró generar en laboratorio un modelo de piel humana bioartificial. Esto fue posible tras el aislamiento y cultivo de

fibroblastos y queratinocitos, los cuales fueron combinados con un material de fibrina y agarosa para la generación de un modelo 3D de piel de espesor completo. Este modelo fue evaluado en ratones atímicos demostrando un alto grado de integración sin efectos adversos. A los 20 días tras el trasplante se observó la diferenciación en capas de la piel artificial en estratos basal, espinoso, granuloso y córneo. Sin embargo, no se formaron papilas, folículos, ni glándulas. Además, se demostró que al implantar el medio de fibrina-agarosa sin células epiteliales humanas en el ratón, sólo se formó un tejido epitelial de 2 a 3 capas pseudodistrófico, similar a la cicatrización del animal. Este estudio demostró que la combinación de células con el nuevo biomaterial de fibrina-agarosa permite la generación de un sustituto de piel humana en laboratorio con un alto grado de integración, biocompatibilidad y regeneración tisular (54).

La producción de mucosa oral mediante ingeniería tisular es un campo con mucha atención debido a que esta mucosa puede usarse dentro de la cavidad bucal y fuera como en córneas, conjuntiva, párpados, uretra o vagina. Se han producido utilizando como constructo el medio de fibrina-agarosa y sumergiendo los fibroblastos y queratinocitos de la mucosa oral en este. Logrando células con buena viabilidad y parecidas a las naturales (55).

4.3. Ingeniería tisular en oftalmología

Se han producido múltiples reemplazos de córnea de globo ocular y se han creado numerosas técnicas para su producción. Existen sustitutos artificiales que semejan a la córnea natural, pero no ha sido producido un sustituto natural que sea histológicamente igual al original. Los sustitutos corneales suelen implementar un cultivo en 3 dimensiones de 3 tipos diferentes de células corneales y biomateriales. En estas investigaciones han sido utilizados un sin número de sustitutos estromales, por lo general se prefieren transparentes y con una adecuada consistencia, pero que además permita la adherencia y crecimiento de las células corneales. Para la producción de córnea se han utilizado colágeno tipo 1 y fibrina como constructos. El colágeno tipo 1 ha sido utilizado para la producción de tejido humano, mucosa oral, córnea, entre otro. Pero, el colágeno es caro, tiende a encogerse cuando se le adhieren las células y es rápidamente degradado. La fibrina de origen humano también ha sido propuesta como sustituto estromal, destacando que es más barata, de fácil obtención y no tiende a

encogerse. La agarosa es otro material que se ha utilizado en hidrogel, pero se ha destacado porque en él las células crecen más lento que en otros medios (56).

Se han realizado cultivos tratando de producir las diferentes capas del ojo en diversos estudios. Estos tejidos se utilizan para investigaciones en el estudio de medicamentos, su permeabilidad, estudios de toxicidad medicamentosa, patologías o estudios de criopreservación, evitando el uso de animales completos. Se han realizado cultivos de células corneales utilizando la mezcla de fibrina-agarosa como sustituto estromal y utilizando células mesenquimales extraídas de la gelatina de Wharton logrando resultados deseables al analizar la histología y diferenciación de los tejidos (56, 57).

El glaucoma consiste en un conjunto de enfermedades que producen muerte de ganglios retinales causando pérdida de la visión y daño al nervio óptico. Puede ser mediado por aumento de la presión intraocular, trastornos isquémicos, autoinmunes o herencia. Como terapia de bioingeniería podrían utilizarse los injertos de células madre para inducir reparación celular. Otras opciones son activar estas células para que se diferencien reprimiendo o activando ciertos factores de crecimiento. Por otro lado, se ha explorado la opción de reemplazar ciertos tejidos nerviosos con tejido nervioso periférico para modificar la producción de señales inhibitoras. En investigaciones experimentales en animales se ha recobrado la funcionalidad del nervio óptico utilizando injertos de tejido nervioso periférico y se está investigando el uso de nanofibras autoensamblables para modificar las señales inhibitorias de los axones de nervios en regeneración (58).

Las patologías oculares son muy frecuentes en toda la población y amenazan de manera directa la calidad de vida. Estos tejidos tienen una capacidad de regenerarse muy limitada. Además, los trasplantes, aloinjertos, pueden producir rechazo del organismo y precisan terapia inmunosupresora para evitar su rechazo, sin contar la probabilidad de transmisión de agentes patológicos muy graves como el VIH o la hepatitis. Por esta y otras razones la producción mediante ingeniería tisular de tejido esclerótico, autólogo, supondría un gran avance en la medicina por su biocompatibilidad y integración (45).

La retinitis pigmentaria es un grupo de degeneraciones hereditarias de la retina con disfunción de los fotorreceptores y atrofia final. La presentación clínica de esta patología consiste en ceguera nocturna que suele surgir alrededor de la primera y segunda décadas de la vida, disminución del campo visual que comienza medialmente, fotopsias y cefaleas frecuentes. Al realizar un fondo de ojo se puede observar un disco óptico seroso y pálido, acumulaciones de pigmento alrededor de los vasos, atrofia coriocapilar en casos avanzados. Debido a la muerte de las células de la capa pigmentaria, los pigmentos residuales migran a la superficie (59, 60).

Actualmente, no existe cura definitiva para la retinitis pigmentaria. A pesar de esto, se ha demostrado que altos consumos de vitamina A y Omega 3 disminuyen la tasa de disminución de fotorreceptores, pero no hay evidencia que sugiera que retrase la pérdida de la vista. Se encuentran en etapa experimental tratamiento basados en terapia génica, trasplantes de células madre, trasplante de epitelio pigmentario y prótesis de retina electrónicas. También hay tratamientos enfocados en tratar el edema macular y las cataratas para evitar la pérdida de la visión, basados en la utilización de acetazolamida o triamcinolona intravítrea (59, 60).

Se han aislado células madre del ojo para producir células retinianas, principalmente las del cuerpo ciliar han dado buenos resultados produciendo fotorreceptores. Los problemas más importantes para conseguir un cultivo de células retinianas que pueda ser utilizado para trasplantar es la necesidad de una gran cantidad de células para restablecer la visión. Las investigaciones de trasplantes no demuestran que los injertos celulares puedan madurar hasta convertirse en fotorreceptores. Sin embargo, este es un campo prometedor de investigación debido a que los injertos pudieran ser una posible cura para las degeneraciones retinianas (61).

4.4. Diseño de esclera

Para el tratamiento de las lesiones esclerales que necesitan injertos se han realizado investigaciones para probar injertos autólogos de la cápsula de Tenon en conjunto con colgajos conjuntivales en individuos con escleromalacia post cirugía de pterigión encontrando buenos resultados. También se ha probado el uso de membrana amniótica, pericardio, dermis, duramadre, mucosa oral, fascia lata y esclera como

injertos para la reparación escleral. Utilizando como medio de desarrollo la ingeniería tisular se ha utilizado submucosa intestinal porcina lamelar debido a que es transparente en pacientes con glaucoma en conjunto con la implantación de dispositivos de drenaje, pero después de revisar la bibliografía existente no se encontraron investigaciones sobre la producción mediante bioingeniería de tejidos esclerales, razón por la cual los injertos cadavéricos siguen siendo el *gold standard* para estos trasplantes (59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66).

OBJETIVOS

Objetivo general: Generar y caracterizar un nuevo modelo biomimético de esclerótica bio-artificial basado en la utilización de biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados para la reparación quirúrgica de la pared ocular.

Objetivos específicos:

- Elaborar nuevos sustitutos de esclerótica bio-artificial con biomateriales de fibrina-agarosa nanoestructurados y biomateriales sometidos a entrecruzamiento químico con genipin y glutaraldehído de acuerdo con estándares de calidad preclínica.
- Generar un modelo animal de lesión y reparación de la pared de la esclerótica para la evaluación de sustitutos esclerales.
- Determinar la eficacia y grado de integración de los sustitutos escleróticos generados en el modelo animal mediante evaluación preclínica, técnicas histológicas, histoquímicas y análisis morfométrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales de laboratorio

Para esta investigación se utilizaron 18 conejos raza New Zealand machos, distribuidos en 6 grupos experimentales de 3 conejos cada uno. Los animales fueron mantenidos durante el transcurso del estudio en la Unidad Experimental de la Universidad Hospital Virgen de las Nieves de Granada en España. Los animales se mantuvieron con libre acceso a agua y comida en un ambiente de temperatura de 21 ± 1 °C luminosidad de 12 horas de luz/oscuridad controlada. Este estudio y proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética Local (ref. PI400/2016) y los procedimientos se realizaron siguiendo la normativa nacional y europea sobre el manejo y experimentación con animales de laboratorio (67).

6.2 Generación de biomateriales

Para la producción de biomateriales se siguieron protocolos previamente descritos por nuestro grupo de investigación (53, 54, 68). En primer lugar, se procedió a generar los biomateriales y posteriormente se procedió con la nanoestructuración de los mismos. Los sustitutos bioartificiales de esclerótica se elaboraron con hidrogeles naturales de fibrina-agarosa (HFA) (Figura 24). Para producir el HFA se mezcló 70 % de plasma humano (22.8 mL), 13.5 % de fosfatos amortiguadores (2.25 mL) (PBS, 0.1M) con un pH de 7.2 a 7.4 y 1.5 % de ácido tranexámico (0.45 mL). Esta solución fue mezclada con cloruro de calcio al 2 % (3 mL), para lograr la solidificación y 2 % de agarosa tipo VII (1.5 mL) (Sigma Aldrich). Como resultado de esta mezcla se obtuvo un volumen de 30 mL de hidrogel. Se mantuvieron las condiciones estándares de cultivo hasta que se logró la polimerización (53, 54, 68).

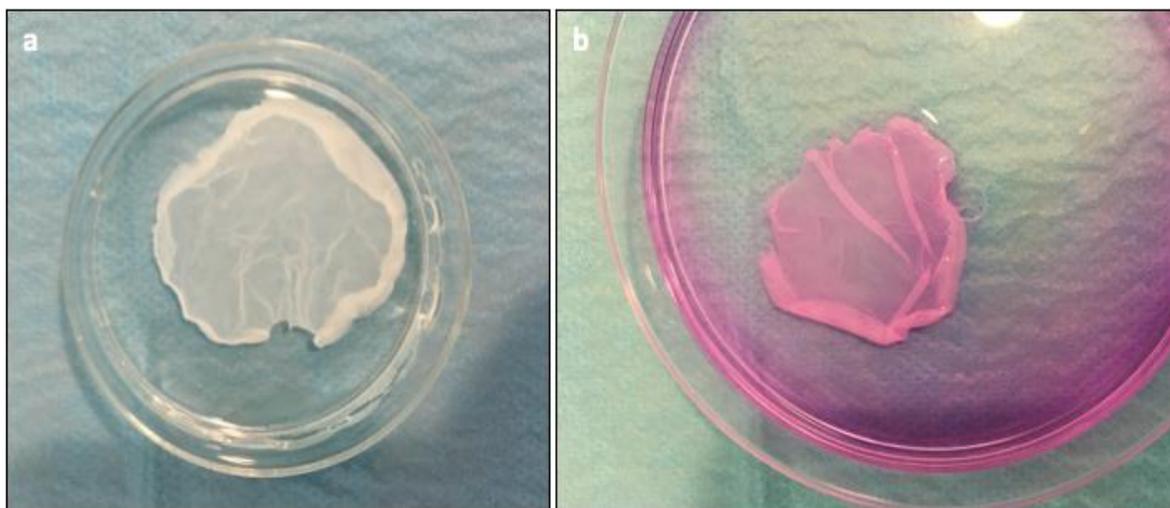


Figura 24. Biomateriales de FA. a. Constructos HFAN nanoestructurados en PBS. b. Constructos nanoestructurados en medio de cultivo para fibroblastos.

Para producir la nanoestructuración de los biomateriales, estos se colocaron en un par de filtros de nylon con poros de $0.22\ \mu\text{m}$ y papel absorbente Whatman. Posteriormente se procedió a la compresión de los biomateriales aplicando un peso uniforme de 500 gramos por 2.5 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo un HFA nanoestructurado (HFAN) de alta densidad con un espesor de 50 a $60\ \mu\text{m}$, y un 80 % de hidratación, compuesto por 70 % de fibrina y 0.1 % de agarosa, el cual fue utilizado en la reparación de los defectos esclerales (67).

En este proyecto, los HFAN fueron sometidos a la acción de los agentes químicos, genipin y glutaraldehído, para promover el entrecruzamiento de las fibras con la consecuente mejora de las propiedades biomecánicas (53, 54, 68, 69). En este sentido, los HFAN fueron inmersos en una solución de glutaraldehído al 0.5 % (HFAN-GA 0.5 %) o genipin al 0.1 % (HFAN-GP 0.1 %) de acuerdo a protocolos previamente descritos por nuestro grupo de investigación. La acción de los agentes químicos incrementaron significativamente la totalidad de propiedades biomecánicas, y su reacción cambió la consistencia y color de los hidrogeles generados (Figura 25)(70, 71).

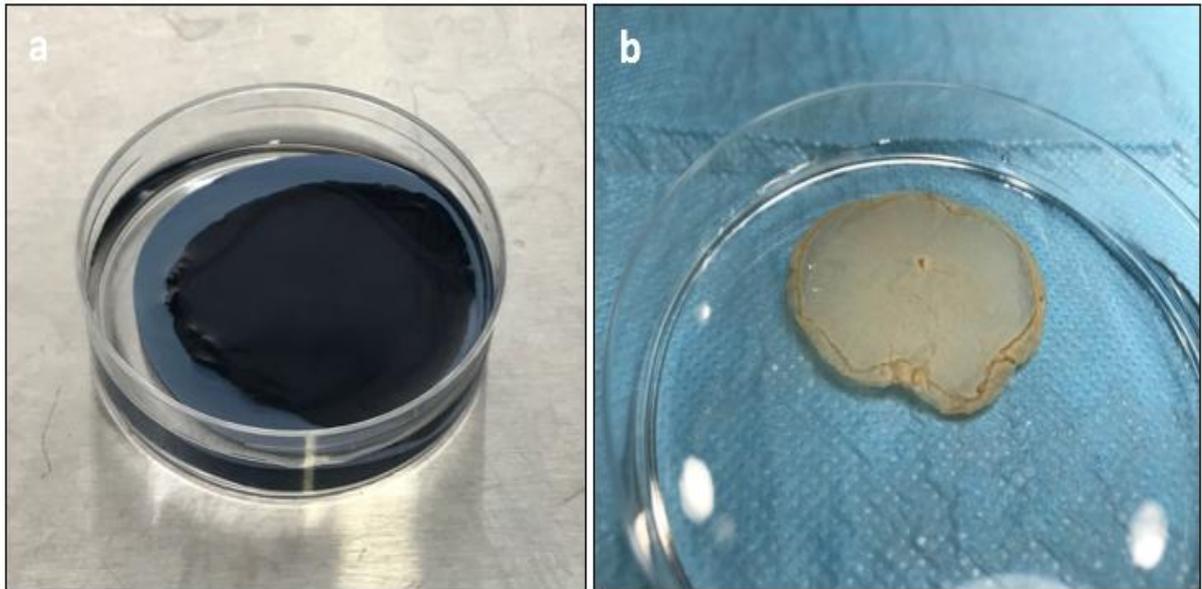


Figura 25. Generación de biomateriales. a. Fibrina-agarosa nanoestructurado con genipin. b. Fibrina-agarosa nanoestructurado con glutaraldehído.

Para el entrecruzamiento con glutaraldehído, este fue diluido en una solución de tampón fosfato (STF), y los hidrogeles fueron completamente inmersos en esta solución durante 72 horas. Posteriormente, los HFAN fueron profusamente lavados con una solución de PBS. Esta solución se cambió varias veces durante un periodo de al menos 24 horas. Finalmente, los HFAN fueron mantenidos en una solución de STF suplementada con un 5 % de solución de antibióticos (Sigma Aldrich, Alemania) durante al menos un periodo de 24 horas hasta su utilización (67).

El entrecruzamiento de los HFAN con genipin se realizó con una solución de este producto al 0,5% en STF durante 72 horas a 37 °C de acuerdo al protocolo recientemente descrito por nuestro grupo de investigación (70, 71). Al culminar el proceso de entrecruzamiento, los hidrogeles fueron profusamente lavados en STF durante 24 horas y mantenidos en una solución de STF suplementado con un 5 % de una solución comercial de antibióticos y antimicóticos hasta su implantación (67).

Los injertos de esclera cadavérica alogénicos, fueron obtenidos de conejos sacrificados. Durante las primeras horas del sacrificio se retiraron los globos oculares de las órbitas. Se procedió a eliminar los tejidos perioculares, conjuntiva, músculos y Tenon. Se cortó la estructura ocular en el eje antero posterior, el contenido y las capas internas fueron retiradas (cristalino, iris, cuerpo ciliar y coroides). Las dos calotas obtenidas, les fue

retirada la córnea incluyendo el limbo. Se procedió a lavar con solución PBS durante 24 horas con PBS suplementado con antibiótico al 5% (Sigma Aldrich, Alemania) luego se almacenaron a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta el momento de ser utilizados en el grupo de controles, donde se descongelaron. Una vez descongelados se colocaron en medio de cultivo DMEM suplementado con antibiótico y antimicótico (Sigma Aldrich) hasta su implantación (67).

Este proyecto de investigación, fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Granada de España. Los procedimientos experimentales *ex vivo* se llevaron a cabo en los laboratorios del departamento de histología y grupo de ingeniería tisular. Por otro lado, los análisis *in vivo* se realizaron en la Unidad Experimental del Edificio Licio de la Fuente del Hospital Virgen de las Nieves de Granada en España (67).

6.3 Cirugía

Para utilizar los sustitutos de esclerótica de manera terapéutica se diseñó un modelo animal de lesión y reparación escleral. En este sentido, se realizó una lesión en las escleróticas de los globos oculares izquierdos **en un total de 19 conejos machos, adultos, de la raza New Zealand** (Figura 27). Primero, los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular compuesta por ketamina (25 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg) y posteriormente se procedió a colocar el blefarostato y una gota de antibiótico pre- quirúrgico de gatifloxacino al 0.3%. Se expuso la región supero temporal, se realizó peritomía regional de 90 grados de la córnea desde hora 9 a hora 12. Se retiró conjuntiva y Tenon exponiendo la esclera. Utilizando un punch de biopsia de 5 mm de diámetro se llevó a cabo la esclerectomía a 1.5 mm del limbo esclerocorneal. En primer lugar se delimitó la zona de la lesión y se procedió a la profundización de la lesión y remoción del fragmento de esclera utilizando una tijera Wescott cortante. Las áreas expuestas evidenciaban la transparencia del contenido ocular para garantizar la profundidad del defecto realizado. Tomando en cuenta que las lesiones realizadas no fueron transmurales (Figura 27). Luego, se reparó la lesión quirúrgicamente, implantando discos de 5 mm de diámetro de los biomateriales nanoestructurados o aloinjertos escleróticos de cadáveres. En todos los casos, los biomateriales y aloinjertos fueron implantados utilizando cuatro puntos de sutura equidistantes con una sutura de nylon 10-0 (sutura colchonero simple). Luego se

procedió a cubrir la zona reparada con la conjuntiva con un punto de sutura con nylon 10-0 y aplicación de antibióticos de gatifloxacino a manera de profilaxis. Finalmente, se ocluyó el párpado de cada animal con una sutura de 6-0, la cual fue retirada a los 7 días posteriores a la cirugía. En este estudio los animales fueron divididos en 6 grupos experimentales con un n=3 en cada uno de ellos, como se detalla a continuación.

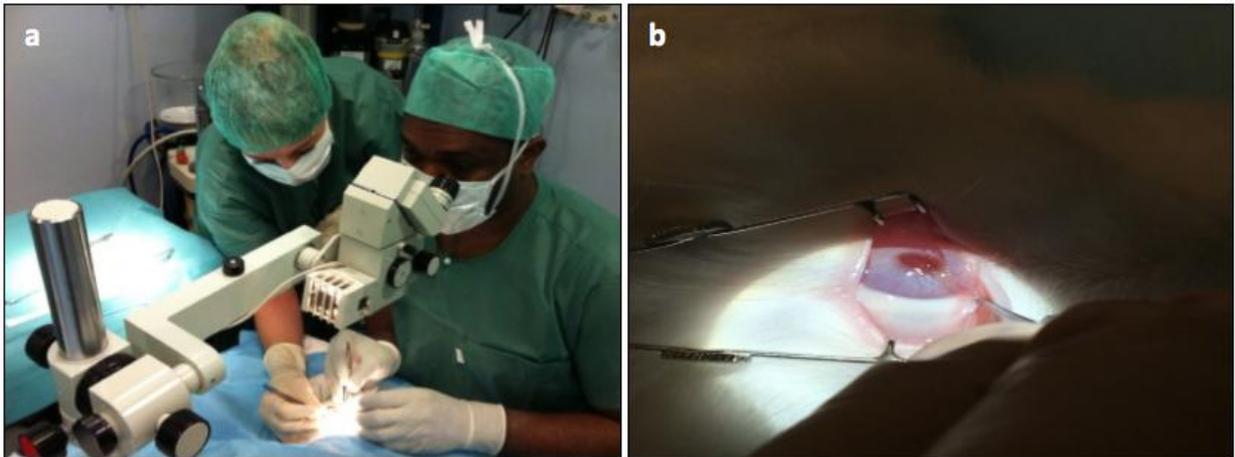


Figura 26. Realización del procedimiento quirúrgico. a. Abordaje quirúrgico. b. Conejo sin defecto escleral.

6.4 Grupos experimentales

Grupo control negativo (N-CTR)

En este grupo se realizó el defecto escleral como se detalló con anterioridad y este no fue reparado con ningún biomaterial. Sin embargo, el defecto fue cubierto por conjuntiva con un punto de sutura con nylon 10-0, y se colocó antibióticos tópicos. Finalmente, se procedió a la oclusión del párpado como se describió en el párrafo anterior.

Control clínico (C-CTR)

En este grupo control el defecto escleral fue reparado con un fragmento de esclera cadavérica, tal y como se realiza en clínica. Este método es el más utilizado y podría ser considerado el método *gold standard*. La esclera se obtuvo como se detalla en el punto 6.2, y se implantó siguiendo la metodología descrita en el apartado 6.3 Cirugía.

Hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurada (HFAN)

Conformado por 3 conejos, los cuales recibieron fibrina-agarosa nanoestructurada. Se utilizó el hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado (HFAN) que se obtuvo con plasma humano, amchafibrina y medio de cultivo antes descrito. Se lesionaron sus globos oculares y suturaron de la misma manera que en los grupos anteriores. Se implantó en el defecto una doble capa de HFAN de 5 mm de diámetro.

Hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurada con genipin (HFAN-GP)

Este grupo estuvo conformado por 3 conejos con implantes de fibrina-agarosa nanoestructurada con genipin al 0.1 % (HFAN-GP 0.1 %). Para evaluar estos sustitutos de esclerótica se realizó una lesión mecánica de esclerótica y suturas utilizando los mismos protocolos de los grupos anteriores. Se implantó un fragmento de 5 mm de diámetro del tejido producido con el HFAN-GP 0.1.

Hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurada con glutaraldehído (HFAN-GA)

Los 3 conejos de este grupo recibieron fibrina-agarosa nanoestructurada con glutaraldehído al 0.5 % (HFAN-GA 0.5 %). Para evaluar estos implantes se realizó una lesión mecánica y suturas de la manera antes descrita y se implantó una capa de 5 mm de diámetro de HFAN-GA 0.5 %.

Controles sanos (H-CTR)

Este grupo fue conformado por los ojos derechos de cada conejo de experimentación evaluado, en los cuales no se realizó ningún procedimiento siendo los casos controles, se analizaron 18 ojos derechos. A este grupo se le denominó control sano (H-CTR)(67).

Procedimiento Quirúrgico

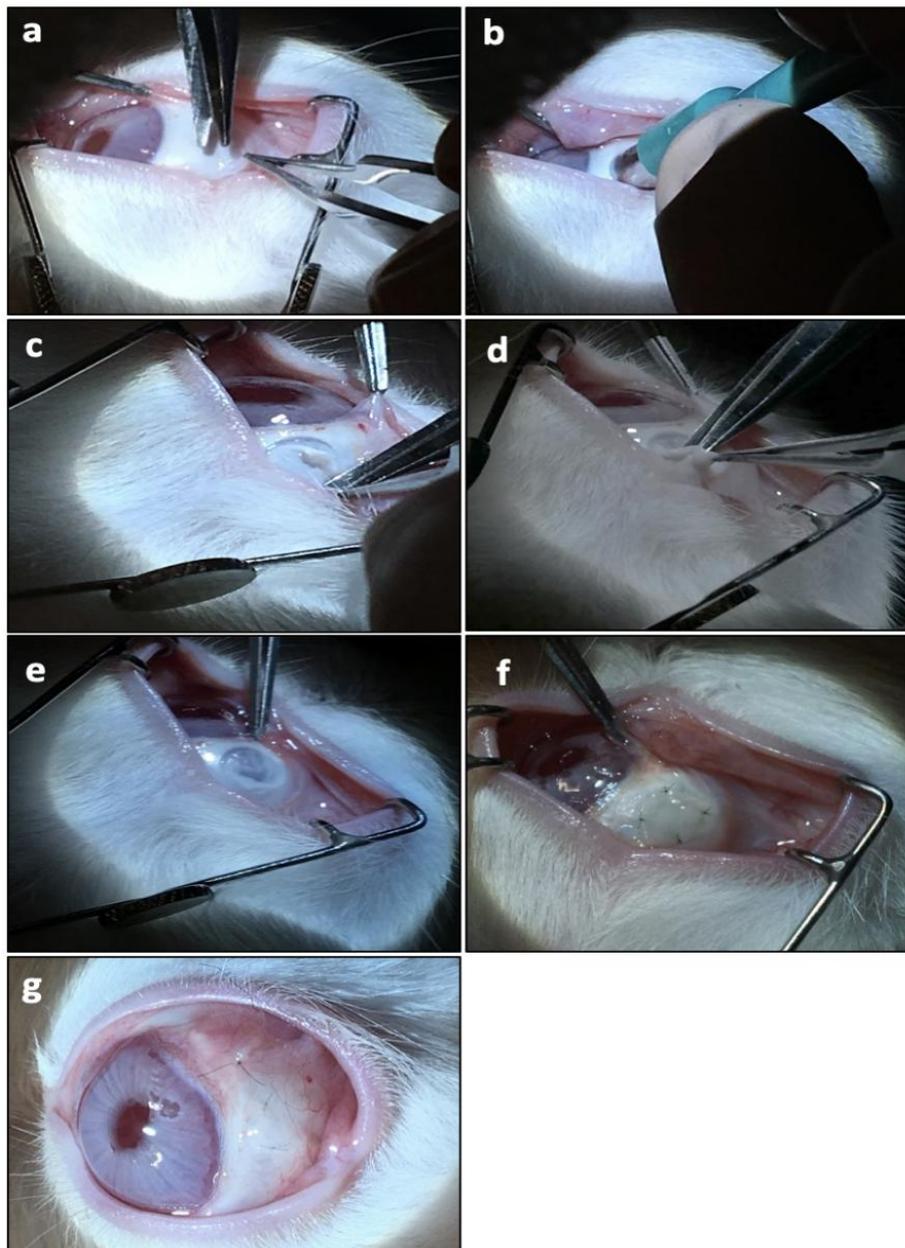


Figura 27. Procedimiento quirúrgico. a. Peritomía. b. Drepanación escleral. c. Retiro de tejido escleral. d. Esclerotomía. e. Exposición del defecto. f. Sutura del biomaterial. g. Sutura de conjuntiva.

Posteriormente a la cirugía los animales fueron mantenidos en la Unidad de Experimentación Animal bajo supervisión técnica y veterinaria. A los 40 días, posterior a la cirugía los animales fueron sometidos a una evaluación clínica y finalmente a un análisis histológico.

6.5 Análisis postquirúrgico clínico

Durante la reparación escleral se valoró durante el proceso de implantación de los diferentes tipos de injertos la facilidad para manejarlos, su estabilidad, adhesión, rigidez, elasticidad y facilidad para suturarlos, utilizando una escala del 0 al 5, siendo 0 la puntuación más baja y 5 la máxima. Después de 40 días de seguimiento general, los animales fueron analizados para evaluar la presencia de inflamación, rechazo delos injerto o procesos infecciosos relacionado con el globo ocular, especialmente el implante. También se valoró el edema, los defectos en las reparaciones realizadas, la presencia de deformaciones y la integración, rechazo o degradación de los injertos y biomateriales utilizados (67).

6.6 Histología

Para analizar el proceso de regeneración tisular, a los 40 días se sacrificaron los conejos con una sobredosis de anestesia y posterior inyección de cloruro de potasio intracardiaco. Se enuclearon los globos oculares sanos y operados, se fijaron por inmersión por 28 horas en formaldehido neutral al 4 % y en un contenedor de biopsias. Previa colocación de una aguja de 20 G en la cámara posterior y cámara vítrea de cada ojo para favorecer la fijación. Se analizó e identificó el grosor del parche escleral, la esclera subyacente, la esclera total y la esclera nativa en triplicados. Después de 24 horas, se disecó la zona de regeneración con márgenes amplios, se fijó por 24 horas adicionales, y se procesó para su análisis histológico convencional (67).

Las muestras fueron fijadas e incluidas en parafina (86), se seccionaron a 5 μm y se sometieron a los análisis histológicos. Se valoraron morfológicamente de manera general y se evaluó el grosor de manera rutinaria utilizando la tinción de hematoxilina-eosina. La matriz extracelular se evaluó utilizando los métodos histoquímicos de azul Alcian para proteoglicanos, y tinción de Schiff (PAS) para glicoproteínas. Las fibras de colágenos tipo 1 y 3, se evaluaron con las técnicas de tricromo de Masson y Picrosirius. Estos métodos se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos. Con el método de orceína se evaluó la neoformación y organización de las fibras elásticas. Los cortes realizados se fotografiaron con aumentos de 4X, 10X, 20X, 40X. Se siguieron

estos procesos de manera documentada y se realizaron bajo las mismas condiciones (72, 73, 74, 75).

6.7 Morfometría y estadística

En este proyecto, se determinó el grosor del injerto, la esclera adyacente y la esclera total utilizando la tinción de hematoxilina-eosina y la esclera sana como control. Las mediciones fueron procesadas con el programa ImageJ del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos. La morfometría se realizó en cortes histológicos procedentes de 3 muestras independientes de cada grupo (n=3), y se realizó un total de 10 mediciones por corte en dirección perpendicular a la superficie esclerocorneal. Finalmente, se calcularon las medias, desviaciones estándares y las variables fueron comparadas con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

7.1 Aspectos clínicos

El seguimiento postquirúrgico clínico evidenció que los tejidos producidos con ingeniería tisular permitieron la reparación exitosa de la lesión en la esclera. Destacando que en el grupo control negativo la lesión no se reparó completamente, evidenciándose daño macroscópico. Al realizar las cirugías se observó que los implantes provenientes de cadáveres no sufrieron complicaciones, fueron fáciles de suturar y manejar, pero se debe tomar en cuenta el mayor grosor a ser aplicado, dependiendo de la profundidad de la lesión. En este grupo los resultados fueron satisfactorios, pero los bordes irregulares entre el injerto y el tejido nativo eran muy visibles debido a su sobre elevación.

Al utilizar los injertos de HFAN se observó que eran muy elásticos, fáciles de utilizar y mostraban buenas propiedades adhesivas. Al realizar la evaluación después de 40 días de estos injertos (HFAN), los defectos en el área reparada eran invisibles. Por otro lado, al evaluar los injertos HFAN-GA, se encontró que presentaban mejor estabilidad y fragilidad en comparación con los injertos HFAN y tenían menos adhesión que los anteriores. Los injertos HFAN-GA demostraron ser más frágiles que los injertos cadavéricos. Al evaluarlos después de 40 días no era evidente la presencia de defectos en el área de la lesión.

Los injertos HFAN-GP demostraron más estabilidad que los HFAN, más fragilidad que los HFAN y C-CTR (cadavéricos), pero menor adhesión que estos. Los injertos HFAN-GP al ser evaluados a los 40 días eran notables en el área que fueron trasplantados debido a su color azul. Para evitar la ruptura de los injertos se tuvieron que manejar con suma cautela. Todos los resultados de este estudio fueron evaluados con puntuaciones semicuantitativas (Figura 28 y Tabla 2) (67).

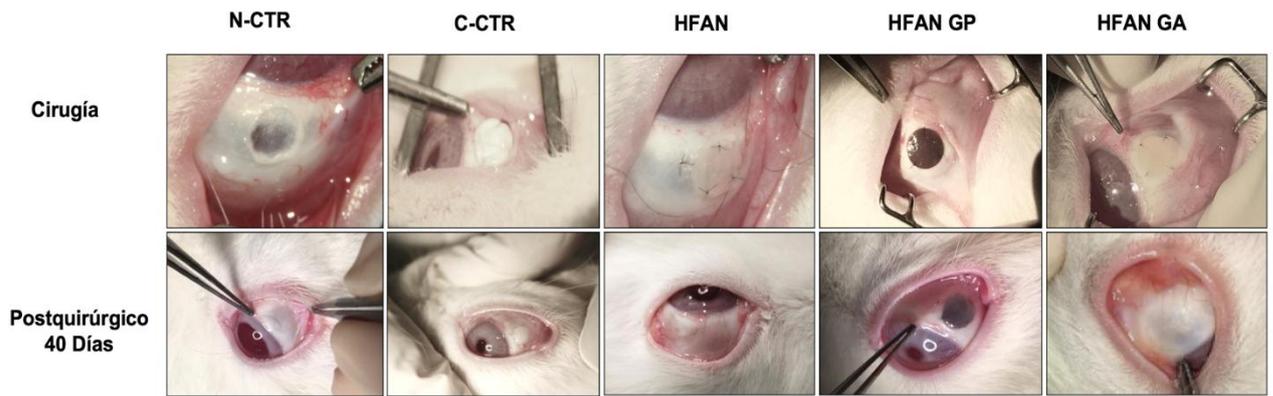


Figura 28. Imágenes macroscópicas representativas de los defectos esclerales y la reparación quirúrgica al inicio y 40 días postquirúrgico *in vivo*.

Biomateriales	Manejo	Estabilidad mecánica	Rigidez	Elasticidad	Adhesión	Suturabilidad
HFAN	4	3	3	4	4	3
HFAN-GP	5	3	4	2	3	3
HFAN-GA	4	3	4	2	3	3
C-CTR	5	5	5	1	2	3
Puntuación: 0-5; 0= puntuación mínima y 5= puntuación máxima						

Tabla 2. Propiedades de los biomateriales desde la perspectiva quirúrgica. HFAN: hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado; HFAN-GP: hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado con genipin; HFAN-GA: hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado con glutaraldehído; C-CTR: grupo control clínico (esclera cadavérica).

7.2 Regeneración tisular

En el grupo de control negativo, la tinción de hematoxilina eosina mostró que las lesiones producidas se encontraban parcialmente reparadas después de 40 días (Figura 29). Se observó el adelgazamiento de la pared ocular en el área lesionada y reparada. La parte externa de la lesión se encontraba cubierta por tejido conectivo, en vez de colágeno escleral. Al realizar las tinciones de Tricrómico de Masson y Picrosirius se mostró una reacción positiva en la pared escleral, pero al realizar la microscopia polarizada con la tinción Picrosirius se evidenció una organización irregular del colágeno en comparación con los globos oculares de injertos cadavéricos (Figura 30). La matriz extracelular no fibrilar evaluada con las tinciones azul alcian y PAS causaron una reacción débil positiva por los proteoglicanos presentes y ningún cambio muy importante en comparación con los injertos de cadáveres (Figura31).

Al evaluar los ojos con trasplantes cadavéricos, el área injertada era evidente a nivel macroscópico. El grupo de injertos cadavéricos tenía las paredes oculares engrosadas y los injertos no fueron integrados. A nivel histológico no se encontró evidencia de degradación o inflamación, pero se encontró una reacción a cuerpo extraño asociado a las suturas no reabsorbibles utilizadas. La matriz extracelular se encontraba organizada en láminas longitudinales con matriz interlamelar muy incrementada, siendo esta la causa del engrosamiento tisular ya mencionado. Se observó la organización de las fibras colágenas por hematoxilina eosina. La matriz extracelular presentó proteoglicanos en altas cantidades y no se observaron resultados positivos con el PAS (Figura 31).

Los injertos de HFAN repararon la pared celular de una manera comparable a los controles sanos. Destacando que no se encontraron biomateriales remanentes en el área. En la pared externa de los injertos HFAN se observaron algunos macrófagos alineados y se encontró reacción a cuerpo extraño alrededor de los materiales de sutura. Se encontraron fibras colágenas y proteoglicanos y glicoproteínas en moderación (Figura 29).

Con respecto a los injertos de HFAN-GA y HFAN-GP, ambos lograron reparar la pared celular y aumentar su grosor. Después de 40 días los biomateriales se encontraban presentes. Se encontró una reacción inflamatoria con macrófagos alineados alrededor de la superficie de los biomateriales y se encontraron linfocitos. Se identificó una pseudocápsula de colágeno alrededor de los biomateriales con las tinciones de Masson y Picrosirius, pero se encontró más desarrollada en el grupo HFAN-GP. Se encontraron proteoglicanos alrededor de los biomateriales y no se produjo reacción alguna con la tinción PAS (Figura 31).

HE

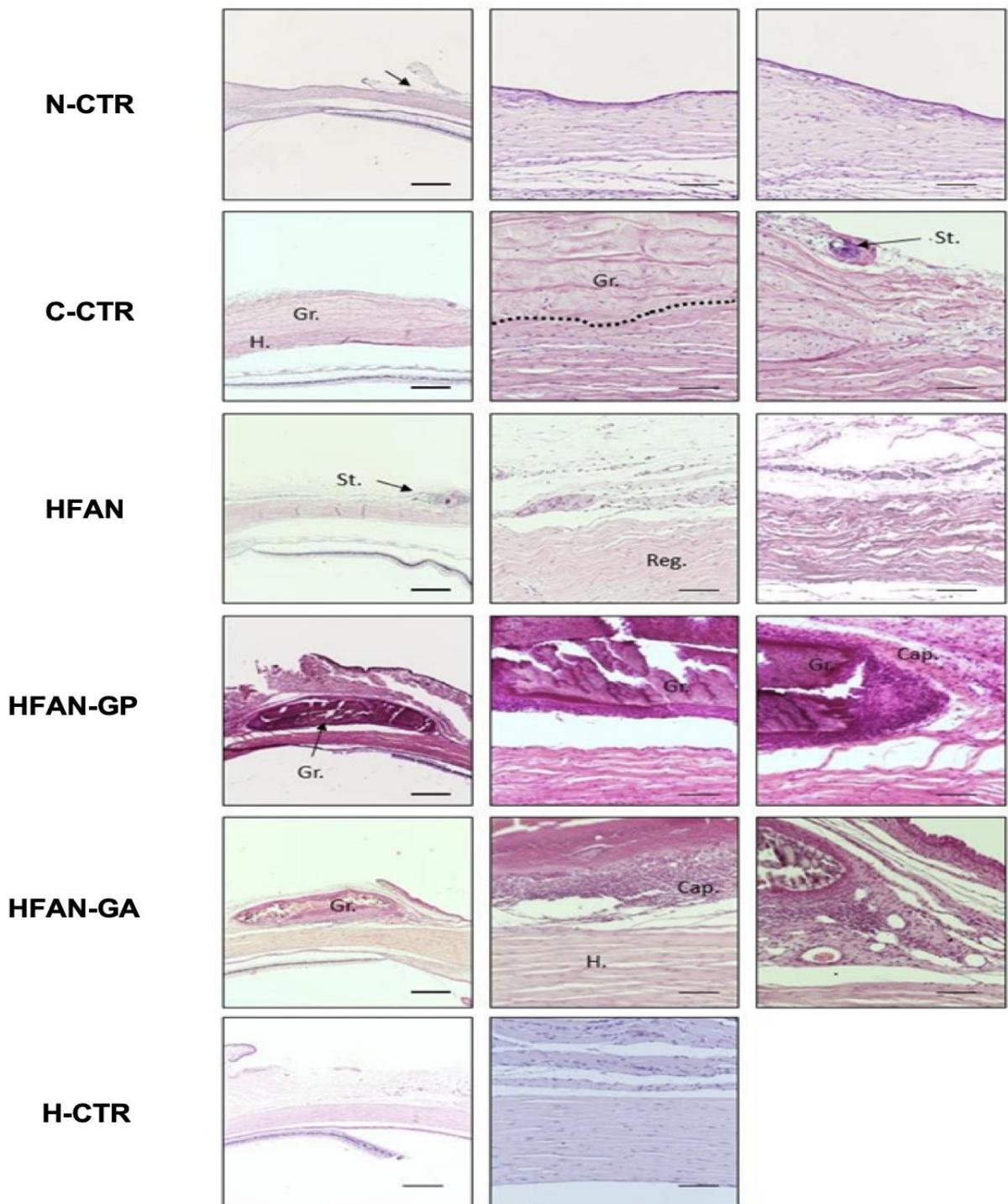


Figura 29. Histología de la esclera luego de la reparación quirúrgica con injerto alogénico y biomaterial. Flecha negra: borde; Gr: Injerto; St: sutura asociada a reacción inflamatoria; Reg: tejido de regeneración; Cap: cápsula alrededor de biomateriales entrecruzados e injertados. Escala de la barra: 500 μm en imágenes de baja magnificación y 100 μm para proporción moderada e imagen del borde.

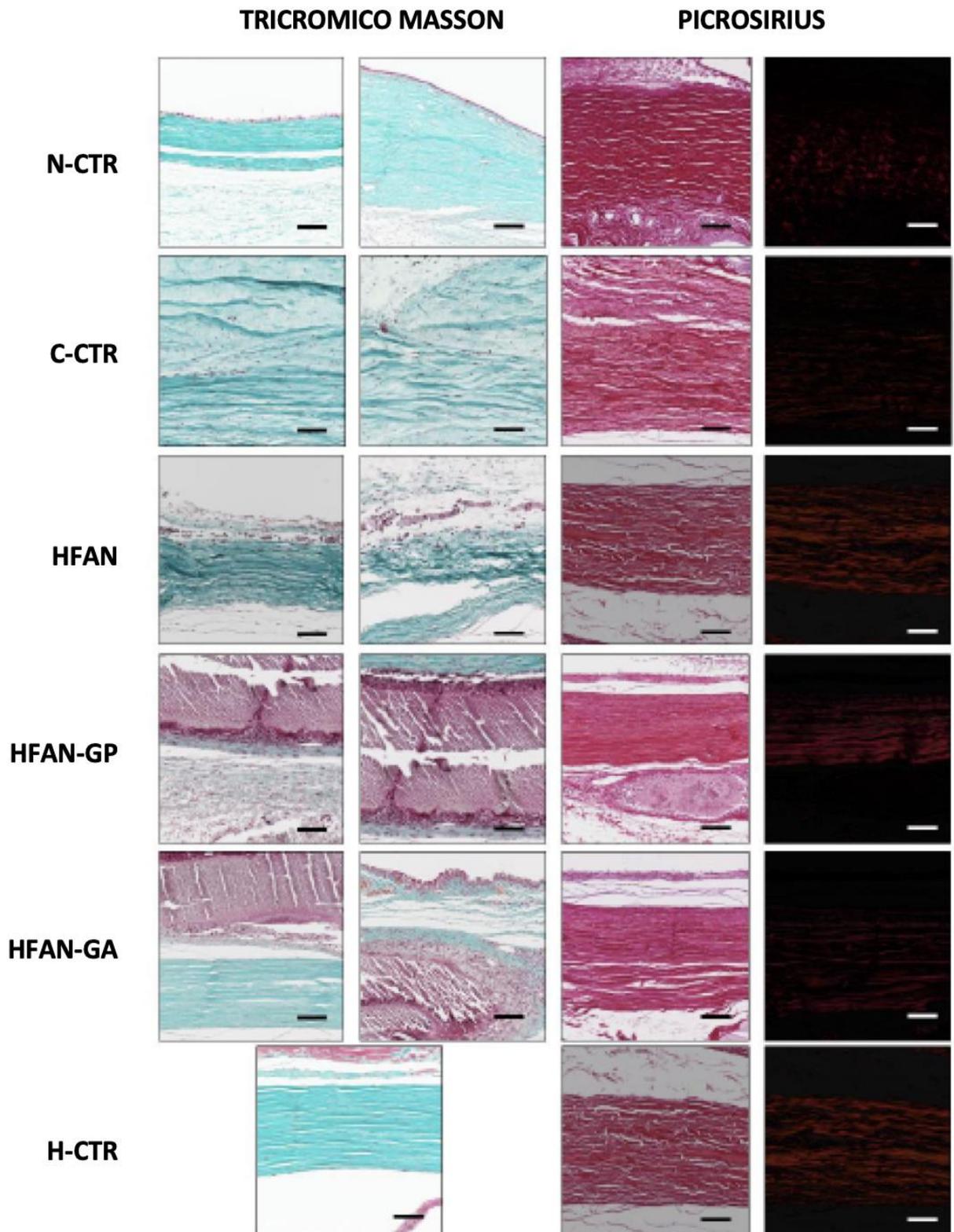


Figura 30. Análisis histoquímico del colágeno en controles de ojos sanos y escleras reparadas y no reparadas. Dos imágenes representativas de la tinción Tetracromico de Masson son presentadas. La tinción Picrosirius fue analizada en luz y microscopía polarizada, la cual reveló el patrón de organización de las fibras de colágeno. Escala de la barra: 100 μ m

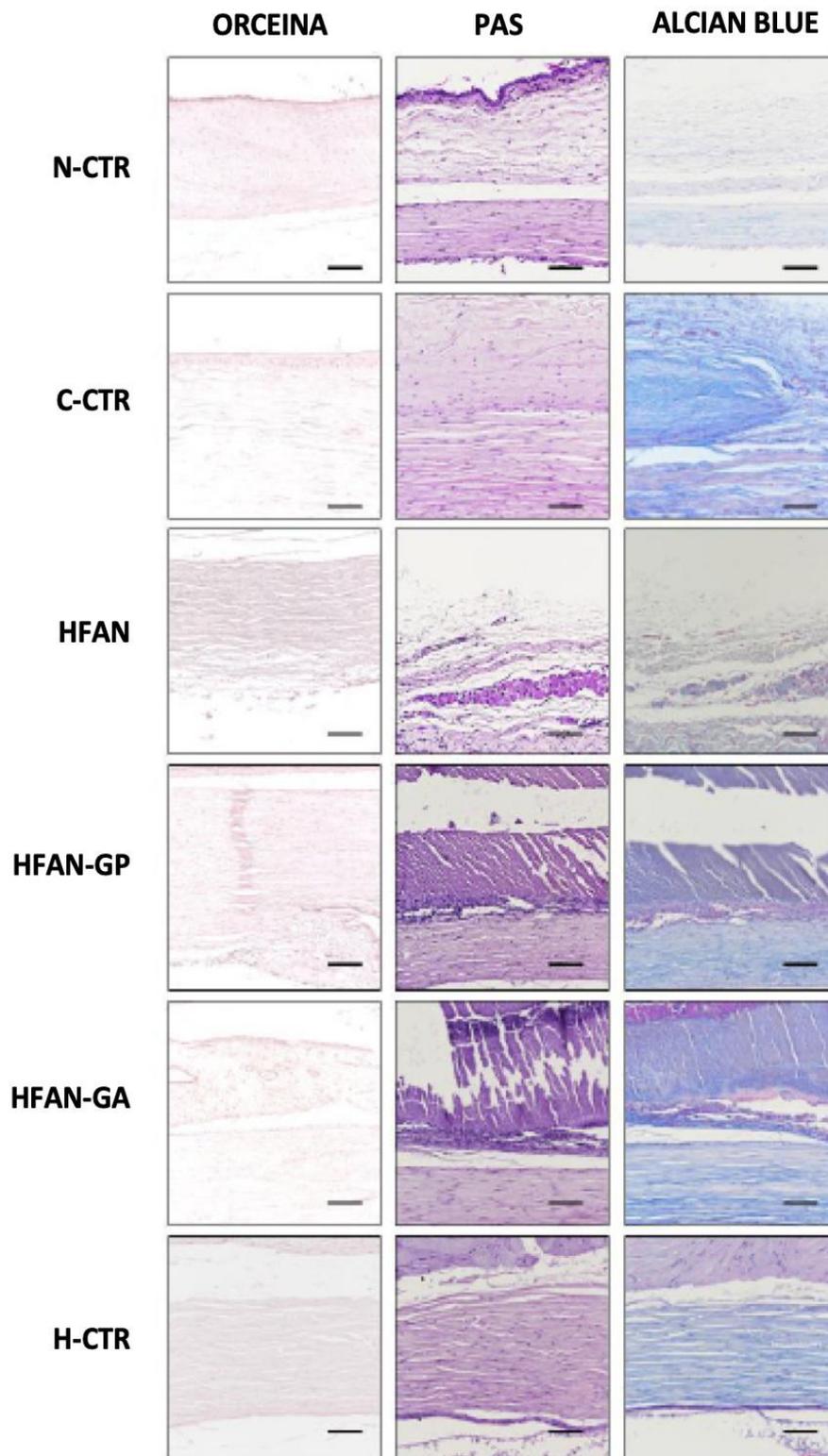


Figura 31. Análisis histoquímico de las fibras elásticas y de las moléculas de la MEC no fibrillar en escleras sanas, reparadas y no reparadas. No fue observado reacción histoquímica positiva para las fibras elásticas con orceína. La tinción PAS fue difusa y no reveló alteraciones en las glicoproteínas, pero fue positivo para macrófagos. La tinción azul alcian reveló una reacción positiva para ácidos proteoglicanos en todas las condiciones. Escala de la barra: 100 μ m

7.3 Morfometría

El análisis morfométrico reveló la presencia de esclera nativa en el área injertada con un grosor promedio de 313.85 μm . En el grupo de control negativo, sin reparación alguna, la pared escleral había perdido la mitad de su grosor, con un valor de p estadísticamente significativo, $p= 0.000$. Por el contrario, mediante el uso de injertos se produjo un aumento en el grosor de la pared escleral en comparación con el grupo de controles sanos. Los injertos de HFAN-GP produjeron las paredes más gruesas (Figura 32).

El grupo con HFAN obtuvo una capa pequeña y fina de tejido conectivo con un grosor medio de 34.09 μm . Al comparar las escleras subyacentes a los injertos, el grupo HFAN-GP obtuvo una reducción en su grosor y no se encontraron diferencias de grosor en los grupos de injertos cadavéricos y el grupo HFAN-GA. Al calcular el valor de p comparando todos los grosores de las paredes esclerales, sólo se observó un aumento del grosor estadísticamente significativo con el grupo HFAN, $p < 0.05$.

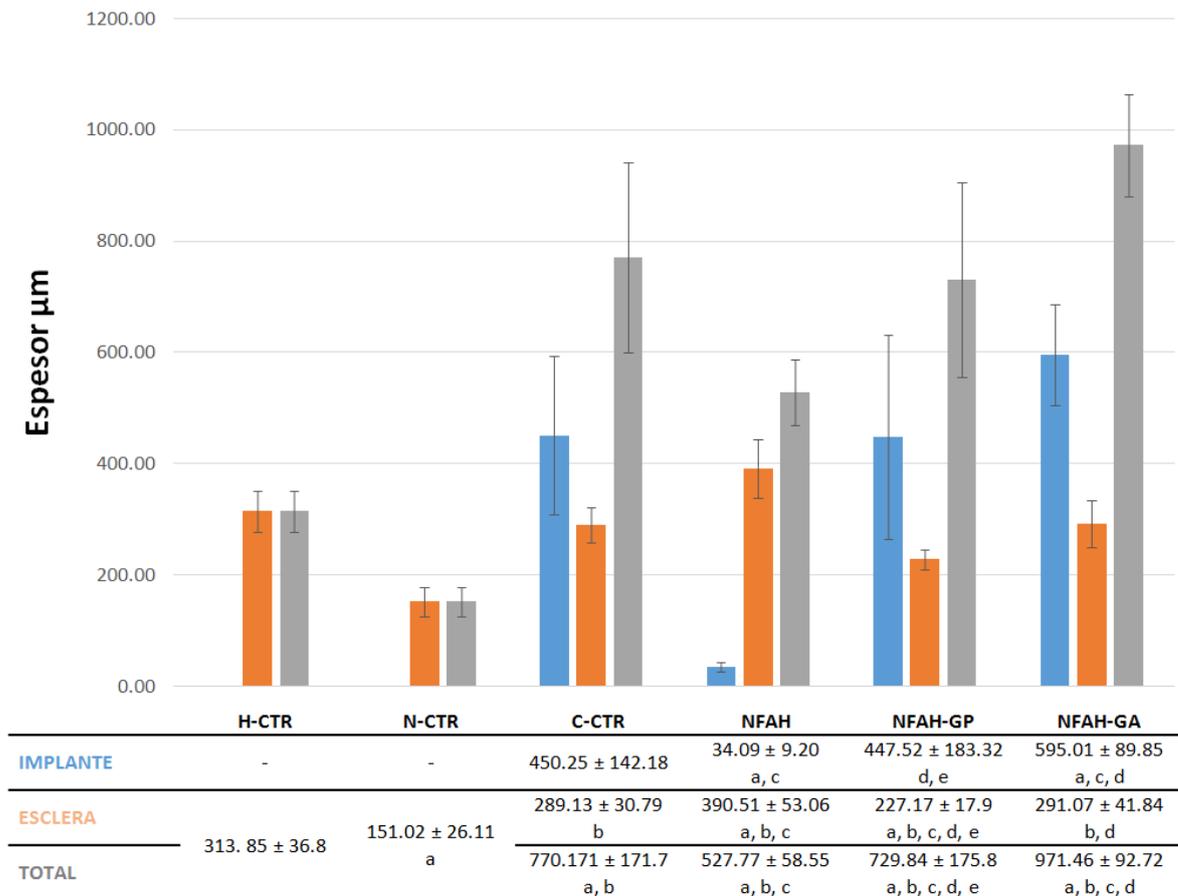


Figura 32. Diferencias morfométricas en la reparación escleral. Grosor de los implantes, esclera del receptor y pared escleral completa (implante y esclera del receptor), los resultados están mostrados como medias con desviaciones estándar. Valores de p menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos con la prueba de Mann-Whitney.

a: diferencias significativas entre grupos quirúrgicos y H-CTR

b: diferencias significativas entre los injertos cicatrizados y N-CTR

c: diferencias significativas entre los biomateriales de los injertos y C-CTR

DISCUSIÓN

Esta investigación permitió evaluar la conveniencia de los tejidos producidos con diferentes constructos y estrategias como posibles alternativas a los trasplantes alogénicos esclerales en un modelo de conejos con lesiones esclerales. La regeneración y reparación tisular fue medida de manera macroscópica e histológica. Desde un punto de vista quirúrgico y biológico, los biomateriales sustitutos implementados en ingeniería tisular deben cumplir una serie de criterios para asegurar la regeneración adecuada del tejido u órgano. Además, deben ser fáciles de manejar, proregenerativos, biocompatibles y responder a las demandas mecánicas y biológicas del tejido en el que serán implantados (76, 77, 78, 79).

En esta investigación, los injertos resultaron fáciles de manejar de una manera similar a los injertos cadavéricos. En el grupo de controles negativos, la esclera se encontraba semitransparente y parcialmente cubierta por tejido conectivo, demostrando el proceso regenerativo fallido resultante. Desde la perspectiva anatómica y quirúrgica se evidenció que después de 40 días las estrategias implementadas fueron capaces de reparar anatómicamente el defecto, encontrando diferencias de biodegradación e integración entre los distintos tipos de injertos (67).

Extraordinariamente, los injertos cadavéricos y HFAN-GP no fueron integrados completamente después de 40 días. Por el contrario, no se encontraron residuos observables macroscópicamente a los 40 días en los injertos HFAN y HFAN-GA, sugiriendo la integración, biodegradación o reemplazo de estos injertos esclerales. Los injertos HFAN fueron biodegradables y reemplazados por nuevo tejido. Los resultados obtenidos con respecto a la velocidad de biodegradación observada son congruentes con otros estudios realizados (54, 68, 80).

Por otro lado, los injertos HFAN-GP demostraron ser una estrategia que se puede utilizar en caso de querer controlar la biodegradación en vivo de los injertos de fibrina-agarosa fabricados con ingeniería tisular. El genipin es un agente natural, cuya función es regular la porosidad, incrementar las propiedades mecánicas, biológicas y reducir la degradación (71, 81). Desde un punto de vista clínico, los constructos utilizados resultaron ser alternativas útiles en comparación con los injertos de cadáveres, destacándose los injertos HFAN por haber producido un tejido homogéneo (67).

Con respecto al modelo animal, los resultados muestran que el grupo de control negativo no fue capaz de regenerar completamente la esclera lesionada. Esto sugiere que los conejos New Zealand pueden ser una buena alternativa para investigaciones quirúrgicas y de estrategias de ingeniería tisular para reconstrucciones esclerales. El análisis microscópico del grupo de controles negativos reveló una reparación parcial de la herida realizada con tejido conectivo suelto que no presentó un patrón histológico y grosor comparable con la esclera de los controles positivos (67).

La lesión causada no fue crítica, pero fue útil para estudiar las diferencias en las condiciones experimentales establecidas. Además, el uso de conejos en las investigaciones oftalmológicas está aprobado en investigaciones de ingeniería genética corneal (56), en la producción y refuerzo de estrategias (82) o el análisis de cruces esclerales para el tratamiento de la miopía progresiva (83). La histología juega un papel central para evaluar los procesos moleculares, regeneración y patologías en los tejidos (74, 84, 85).

La histología mostró que los injertos utilizados eran capaces de reparar la herida escleral en 40 días. Una matriz abundante en colágeno es lo que provee las propiedades biomecánicas que necesita la esclera para permitir la rotación ocular normal y la opacidad necesaria para aislar la luz. Esta investigación demostró que los injertos cadavéricos respondían a las demandas biomecánicas y biológicas suficientes para reparar el daño realizado, inclusive cuando no estaban completamente integradas, pero con un incremento en el grosor del tejido como efecto adverso. No se produjeron signos de degradación, inflamación, remodelado o rechazo después de 40 días en el grupo de injertos cadavéricos. Esto podría ser debido a la cercanía genética y la poca vascularización escleral (67, 86).

Los injertos proporcionaron una matriz extracelular adecuada para la proliferación celular, tomando en cuenta que su eficacia no se debe a las células que poseen, porque estas no son funcionales como consecuencia de los procesos de preservación (87). La histología de los injertos que utilizaron fibrina-agarosa mostró producción de tejido conectivo capsular con grados variables de inflamación y degradación de los biomateriales superficialmente. Los resultados obtenidos concuerdan con otros estudios en los que los injertos cruzados incrementan la resistencia de los constructos a la

degradación (81, 88), lo cual sugiere que los constructos cruzados son menos permeables, posiblemente debido al aumento de las propiedades biomecánicas o a una modificación molecular, causando como resultado una disminución de la velocidad de regeneración y el consecuente aumento del grosor escleral (67).

Con respecto a los injertos HFAN, la histomorfometría mostró esclera recientemente formada con fibras de colágeno y proteoglicanos en disposiciones y cantidades similares al grupo de controles sanos. No se observaron signos de inflamación o remanentes de biomateriales en los tejidos conectivos esclerales analizados, pero se encontraron algunos macrófagos superficiales. Estos resultados apuntan a que existe cierto balance entre la degradación de los biomateriales y la regeneración tisular que se observa en los tejidos con injertos HFAN (54), nervios periféricos (68) o paladar en la cavidad bucal (80). El tejido de reparación formado no es completamente idéntico a la esclera nativa, pero esto pudiera relacionarse con un tiempo de regeneración muy corto, por lo cual deberían realizarse investigaciones de largo plazo para demostrar si es posible una regeneración completa (67).

En la actualidad, los injertos de donantes cadavéricos o los autoinjertos se consideran las técnicas preferidas para reparar y/o reforzar el globo ocular en diversas enfermedades o traumas (87, 89, 90). Algunos pacientes no son aptos para los autoinjertos y en esos casos surgen las demandas de otros métodos, encontrándose muchas veces con ausencia de donantes y riesgos potenciales de enfermedades infecciosas que podrían transmitirse (46, 86). Estos inconvenientes han mantenido a los investigadores buscando alternativas. Así mismo, la fascia lata, los injertos de piel, membrana amniótica, submucosa intestinal xenogénica, entre otros materiales naturales han sido utilizados obteniendo diversos resultados (65, 66, 67, 87, 91).

Este estudio demuestra que el uso de injertos HFAN son una opción eficaz para reparar heridas esclerales debido a que promueven la regeneración del tejido en un modelo de conejos. El uso de injertos HFAN como sustitutos esclerales se encuentra apoyado por su índice de biocompatibilidad, biodegradación y actividad proregenerativa en el campo de la ingeniería de tejidos (54, 56). Los injertos HFAN en España, utilizando las regulaciones estadounidenses, se encuentra aprobados en preparados autólogos obtenidos por procedimientos baratos y fáciles en comparación con otros métodos (67).

Esta investigación, realizada en un modelo de lesión escleral en conejos New Zealand, demostró por primera vez que los injertos HFAN son alternativas prometedoras a la utilización de alotrasplantes esclerales en la reparación quirúrgica de defectos o daños estructurales de la pared escleral. Los injertos HFAN fueron altamente biocompatibles, tuvieron un adecuado índice de biodegradación y promovieron un aceptable grado de regeneración escleral en el modelo animal y periodo estudiado. Sin embargo, para determinar la potencial utilidad clínica de estos productos de terapias avanzadas es necesario realizar estudios futuros que nos permitan conocer con exactitud los procesos celulares y moleculares involucrados en el proceso de regeneración de la esclera.

CONCLUSIONES

1. La utilización de protocolos de ingeniería tisular sustentados en el uso del biomaterial polimérico fibrina-agarosa y en la combinación del mismo con procesos de nanoestructuración generados por compresión plástica y/o los agentes químicos genipin y glutaraldehído, ha permitido la elaboración de tres modelos de sustitutos escleróticos bioartificiales que, al cumplir los estándares preclínicos de calidad establecidos, son susceptibles de posible aplicación terapéutica a distintas patologías vinculadas a la túnica externa del globo ocular.
2. La estructura tisular de la esclerótica del conejo New Zealand, así como su abordaje quirúrgico, ha permitido establecer un modelo de lesión esclerótica biomimética con el sustrato patológico-lesional que presentan las distintas afecciones de la esclerótica susceptibles de terapéutica sustitutiva. Los tres modelos desarrollados en la presente tesis doctoral permiten su implantación quirúrgica de acuerdo con los protocolos quirúrgicos existentes sin que se generen alteraciones artefactuales vinculadas a dicho proceso.
3. La evaluación *in vivo* de los tres modelos sustitutos de esclerótica, desarrollados en la presente tesis doctoral, permiten, en comparación con la esclerótica control, el control negativo y la esclera cadavérica, utilizada como *gold standard*, establecer tres patrones histológicos e histoquímicos diferentes de respuesta tras cuarenta días desde su implantación quirúrgica. Frente al control (H-CTR) y la esclera cadavérica (C-CTR) que presentan patrones de colágeno más orientados y los modelos de hidrogeles de fibrina-agarosa nanoestructurados con genipin y glutaraldehído (HFAN-GP y HFAN-GA) que presentan pseudocápsulas de fibras colágenas que rodean al biomaterial, el modelo formado solo por hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurado (HFAN) muestra una presencia y distribución equilibrada de colágeno y glicoproteínas a la vez que una reacción de monocitos y macrófagos más limitada.
4. La evaluación conjunta de los patrones histológicos e histoquímicos del implante, del análisis morfométrico de la pared escleral y de la evolución clínica en los tres modelos desarrollados en la presente tesis doctoral, pone de relieve que el modelo formado solo por hidrogel de fibrina-agarosa nanoestructurada (HFAN) puede constituir una prometedora alternativa al uso de la esclera cadavérica en la

reparación quirúrgica de los defectos esclerales debido a su mayor grado de biocompatibilidad, biodegradabilidad y regeneración tisular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leiro J, Facal S, Benozzi G, Orman B, Benozzi J. La ultrabiomicroscopía en la acomodación. *Revista Argentina de Radiología*. 2014;78(1):13-21. doi: <http://dx.doi.org/10.7811/rarv78n1a04>.
2. Kanski J, Bowling B. *Oftalmología Clínica*. 7ma ed. España: Elsevier; 2012.
3. Ethier CR, Johnson M, Ruberti J. Ocular Biomechanics and Biotransport. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2004;6(1):249-273. doi:10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140055.
4. Hall JE, Guyton AC. *Tratado de fisiología médica* : Guyton & Hall. Barcelona: Elsevier; 2011.
5. Gartner LP, Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología*. 2da ed. Filadelfia, PA: W.B. Saunders Company; 2001.
6. Saraux H, Lemasson C, Offret H, Renard G. *Anatomía e Histología del Ojo*. Barcelona: Masson, S.A.; 1985.
7. Jeanrot N, Jeanrot François, Spielmann A, Massot BL. *Manual de estrabología práctica: Aspectos clínicos y terapéuticos*. Barcelona: Masson, S.A.; 1996.
8. Wright KW, Spiegel PH. *Oftalmología Pediátrica y Estrabismo: Los Requisitos en Oftalmología*. Barcelona: Harcourt; 2001.
9. Sadler TW, Leland J. *Embriología Médica de Langman*. Filadelfia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 2012.
10. Friedman NJ, Kaiser PK, Trattler WB. *Review of Ophthalmology*. Filadelfia, PA: Elsevier; 2005.
11. Fine BS, Yanoff M. *Ocular Histology (A Text and Atlas)*. Harper and Row; 1972.
12. Drake RL, Vogl W, Mitchell AW. *Anatomía para Estudiantes Gray*. Madrid: Elsevier; 2005.
13. Cantor LB, Rapuano CJ, Cioffi GA. *Fundamentals and Principles of Ophthalmology: Basic and Clinical Science Course*. Houston, TA: American Academy of Ophthalmology; 2014.
14. Buskirk V. The anatomy of the limbus. *Eye (Londres, Inglaterra)*. 1989;3(2):101-108. doi:10.1038/eye.1989.16.
15. Cortina S, De La Cruz J. *Keratoprotheses and Artificial Corneas. Fundamentals and Surgical Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2015.
16. Vij N, VandeGeest J. Chapter 25: Collagen anisotropy in scleral mechanics. In: Roberts CJ, Dupps WJ, Downs JC, eds. *Biomechanics of the Eye*. Ámsterdam: Kugler Publications; 2018:363-376.

17. Comark DH. *Histología De Ham*. 9na ed. Distrito Federal: Harla, S.A.; 1988.
18. Van Burskirk M. The Anatomy of the Limbus. *Eye*. 3:101-108. doi:<https://doi.org/10.1038/eye.1989.16>.
19. Gwon A. Chapter 13: The Rabbit in Cataract/IOL Surgery. In: *Animal Models in Eye Research*. San Diego, CA: Elsevier; 2008:184-204.
20. Rabbit as an Animal Model. *Kingfisher Biotech Circular*. 2011;1(2). https://www.kingfisherbiotech.com/newsletter/Rabbit_Animal_Model_Newsletter.pdf. Acceso Abril 20, 2019.
21. Toni MC, Meirelles AÉWB, Gava FN, Camacho AA, Laus JL, Canola JC. Rabbits' eye globe sonographic biometry. *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13(6):384-386. doi:10.1111/j.1463-5224.2010.00831.x.
22. Zárate Fernando Agu ilera, Pastrana CP. *Catarata: Diagnóstico y Tratamiento*. México: Intersistemas; 2007.
23. Sheppard BL. The Anatomy and Histology of the Normal Rabbit Eye with Special Reference to the Ciliary Zone. *Archives of Ophthalmology*. 1962;67(1):87-100. doi:10.1001/archopht.1962.00960020089010.
24. Williams DL. *Ophthalmology of Exotic Pets*. Oxford: WileyBlackwell; 2012.
25. Young RD. The ultrastructural organization of proteoglycans and collagen in human and rabbit scleral matrix. *Journal of Cell Science*. 1985;74:95-104. <http://jcs.biologists.org/content/74/1/95.long>. Acceso Abril 3, 2019.
26. Abdo M, Haddad S, Emam M. Development of the New Zealand White Rabbit Eye: I. Pre- and Postnatal Development of Eye Tunics. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2017;46(5):423-430. doi:10.1111/ahe.12284
27. Foster S, Vitale AT. *Diagnosis and Treatment of Uveitis*. Filadelfia, PA: W. B. Saunders; 2002.
28. Folberg R, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Capítulo 29: El ojo. In: *Robins y Contran, Patología Estructural y Funcional*. 8va ed. Barcelona: Elsevier; 2010:1345-1368.
29. Watson PG, Pavésio CE. *The Sclera and Systemic Disorders*. 3ra ed. London: JP Medical Pub.; 2012. [https://books.google.com.do/books?id=sHlqhV7jUmQC&pg=PA99&lpg=PA99&dq=chapter 5investigationinscleraldisease&source=bl&ots=k68J-wLdlh&sig=ACfU3U0SHNd0jLvKti1cWhd2t6z3jrWcYA&hl=es-](https://books.google.com.do/books?id=sHlqhV7jUmQC&pg=PA99&lpg=PA99&dq=chapter%205%20investigation%20in%20scleral%20disease&source=bl&ots=k68J-wLdlh&sig=ACfU3U0SHNd0jLvKti1cWhd2t6z3jrWcYA&hl=es-)

- 419&sa=X&ved=2ahUKEwiYyOvu4NDiAhUhheAKHZedCWsQ6AEwAHoECAkQAQ#v=onepage&q=chapter 5 investigation in scleral disease&f=false. Accessed April 20, 2019.
- 30.** Cruz Izquierdo D, Guerra García RA. Trauma ocular y politrauma. *Revista Cubana de Oftalmología*. 2012;25(2):500-507. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762012000400002&lng=es. Acceso Abril 22, 2019.
- 31.** Contreras Silva A, Salaverry García O. Capítulo 19: Traumatología Ocular. In: *Cirugía: IV Oftalmología*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000:253-265. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtual/libros/medicina/cirugia/tomo_iv/trauma_ocular.htm. Acceso Abril 21, 2019.
- 32.** Viales López G. Patología traumática ocular. *Medicina Legal de Costa Rica*. 2016;33(2):86-97. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152016000200086&lng=en. Acceso Abril 19, 2019.
- 33.** Talevi G, Tallano C. *Ecografía y Biometría Ocular*. Buenos Aires: Ediciones Científicas Argentinas; 2007.
- 34.** Martín Gómez V, Casanovas Gordó JM. Traumatismos oculares. *Pediatría Catalana*. 2002;22(1):45-57. https://www.pediatriaintegral.es/wp-content/uploads/2018/xxii01/05/n1-045-057_Casanovas.pdf. Acceso Abril 12, 2019.
- 35.** Tsai C-L, Wu P-C, Fini ME, Shi S. Identification of Multipotent Stem/Progenitor Cells in Murine Sclera. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52(8):5481-5487. doi:10.1167/iovs.11-7676.
- 36.** López-Veiga A. Genética molecular y neoplasias oculares. *Archivos de la Sociedad Canaria de Oftalmología*. 2000;11:101-108. <http://sociedadcanariadeoftalmologia.com/wp-content/revista/revista-11/11sco20.pdf>. Acceso Abril 22, 2019.
- 37.** Lommatzsch PK. *Tumores Intraoculares: Atlas Para El Diagnóstico Diferencial*. Madrid: Editorial Marbán, S.L.; 1993.
- 38.** De Los Ángeles Hernández Cueto M. *Córnea y Esclerótica*. Distrito Federal: Asociación para Evitar la Ceguera en México; 2001.
- 39.** Gonzalez-Gonzalez LA, Molina-Prat N, Doctor P, Tauber J, Sainz De La Maza MT, Foster SC. Clinical features and presentation of infectious scleritis from herpes viruses: a report of 35 cases. *Ophthalmology*. 2012;119(7):1460-1464. doi:10.1016/j.opthta.2012.01.033.

40. Wakefield D, Girolamo ND, Thurau S, Wildner G, McCluskey P. Scleritis: Immunopathogenesis and Molecular Basis for Therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2013;35:44-62. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.02.004>.
41. Jeang LJ, Davis A, Madow B, Espana EM, Margo CE. Occult Fungal Scleritis. *Ocular Oncology and Pathology*. 2016;3(1):41-44. doi:10.1159/000449103.
42. Gupta V, Gupta A, Rao NA. Intraocular Tuberculosis—An Update. *Survey of Ophthalmology*. 2017;52(6):561-587. doi:10.1016/j.survophthal.2007.08.015.
43. Raiji V, Ramenaden R. Clinical characteristics and visual outcomes in infectious scleritis: a review. *Clinical Ophthalmology*. 2013;7:2113-2122. doi:10.2147/OPHTH.S37809.
44. Morales Navarro D. Ingeniería tisular como puntal de la medicina regenerativa en estomatología. *Revista Cubana de Estomatología*. 2014;51(3):288-304. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubest/esc-2014/esc143f.pdf>. Acceso Abril 3, 2019.
45. Serrata Ochoa D, Nieto Aguilar R, Aguilera Méndez A. Ingeniería de tejidos. Una nueva disciplina en medicina regenerativa. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 2015;64:61-69. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5470165.pdf>. Acceso Abril 4, 2019.
46. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2011;2:403-430. doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
47. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2007;10(3):569-576. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
48. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Material Today*. 2011;14(3):88-95. doi:10.1016/s1369-7021(11)70058-x.
49. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:18-23. doi:10.1016/j.addr.2012.09.010.
50. Hasegawa U, Nomura S-IM, Kaul SC, Hirano T, Akiyoshi K. Nanogel-quantum dot hybrid nanoparticles for live cell imaging. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2005;331(4):917-921. doi:10.1016/j.bbrc.2005.03.228.
51. Peppas NA, Langer R. Origins and development of biomedical engineering within chemical engineering. *AIChE Journal*. 2004;50(3):536-546. doi:10.1002/aic.10048.

52. Peppas N, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50(1):27-46. doi:10.1016/s0939-6411(00)00090-4.
53. Carriel V, Scionti G, Campos F, et al. In vitro characterization of a nanostructured fibrin agarose bio-artificial nerve substitute. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2015;11(5):1412-1426. doi:10.1002/term.2039.
54. Carriel V, Garzón I, Jiménez J-M, et al. Epithelial and Stromal Developmental Patterns in a Novel Substitute of the Human Skin Generated with Fibrin-Agarose Biomaterials. *Cells Tissues Organs*. 2011;196:1-12. doi:10.1159/000330682.
55. Alaminos M, Garzón I, Sánchez-Quevedo MC, et al. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2007;1(5):350-359. doi:10.1002/term.38.
56. Alaminos M, Sánchez-Quevedo MDC, Muñoz-Ávila JI, et al. Construction of a Complete Rabbit Cornea Substitute Using a Fibrin-Agarose Scaffold. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47(8):3311-3317. doi:10.1167/iovs.05-1647.
57. Garzón I, Martín-Piedra MA, Alfonso-Rodríguez C, et al. Generation of a Biomimetic Human Artificial Cornea Model Using Whartons Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014;55(7):4073-4083. doi:10.1167/iovs.14-14304.
58. Young MJ, Borrás T, Walter M. Tissue Bioengineering: Potential Applications to Glaucoma. *Archives of Ophthalmology*. 2005;123(12):1725-1780. doi:10.1001/archophth.123.12.1725.
59. Delgado-Pelayo SA. Retinosis pigmentaria. *Revista Médica MD*. 2002;3(3):163-166. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2012/md123f.pdf>. Acceso Abril 5, 2019.
60. Flores Rodríguez P, Loma Serrano E, Gili P, Carracedo G. Retinitis pigmentosa. *Gaceta Optometría y Óptica Oftálmica*. 2013;481:1-7. <http://www.cnoo.es/download.asp?file=media/gaceta/gaceta481/cientifico1.pdf>. Acceso Abril 5, 2019.
61. Marigo V. Las células madre como posibles herramientas terapéuticas para la degeneración retiniana. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología*. 2008;83(7):399-400. doi:10.4321/s0365-66912008000700001.

- 62.** Soo Lee J, Kyu Shin M, Jo Park J, Song M. Autologous Advanced Tenon Grafting Combined with Conjunctival Flap in Scleromalacia after Pterygium Excision. *Journal of Ophthalmology*. 2015;2015:1-6. doi:10.1155/2015/547276.
- 63.** Polat N. Use of an Autologous Lamellar Scleral Graft to Repair a Scleral Melt After Mitomycin Application. *Ophthalmology and Therapy*. 2014;3(1-2):73-76. doi:10.1007/s40123-014-0026-7.
- 64.** Hanada K, Shimazaki J, Shimmura S, Tsubota K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera. *American Journal of Ophthalmology*. 2001;131(3):324-331. doi:10.1016/s0002-9394(00)00825-4.
- 65.** Mauriello JA, Pokorny K. Use of split-thickness dermal grafts to repair corneal and scleral defects--a study of 10 patients. *British Journal of Ophthalmology*. 1993;77(6):327-331. doi:10.1136/bjo.77.6.327.
- 66.** Thakur S, Ichhpujani P, Kumar S. Grafts in Glaucoma Surgery: A Review of the Literature. *Asia – Pacific Journal of Ophthalmology*. 2017;6(5):469-476. doi:10.22608/apo.2016123.
- 67.** Carriel V, Vizcaíno-López G, Chato-Astrain J, et al. Successful Repair and Regeneration of Scleral Defects by Using Nanostructured Fibrin-Agarose-Based Tissue-Like Membranes. *Experimental Eye Research*. 2019; 186:1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107717>
- 68.** Carriel V, Garrido-Gómez J, Hernández-Cortés P, et al. Combination of fibrin-agarose hydrogels and adipose-derived mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration. *Journal of Neural Engineering*. 2013;10(2):1-14. doi: 10.1088/1741-2560/10/2/026022.
- 69.** García-Martínez L, Campos F, Godoy-Guzmán C, et al. Encapsulation of human elastic cartilage-derived chondrocytes in nanostructured fibrin-agarose hydrogels. *Histochemistry and Cell Biology*. 2016;147(1):83-95. doi:10.1007/s00418-016-1485-9.
- 70.** Campos F, Bonhome-Espinosa AB, García-Martínez L, et al. Ex vivo characterization of a novel tissue-like cross-linked fibrin-agarose hydrogel for tissue engineering applications. *Biomedical material (Bristol, England)*. 2016;11(5). doi:10.1088/1748-6041/11/5/055004.
- 71.** Campos F, Bonhome-Espinosa AB, Vizcaíno G, et al. Generation of genipin cross-linked fibrin-agarose hydrogel tissue-like models for tissue engineering applications. *Biomedical Materials*. 2017;13(2):025021. doi:10.1088/1748-605x/aa9ad2.

- 72.** Carriel V, Garzón I, Alaminos M, Campos A. Evaluation of myelin sheath and collagen reorganization pattern in a model of peripheral nerve regeneration using an integrated histochemical approach. *Histochemistry and CellBiology*. 2011;136(6):709-717. doi:10.1007/s00418-011-0874-3.
- 73.** Kiernan JA. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. 4ta ed. Oxford: Scion; 2008.
- 74.** Carriel VS, Aneiros-Fernandez J, Arias-Santiago S, Garzón IJ, Alaminos M, Campos A. A Novel Histochemical Method for a Simultaneous Staining of Melanin and Collagen Fibers. *Journal of Histochemistry&Cytochemistry*. 2011;59(3):270-277. doi:10.1369/0022155410398001.
- 75.** Oliveira AC, Garzón I, Ionescu AM, et al. Evaluation of Small Intestine Grafts Decellularization Methods for Corneal Tissue Engineering. *PLoS ONE*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066538.
- 76.** Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Campos A, Cornelissen M. Tissue engineering of the peripheral nervous system. *ExpertReview of Neurotherapeutics*. 2014;14(3):301-318. doi:10.1586/14737175.2014.887444.
- 77.** González-Quevedo D, Martínez-Medina I, Campos A, Campos F, Carriel V. Tissue engineering strategies for the treatment of tendon injuries. *Bone&JointResearch*. 2018;7(4):318-324. doi:10.1302/2046-3758.74.bjr-2017-0326.
- 78.** Atala A. Regenerative medicine strategies. *Journal of Pediatric Surgery*. 2012;47(1):17-28. doi:10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013.
- 79.** Stocum DL. *Regenerative Biology and Medicine*. 2da ed. Indianapolis, IA: Academic Press; 2012.
- 80.** Fernández-Valadés-Gá R, Garzón I, Liceras-Liceras E, et al. Usefulness of a bioengineered oral mucosa model for preventing palate bone alterations in rabbits with a mucoperiosteal defect. *Biomedical Materials*. 2016;11(1):015015. doi:10.1088/1748-6041/11/1/015015.
- 81.** McGann ME, Bonitsky CM, Jackson ML, Ovaert TC, Trippel SB, Wagner DR. Genipin crosslinking of cartilage enhances resistance to biochemical degradation and mechanical wear. *Journal of Orthopaedic Research*. 2015;33(11):1571-1579. doi:10.1002/jor.22939.
- 82.** Yuan Y, Zong Y, Zheng Q, et al. The efficacy and safety of a novel posterior scleral reinforcement device in rabbits. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;62:233-241. doi:10.1016/j.msec.2015.12.046.

- 83.** Dotan A, Kremer I, Livnat T, Zigler A, Weinberger D, Bourla D. Scleral cross-linking using riboflavin and ultraviolet-A radiation for prevention of progressive myopia in a rabbit model. *Experimental EyeResearch*. 2014;127:190-195. doi:10.1016/j.exer.2014.07.019.
- 84.** Kim Y-H, Jin K-H, Kim JH, Park DJ, Choi S, Park H-K. Molecular and chemical investigations and comparisons of biomaterials for ocular surface regeneration. *Microscopy Research and Technique*. 2013;77(3):183-188. doi:10.1002/jemt.22326.
- 85.** Carriel V, Alaminos M, Garzón I, Cornelissen M. Histological assessment in peripheral nerve tissue engineering. *Neural RegenerationResearch*. 2014;9(18):1657. doi:10.4103/1673-5374.141798.
- 86.** Watson PG, Young RD. Scleral structure, organization and disease. A review. *Experimental EyeResearch*. 2004;78(3):609-623. doi:10.1016/s0014-4835(03)00212-4.
- 87.** Hodge C, Sutton G, Devasahayam R, et al. The use of donor scleral patch in ophthalmic surgery. *CellTissue Bank*. 2016:119-128. doi:10.1007/s10561-016-9603-4.
- 88.** Ferretti M, Marra KG, Kobayashi K, Defail AJ, Chu CR. Controlled in Vivo Degradation of Genipin Crosslinked Polyethylene Glycol Hydrogels within Osteochondral Defects. *TissueEngineering*. 2006:060810081933001. doi:10.1089/ten.2006.12.ft-194.
- 89.** Lin CP, Tsai MC, Wu YH, Shih MH. Repair of a giant scleral ulcer with preserved sclera and tissue adhesive. *Ophthalmic Surgery and Lasers*. 1996;27(12):995-999. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8976517>. Acceso Mayo 10, 2019.
- 90.** Rodriguez-Ares MT, Tourino R, Capeans C, Sanchez-Salorio M. Repair of scleral perforation with preserved scleral and amniotic membrane in Marfan's syndrome. *Ophthalmic Surgery and Lasers*. 1999;30(6):485-487. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392739>. Acceso Mayo 10, 2019.
- 91.** Kobtan H. Use of autologous fascia lata as a natural biomaterial for tectonic support in surgically induced necrotizing scleritis. *Eye (Londres, Inglaterra)*. 2015;29(7):580-584. doi:10.1038/eye.2014.327.