



**POLITÉCNICA**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE  
MADRID**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE  
BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

***PRODUCCIÓN DE HIDROGELES DE FIBROÍNA  
DE SEDA PARA LA ADMINISTRACIÓN  
CONTROLADA DE MOLÉCULAS  
TERAPEÚTICAS***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Autor/a: Pilar Correa Bustamante**

**Tutor: Carlos Echacarri Erasun**

**Cotutor: María Atocha Guedán  
Durán**

**Junio de 2023**



# **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**Escuela Técnica Superior De**

**Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas**

**GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

**PRODUCCIÓN DE HIDROGELES DE FIBROÍNA DE SEDA PARA A ADMINISTRACIÓN  
CONTROLADA DE MOLÉCULAS TERAPEÚTICAS**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Pilar Correa Bustamante**

**MADRID, 2023**

**Cotutores: Carlos Echavarri Erasun, María Atocha Guedán Durán**

Universidad Politécnica de Madrid



# PRODUCCIÓN DE HIDROGELES DE FIBROÍNA DE SEDA PARA LA ADMINISTRACIÓN CONTROLADA DE MOLÉCULAS TERAPEÚTICAS

Memoria presentada por Pilar Correa Bustamante para la obtención del título de Graduada en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid

**Fdo: Pilar Correa Bustamante**

**VºBº Tutor y Director del TFG**

Carlos Echavarrí Erasun

Dpto. de Biotecnología-Biología vegetal.

ETSIAAB-Universidad Politécnica de Madrid

**VºBº Cotutor**

María Atocha Guedán Durán

Bioactive Surface

ECHAVARRI Digitally signed

ERASUN  
CARLOS - by ECHAVARRI  
ERASUN CARLOS  
- 44078544X  
Date: 2023.06.22

44078544X 17:55:41 +02'00'

GUEDAN  
DURAN  
MARIA  
ATOCHA - Firmado  
digitalmente por  
GUEDAN DURAN  
MARIA ATOCHA -  
51130127T  
Fecha: 2023.06.24  
18:13:42 +02'00'

Madrid, junio de 2023

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>I</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Biomateriales.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Clasificación .....	1
1.1.2. Fibroína de seda.....	2
<b>1.2. Hidrogeles.....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Mecanismos de liberación de fármacos .....	5
1.2.1.1. Liberación por difusión.....	5
1.2.1.2. Liberación por hinchamiento .....	6
1.2.1.3. Liberación controlada químicamente.....	6
1.2.2. Hidrogeles de fibroína de seda .....	7
<b>1.3. El ojo.....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Composición.....	7
1.3.2. Patologías y tratamientos.....	9
<b>1.4. Objetivos.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Obtención del hidrogel de fibroína de seda .....</b>	<b>12</b>
2.1.1. Obtención de la FS .....	12
2.1.2. Creación del hidrogel de FS .....	12
2.1.3. Corte de hidrogeles de fibroína de seda.....	12
<b>2.2. Obtención del medio activado.....</b>	<b>13</b>
2.2.1. Descongelar células BV2.....	13
2.2.2. Cultivo de la línea celular .....	13
2.2.3. Siembra de células .....	13
2.2.4. Activación de células.....	14
<b>2.3. Obtención de humor vitreo de cerdo.....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Extracción del humor vitreo .....	14
2.3.2. Dilución de humor vitreo de cerdo .....	15

<b>2.4. Caracterización de hidrogeles de FS en diferentes grupos experimentales</b>	<b>15</b>
2.4.1. Ensayos de propiedades mecánicas y análisis de estructuras secundarias del hidrogel	15
2.4.2. Análisis de la estructura secundaria y láminas beta del hidrogel de FS ...	16
2.4.3. Obtención de propiedades físico-mecánicas del hidrogel de FS .....	17
<b>2.5 Degradación de hidrogeles.....</b>	<b>18</b>
2.5.1 Control visual de la degradación .....	18
2.5.2. Degradación del hidrogel mediante el porcentaje de fluorescencia .....	18
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Degradación hidrogel.....</b>	<b>19</b>
3.1.1. Evaluación visual .....	19
3.1.2. Degradación del hidrogel de FS a través de la fluorescencia .....	20
<b>3.2. Estructuras secundarias del hidrogel.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3. Dimensiones del hidrogel.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4. Características mecánicas del hidrogel de FS .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES.....</b>	<b>28</b>
<b>CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>29</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.....</b>	<b>3</b>
<b>Figura 1.2.....</b>	<b>8</b>
<b>Figura 2.1.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2.2.....</b>	<b>16</b>
<b>Figura 3.1.....</b>	<b>18</b>
<b>Figura 3.2.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3.3.....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 3.4.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 3.5.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3.6.....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 3.7.....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 3.8.....</b>	<b>25</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

ANOVA: Análisis de varianza

DMAE: Degeneración Macular Asociada a la Edad

DMEM: Dubelcco's Modified Eagle medium: Nutrient Mixture F12. (1:1, 12634010, Gibco)

dMEC: Matriz extracelular descelularizada

E: Grupo experimental que contiene 0,6 u/mL de Proteinasa K en medio DMEM suplementado con 1% P/S y 1% Glu

FBS: Suero fetal bovino

FS: Fibroína de seda

Ftir: Fourier-transform infrared spectroscopy

Glu: L- Glutamina

HV: Humor vítreo

HVN: Grupo experimental que contiene medio DMEM suplementado con 23%HV, 1%P/S, 1%Glu y 2%FBS

HVNf: Grupo experimental que contiene medio DMEM suplementado con 23%HV, 1%P/S, 1%Glu y 2%FBS con el hidrogel de fibroína de seda

HVP: Grupo experimental que contiene medio activado suplementado con 23%HV

HVPfs: Grupo experimental que contiene medio activado suplementado con 23%HV con el hidrogel de FS

LPS: Lipopolisacárido

MEC: Matriz extracelular

Ofs: Grupo experimental que contiene medio DMEM suplementado con, 1%P/S, 1%Glu y 2%FBS con el hidrogel de FS

O: Grupo experimental que contiene medio DMEM suplementado con, 1%P/S, 1%Glu y 2%FBS

PBS: Solución salina tamponada con fosfato

P: Grupo experimental que contiene medio activado

Pfs: Grupo experimental que contiene medio activado con el hidrogel de FS

P/S: Penicilina/Estreptomicina

PTFE: Politetrafluoroetileno

SPSS: Paquete Estadístico de las Ciencias Sociales/ *Statistical Package for the Social Science*

SS: Sericina

## **ABSTRACT**

Regenerative medicine and tissue engineering have gained importance due to the ageing population and the need of new medical interventions. In this field, biomaterials play a key role in the treatment of different pathologies. Silk fibroin is a promising biomaterial due to its biocompatibility and structural manipulability. When it is in hydrogel conformation, they are useful in the controlled release of drugs in biomedicine.

This work investigates the stability of hydrogels in a pathological environment for the controlled delivery of therapeutic molecules. To accomplish this objective, the aim is to improve current treatments for ocular pathologies, such as intravitreal injections, through the intravitreal injection of silk fibroin hydrogels.

To this end, several analyses of the hydrogels were carried out in different environments, including hydrogel degradation, variation in mechanical properties and changes in the secondary structure of the hydrogel.

The results of the work show how the dimensions of the hydrogels decrease over time. Also, a variation in their secondary structures is observed, indicating a possible process of reorganisation and dynamic equilibrium. Furthermore, it was concluded that the degradation of the hydrogels did not show significant variations between the different environments analysed despite the difference in degradation in a pathological environment. However, the presence of vitreous humour decreased the degradation of the hydrogel.

This work provides results for understanding and using the hydrogel as a drug delivery system in specific environments. However, more research is needed to better understand the different underlying mechanisms and to optimise its clinical application.

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## 1.1. Biomateriales

En las últimas décadas, hemos vivido un aumento de la conciencia de la salud y la importancia de tener una buena calidad de vida entre la sociedad. Las personas cada vez prestan más importancia a cuidar su cuerpo y llevar una vida más sana y de mejor calidad. (Lei et al., 2021). Esta situación se ve agravada por el envejecimiento de la población mundial y el hecho de que muchos tratamientos clínicos ya existentes presentan un límite sobre la capacidad de recuperar una función de manera completa de tejidos u órganos. Todo ello, ha proporcionado un aumento de forma considerable en la demanda de nuevas intervenciones médicas en los campos de ingeniería tisular y la medicina regenerativa. (Soheilmoghaddam et al., 2021). Estos campos ofrecen una enorme esperanza para conseguir el objetivo de obtener una mejor calidad de vida.

En la medicina de hoy en día, los biomateriales juegan un papel vital gracias a su capacidad de reestablecer las funciones y facilitar la recuperación de los pacientes después de una enfermedad o lesión. Un biomaterial es cualquier materia, superficie o construcción que interactúa con los sistemas biológicos y que se aplica en diferentes especialidades de la medicina. (Morato et al., 2004) Se trata de una materia inerte diseñada fundamentalmente para ser implantado en el cuerpo del paciente, evitando cualquier tipo de alteración (Antonia Lizarbe, 2007). Sin embargo, en la actualidad se observa como la reacción del sistema inmune ante el biomaterial implantado puede ser una ventaja y no un inconveniente, ya que permitirían, en algunos casos, la degradación del biomaterial para la liberación de la sustancia deseada. (Othman et al., 2018) (Zhang et al., 2021). Pese a esta controversia, la interacción debe ser adecuada, es decir, biocompatible. Esta propiedad indispensable para un biomaterial es la más complicada de encontrar para los materiales artificiales que se introducen en el interior del cuerpo humano. Esta característica abarca la tolerancia del tejido/órgano a dicho material, la bioestabilidad que presenta, la estructura química propia del entorno en el que se introduce el biomaterial y su mantenimiento dentro del cuerpo. (Antonia Lizarbe, 2007) Estos productos, debido a sus prometedoras características son muy estudiados. Sin embargo, se encuentran en constante mejora.

### 1.1.1. Clasificación

Existe una gran variedad de clasificaciones de los biomateriales. No obstante, la que utilizaremos durante el proyecto será la clasificación según su origen. De esta manera, los biomateriales pueden diferenciarse en naturales (seda, lana, colágeno) o sintéticos (silicona, nylon).

Los biomateriales sintéticos son materiales diseñados y creados por el ser humano para interactuar con el cuerpo humano específicamente. Estos materiales presentan diversas aplicaciones médicas, desde dispositivos para la medicina hasta sustitutos de tejidos y órganos. (Todros et al., 2021).

Entre los biomateriales sintéticos más comunes destacan algunos ejemplos tales como:

Polímeros: El polietileno, polipropileno y el politetrafluoroetileno (PTFE) se utilizan normalmente en dispositivos médicos como prótesis vasculares, catéteres o implantes ortopédicos.

Cerámicos: El hidroxapatito y la alumina son comúnmente utilizados en implantes dentales y huesos artificiales. Se trata de un biomaterial químicamente inerte y estable. (Pino Mínguez & Gelabert Gonzalez, 2019).

Metales: El titanio y el acero inoxidable se utilizan en implantes ortopédicos y dentales

En la ingeniería de tejidos, destacan los biomateriales naturales gracias a que presentan su actividad biológica inerte, que incluye la proliferación de la célula, su adhesión y evita la toxicidad con los tejidos sanos naturales. Entre los biomateriales naturales destaca el colágeno, la gelatina, la elastina, el fibrinógeno, la seda y la matriz extracelular descelularizada (dMEC). Entre los biomateriales naturales, la mayoría destacan por ser componentes de la matriz extracelular (MEC) acelular. La MEC juega un papel fundamental en la regeneración tisular ya que proporciona apoyo físico a las células y es capaz de estabilizar actividades como el crecimiento celular, la proliferación, la diferenciación, la migración, la homeostasis y la morfogénesis, permitiendo que el cuerpo repare los defectos menores en células, tejidos u órganos. Sin embargo, el cuerpo humano presenta incapacidad para regenerar defectos extensos debido a la escasez de matriz extracelular (MEC) para rellenarlos. Por ello, los biomateriales naturales presentan un papel fundamental en la ingeniería tisular. (Ullah & Chen, 2020)

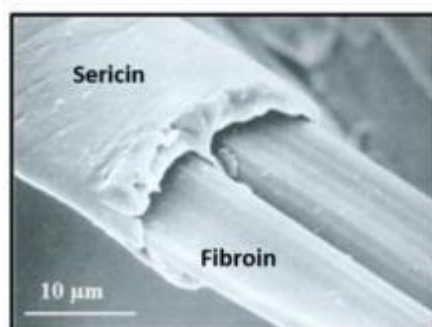
En los últimos años, uno de los materiales usados desde la antigüedad se está utilizando por su óptima calidad y su enorme potencial en la ingeniería de tejidos. Este material es la seda, en concreto la fibroína de seda. (Cenis, 2008)

### 1.1.2. Fibroína de seda

El gusano *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) también conocido como gusano de seda, es una especie de insectos del orden de los Lepidópteros y la familia *Bombycidae*. Su ciclo vital está compuesto por 4 estados diferenciados: huevo, larva, crisálida (pupa) y adulto (mariposa) (D. Aznar Cervantes, 2013). Siguiendo unas condiciones nutricionales, de temperatura y humedad adecuadas, es capaz de comenzar el proceso de transformación construyendo un capullo para su protección cuando se encuentra en estado de larva con un hilo de seda (Rios Osorio et al., 2017). El capullo del gusano de seda ha sido comercializado para aplicaciones textiles debido a sus particulares propiedades. No obstante, las proteínas que lo componen han sido estudiadas en diversos campos como pueden ser el de la medicina o el de la cosmética. (D. Aznar Cervantes, 2013)

El hilo de seda formado a partir del capullo está compuesto por dos proteínas estructurales. Dichas proteínas son la fibroína de seda (FS) y la sericina (*Silk Sericin*, SS). La SS actúa como pegamento siendo un revestimiento exterior. Cada fibra de seda está compuesta por dos filamentos de FS recubiertos por SS. Los diferentes filamentos se ensamblan a partir de nanofibrillas de 3-5 nm de manera entrelazada. A su vez, las diferentes nanofibrillas formadas se ensamblan en microfibrillas de hasta 200 nm de

diámetro. La posición espacial de las microfibrillas es paralela unas a otras dando lugar a los filamentos de FS. (**Figura 1.1**) (Rodríguez Martínez, s. f.)



**Figura 1.1:** Imagen microscopía electrónica de la fibroína de seda, donde se aprecian sus proteínas estructurales: FS y SS. (Nguyen et al., 2019)

La primera de las proteínas, es decir, la fibroína destaca por ser una proteína novedosa y útil para la medicina regenerativa.

Esta proteína se puede obtener directamente de las glándulas de los gusanos, de capullos de alta calidad o a partir de subproductos fibrosos resultantes de la fabricación de tela de seda. Dichos subproductos se pueden obtener de capullos desechados, partes desenrolladas del capullo u otros productos. (Rios Osorio et al., 2017)

Estructuralmente, la FS está formada por una cadena pesada, una ligera, e IP 25. Cabe destacar que más del 75% de dicha proteína está formada por residuos de alanina y de glicina. Las dos primeras cadenas se unen a través de un enlace disulfuro mientras que P25 se encuentra unida a la cadena pesada mediante interacciones hidrófobas haciendo así que la cadena pesada sea la responsable de las propiedades físicas y mecánicas propias de la FS. (Caballero Méndez & Gaviria Arias, 2019)

Existen diversas características que hacen de la fibroína un biomaterial muy interesante.

Para comenzar, se trata de un material de naturaleza proteica altamente biocompatible. Además, sabemos que presenta una gran flexibilidad y una enorme resistencia mecánica a la tracción.

Su capacidad de degradación se produce a una tasa más lenta en comparación con otros biomateriales orgánicos. Esta propiedad la convierte en un valioso biomaterial para la consolidación de tejidos. Además, la fibroína de seda puede ser procesada en diversas configuraciones, como películas, microfibras y geles, ampliando su versatilidad y aplicabilidad en el campo biomédico. Su producción no implica unos costes muy elevados ya que criar al gusano de seda se trata de un trabajo bastante sencillo, con un coste bajo y con técnicas relativamente simples. (Cenis, 2008).

Hasta ahora, el problema principal han sido los biomateriales que se han tenido que utilizar para el tratamiento de diversas enfermedades con la finalidad de reducir la resistencia del individuo a este cuerpo externo. Ahí es donde entra la fibroína.

Aparte de las propiedades ya descritas de la FS, por las que es muy buen biomaterial, es posible hacer modificaciones que varíen sus propiedades estructurales. Estas capacidades pueden verse modificadas durante el proceso de fabricación o producción de manera que se obtendrán estructuras secundarias diferentes a las iniciales, pudiendo así modificar las propiedades del biomaterial. (Gaviria Arias & Cenobia Caballero Mendez, 2015)

## 1.2. Hidrogeles

El término “hidrogel” apareció por primera vez en la literatura a finales del siglo XIX para describir composiciones coloidales de sales inorgánicas. (Lárez Velásquez & Graham, 2019) Aunque el concepto de hidrogel tal como lo conocemos hoy fue introducido por Wichterle y Lim en 1960 cuando lo propusieron como materiales para lentes de contacto blandas. Desde hace más de cincuenta años, la investigación sobre los hidrogeles ha ido en auge gracias a sus posibles aplicaciones en diversos campos científicos, principalmente la biomedicina. (Martínez Martínez, 2016)

Los hidrogeles son unos materiales poliméricos que se encuentran en forma de red tridimensional que pueden ser de origen natural o sintético. (Peña Blaque, 2016). Si el hidrogel se encuentra en estado seco, se trata de un material sólido y duro que recibe el nombre de xerogel (Ramirez et al., 2016) (Toribio Ruiz, 2021)

No obstante, cuando este xerogel se encuentran en contacto con el agua se hincha formando lo conocido como materiales suaves y elásticos. Con esta capacidad, su volumen incrementa considerablemente mientras se mantiene su forma hasta alcanzar un equilibrio físico-químico. Esta capacidad de hincharse les permite obtener un equilibrio gracias a un balance entre fuerzas elásticas e hidratación. Los hidrogeles tienen la capacidad de retener la fracción significativa de la misma en su estructura sin disolverse. En su estructura destacan sus grupos funcionales entre los que se encuentran -OH, -COOH, -CONH<sub>2</sub>, -CONH-, -SO<sub>3</sub>H; lo cual les confiere una naturaleza hidrofóbica permitiendo así la hidratación de dichos grupos en presencia de agua permitiendo el entrecruzamiento de las cadenas de polímeros facilitando que el hidrogel formado no se disuelva. (Benítez et al., 2015) (Martínez Martínez, 2016). Gracias a su elevado contenido en agua, estos materiales son muy parecidos a tejidos naturales. (Fresneda García & Figueroa Hernández, 2016)

Además, como su estructura se trata de una red polimérica tridimensional esto los hace ser insolubles en agua. Otra de sus características es su consistencia, estos materiales son elásticos y con capacidad de aumentar de forma considerable su volumen en contacto con el agua llegando a alcanzar un equilibrio químico físico. Pese a este fenómeno, no pierden su forma. Estas características hacen de los hidrogeles unos polímeros óptimos para ser aplicados en el campo biomédico.

En el uso de la biomedicina, los hidrogeles posibilitan la inclusión de sustancias para su posterior liberación. (Peña Blaque, 2016). Sin embargo, un factor crucial en la

administración de fármacos es la escasa biodisponibilidad del fármaco en el lugar de acción. (Castro-Balado et al., 2020)

### 1.2.1. Mecanismos de liberación de fármacos

En las últimas décadas, el uso de liberación controlada de fármacos ha tenido un gran auge debido a sus numerosas ventajas en la práctica médica. La acción del fármaco se concentra de forma directa en el área local sin afectar negativamente otras partes del organismo, reduciendo así los posibles efectos secundarios. (Aragón Fernández et al., 2010)

La finalidad de la introducción de un fármaco dentro de un hidrogel es su desprendimiento y actuación dentro del tejido u órgano diana permitiendo así la una liberación tanto controlada como selectiva. (Spiridonova et al., 2019) Dependiendo de la cantidad de agua absorbida por el hidrogel, se obtiene un grado de hinchamiento proporcional. Este grado de hinchamiento en equilibrio presenta una elevada influencia en la permeabilidad del hidrogel a los solutos y en su fuerza mecánica de manera que si se eleva el grado de entrecruzamiento se reduce el hinchamiento del hidrogel y, al mismo tiempo, el tamaño del poro, lo que dificulta el movimiento de los fármacos. De esta manera, es posible el control de la liberación del fármaco mediante la modificación del grado de entrecruzamiento.

Para inyectar fármacos en un hidrogel pueden seguirse dos técnicas: cargar el hidrogel tras su formación o la carga *in situ* del fármaco. En el primer caso, la carga del hidrogel se realiza por el método de absorción. Si el hidrogel es inerte, entonces la liberación del fármaco se producirá por difusión y/o hinchazón; si se considera que el hidrogel presenta ligandos de unión a fármacos se tendrá en cuenta las interacciones polímero-fármaco durante la liberación. Si se trata del segundo caso, el fármaco o la conjugación fármaco-polímero se mezclarán antes de la formación de hidrogel, por lo tanto, la gelificación y la encapsulación del fármaco ocurren al mismo tiempo. En este sistema, la liberación del fármaco puede ocurrir por difusión, hinchazón o controlado por productos químicos.

Existen dos categorías principales del sistema de liberación basados en hidrogeles: los sistemas de liberación controlados por el tiempo y los sistemas de liberación inducidos por estímulos. (Simões et al., 2012).

#### 1.2.1.1. Liberación por difusión

Entre los diversos mecanismos de liberación de fármacos, este es el más común dentro del formato de hidrogeles. (Simões et al., 2012) La difusión se caracteriza por el desplazamiento de moléculas individuales desde una región que presenta mayor concentración de soluto hacia otra región que presenta menor concentración. Esto se lleva a cabo a través de una membrana polimérica. Este proceso se atribuye al movimiento aleatorio denomina movimiento browniano. (Martínez Martínez, 2016) En este caso, el fármaco atravesará el polímero gracias al gradiente de concentración existente entre el medio circundante y el sistema de liberación. (Aragón Fernández et al., 2010) En el caso

de los hidrogeles, se debe tener en cuenta el tamaño del poro. De esta manera, aquellos hidrogeles que presenten un tamaño del poro mayor a las dimensiones moleculares del fármaco, el coeficiente de difusión aumentará. De lo contrario, en hidrogeles cuyo tamaño del poro coincide con el tamaño molecular del fármaco, el coeficiente de difusión del fármaco disminuirá debido al impedimento estérico causado por las cadenas de polímero; en estos casos, el volumen disponible para el movimiento se reduce y la resistencia hidrodinámica aumenta, lo que provoca un incremento de la longitud del camino de difusión del fármaco en comparación con los hidrogeles de poro más extenso.

#### 1.2.1.2. Liberación por hinchamiento

Este tipo de sistema está basado en una matriz hidrófila en la que la liberación del principio activo está controlada por la penetración de moléculas de disolvente, lo que provoca que la matriz proteica se hinche. Ocurre cuando el fármaco se disuelve o dispersa en el polímero en un estado cristalino o vítreo. En un sistema de liberación controlada por hinchamiento, el parámetro que limita la relajación de la cadena y, por lo tanto, la liberación del fármaco es la tasa de hinchamiento; a diferencia de lo que sucede en un sistema controlado por difusión donde la tasa de difusión es el paso limitante. (Martínez Martínez, 2016) (Fuertes et al., 2006)

La capacidad de hinchamiento que presentan los hidrogeles los hace óptimos para sus aplicaciones. Cuando se encuentra en forma de xerogel presenta una estructura cristalina. De lo contrario, cuando se encuentra con un medio acuoso presenta la capacidad de absorber agua dando lugar a su forma de hidrogel. De esta manera, la cantidad de agua absorbida incrementa desde el núcleo hacia la superficie. El punto en el cual un hidrogel en contacto con un medio acuoso alcanza el equilibrio es cuando las fuerzas osmóticas y las fuerzas cohesivas-elásticas se encuentran en un balance. Las primeras fuerzas, surgen por el agua al entrar en la red de macromoléculas. Las segundas, son llevadas a cabo por las cadenas del polímero. Estas cadenas se oponen a la extensión del hidrogel.

Existe una proporción directa entre la cantidad de agua absorbida por el hidrogel y el grado de hinchamiento que este mismo presenta. (Martínez Martínez, 2016)

#### 1.2.1.3. Liberación controlada químicamente

Existen diferentes estímulos físicos químicos y biológicos que son capaces de alterar las propiedades de los hidrogeles. Esta capacidad de influir en sus características hoy puede usarse para llevar a cabo una liberación controlada del fármaco deseado. Estos estímulos pueden ser tanto externos como internos. Entre los estímulos internos se encuentran variaciones en el PH el potencial redox o la temperatura entre otros. En definitiva, son aquellos que producen modificaciones dentro del cuerpo. De manera contraria, los estímulos externos son, entre otros la luz o los ultrasonidos de manera que estos crean modificaciones en los estímulos indicados anteriormente.

Una manera de modificar este tipo de liberación se basa en la integración de grupos funcionales capaces de percibir las modificaciones dentro de los entornos fisiológicos.

No obstante, este entorno es complejo y existen hidrogeles con capacidad de respuesta única. Este tipo de hidrogeles puede no llegar a alcanzar la finalidad deseada. Por ello, el uso de materiales poliméricos capaces de dar una respuesta a diversos estímulos supone una innovación a la hora de diseñar los sistemas de liberación. De esta manera un solo polímero conseguiría una especificidad elevada. (Ruiz et al., 2022) (Fu et al., 2018).

### 1.2.2. Hidrogeles de fibroína de seda

Gracias a su versatilidad y su potencial para diversas aplicaciones, la FS ha provocado un gran interés en el campo de la ingeniería en los tejidos. Esta proteína puede disolverse en una solución acuosa seguida de una reconstrucción de su estructura en diferentes formas de material de manera sencilla. Esto la convierte en una atractiva opción para la construcción de andamios y matrices en la ingeniería tisular. (Sun et al., 2021)

Cuando la FS es llevada a forma de hidrogel se produce una combinación de las propiedades de ambos. Es decir, se combinan las propiedades de la FS como su biocompatibilidad o su biodisponibilidad con las características propias del hidrogel para la liberación de medicamentos. Como resultado, se obtienen materiales capaces de dar respuesta al entorno que lo rodea. (Jiang et al., 2021)

## 1.3. El ojo

### 1.3.1. Composición

El ojo es uno de los órganos más importantes ya que más de la mitad de la información recibida del entorno es percibida gracias a este órgano. Se trata de un sistema óptico de forma esférica rodeado de una capa exterior de tejido conectivo, la esclerótica.

Las diferentes estructuras dentro del globo ocular pueden dividirse en tres capas de revestimiento y contenido intraocular. De fuera a dentro, estas capas son:

- La capa externa, formada por la conjuntiva, la esclerótica y la córnea
- La capa media, también conocida como úvea
- La capa interna o retina.

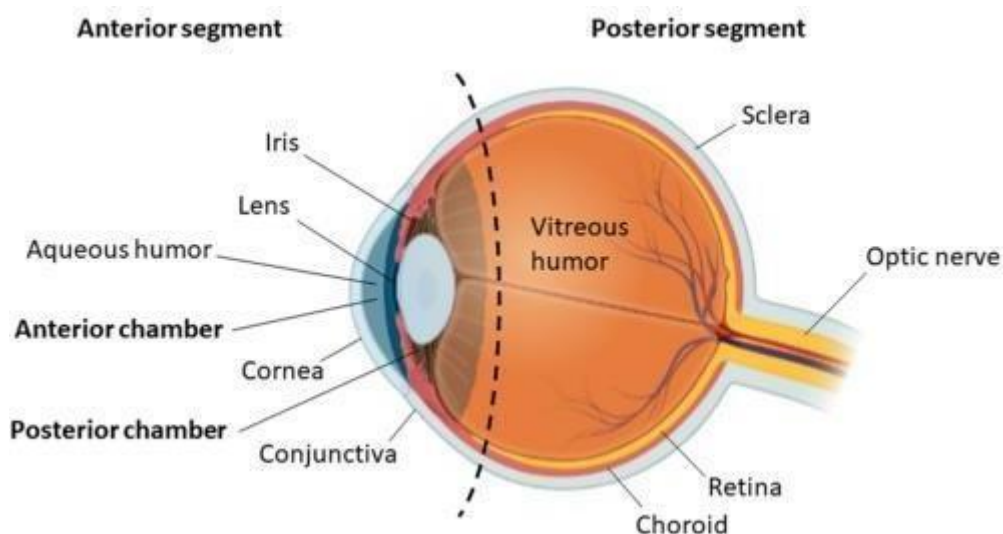
Con el propósito de simplificar su análisis, se hace referencia a dos secciones del globo ocular. Estas secciones se denominan el segmento anterior y el posterior. El segmento anterior comprende desde la córnea hasta el cristalino, mientras que el segmento posterior se encuentra detrás del cristalino (**Figura 1.2**). (Pérez, 2015)

En primer lugar, aparece la capa externa del ojo, formado por la conjuntiva, la esclerótica y la córnea. La conjuntiva es una membrana mucosa que envuelve la región frontal del ojo, desde el límite entre la esclerótica y la córnea hasta el área interna de los párpados. Está compuesta por dos partes: la conjuntiva bulbar, que cubre la superficie externa del ojo, y la conjuntiva tarsal, que recubre la superficie interna de los párpados. (Álvaro Martínez, 2020).

La esclerótica es la también conocida como parte blanca el ojo. Se trata de un tejido conectivo denso del globo ocular. Por último, la córnea es una capa clara que permite el paso de los rayos luminosos del exterior al interior hasta que inciden en la retina. Es una estructura transparente y convexa.

En segundo lugar, la úvea, formada por la coroides, el iris, el cuerpo ciliar y el cristalino. La coroides es una capa formada por vasos sanguíneos y tejido conectivo que se encuentra entre la esclerótica y la retina. Su función es suministrar nutrientes a las partes internas del ojo. Seguidamente se encuentra el iris, un diafragma que dispone de una apertura llamada pupila. Esta apertura presenta la función de controlar la cantidad de luz que accede al interior del ojo de forma que se dilata con poca luz y se contrae cuando hay una luz excesiva. El iris define el color del ojo, ya que es una estructura pigmentada capaz de controlar el diámetro de la pupila de manera automática. A continuación, se encuentra el cristalino. El cristalino presenta una forma de lente biconvexa de consistencia elástica. Esta capacidad permite ver de lejos o enfocar objetos que se encuentran cerca.

Finalmente, se encuentran la retina, el humor acuoso y el humor vítreo (HV) que conforma la capa interna del ojo. La retina es la capa más interna, con la llegada de la luz sus receptores son capaces de transformarlo en corriente eléctrica. Dicha corriente será transportada por el nervio óptico hasta el cerebro. (Ferreruela, 2007) Dentro de la retina se encuentra la mácula, un área especializada encargada de la visión central. Ahí se encuentran altas concentraciones de fotorreceptores. El HV se trata de un líquido transparente que se encuentra entre el cristalino y la retina. Se encuentra en contacto directo con la retina, lo cual lo hace un buen medio de administración de factores. Además, destaca su capacidad de mantener la forma del glóbulo ocular. (Aracón et al., 2014)



**Figura 1.2:** Anatomía del ojo de vertebrados. Se divide en los segmentos principales: anterior y posterior. El segmento anterior incluye: Conjuntiva, cornea, humor acuoso, lente e iris. El segmento posterior incluye: Coroides, esclerótica, retina y nervio óptico. (Hidalgo-Alvarez et al., 2021)

La expresión denominada como “privilegio inmunitario” hace referencia a las características únicas a nivel anatómico de la sangre y la ausencia de drenaje linfático de manera directa. (Taylor, 2009) Este privilegio tiene el propósito de brindar al ojo una protección inmunológica de manera que se reduzca al mínimo el riesgo de inflamación intraocular, preservando la integridad de la visión. Tanto el ojo como el sistema inmunológico llevan a cabo diversas estrategias para mantener dicho privilegio. Estas estrategias implican la regulación de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa, la tolerancia periférica por parte de los antígenos derivados del ojo y la creación de un microambiente inmunosupresor alrededor del ojo. (Keino et al., 2018)

### 1.3.2. Patologías y tratamientos

Entre la amplia variedad de afecciones oculares, existen algunas más comunes entre la población. Entre ellas se encuentran los errores en la refracción (graduación) o aquellas patologías que afectan a la retina, la mácula y el cristalino.

Las más comunes son:

- Cataratas: Condición en la cual el cristalino se vuelve opaco, causando una visión borrosa o distorsionada. (Nimazi & Gulani, 2022)
- Degeneración macular relacionada con la edad (DMAE): La mácula se deteriora con el tiempo causando la pérdida de la visión central.
- Glaucoma: Enfermedad en la que el daño al nervio óptico causa pérdidas de la visión periférica.
- Retinopatía diabética: Se trata de una complicación de la diabetes en la cual los vasos sanguíneos de la retina se dañan lo cual puede terminar en la pérdida de la visión. (Bourne et al., 2021)

Tanto las enfermedades locales como las sistémicas son capaces de afectar a diferentes áreas del ojo, lo que puede dar lugar a una serie de problemas visuales y a diversas complicaciones. Con la finalidad de contrarrestar los efectos de estas enfermedades oculares, se utilizan diferentes formas de administración de medicamentos. Entre las opciones menos invasivas se encuentran las formulaciones tópicas, como los colirios, y las sistémicas, como comprimidos. Estos tratamientos suelen ser eficaces frente a las patologías que afectan al segmento anterior ocular, como las enfermedades de la córnea y del iris.

No obstante, el ojo presenta un sistema de defensa y protección muy efectivo. Este sistema puede limitar la penetración de los fármacos y reducir su biodisponibilidad. La película lagrimal, la estructura y las propiedades de la córnea son algunas de las barreras que resultan un impedimento a la hora de administrar medicamentos a través de formulaciones tópicas. Además, las capas tisulares de la córnea y la conjuntiva también hacen que la penetración de fármacos en el ojo se encuentre obstaculizada. Estos biomateriales presentan características que les permite aumentar la viscosidad del fármaco o que presentan la capacidad de adherirse a la superficie ocular. Esto da lugar a una

biodisponibilidad limitada y abre las puertas a la necesidad de administrar dosis más altas para lograr el efecto terapéutico deseado. (Lorca Abajo, 2020) (Awwad et al., 2017)

Por otro lado, la administración en el segmento posterior ocular presenta desafíos adicionales. En este segmento, las barreras tanto físicas como químicas son más significativas. Esto conlleva una dificultad en la entrega precisa y eficiente de los fármacos.

Para abordar este problema, la técnica más comúnmente utilizada es la inyección intravítrea. Este método consiste en la introducción directa de medicamentos en el HV del ojo. Gracias a su efectividad, esta técnica se emplea en tratamientos de diversas enfermedades como la DMAE y la retinopatía diabética.

Aunque las inyecciones intraoculares han sido beneficiosas, su efecto terapéutico suele ser de corta duración. Esta duración requiere la administración periódica y repetida de las inyecciones, generando incomodidad y molestias para el paciente. Además, esto puede generar un mayor riesgo de complicaciones, como endoftalmitis o desprendimiento de retina. Por lo tanto, es necesario seguir investigando y desarrollando nuevas formas de administración de fármacos en el segmento posterior del ojo que sean más eficientes y seguras. (Lorca Abajo, 2020)

Las inyecciones se realizan en el HV. El HV es un gel fluido incoloro y transparente (Monteiro et al., 2014) que forma el 80% del volumen interior del ojo. Está compuesto en un 99% de agua y el resto de una mezcla de colágeno, proteínas, sales, aniones, cationes, iones y trazas de ácido hialurónico. Además, la presión que ejerce sobre la retina permite a esta mantenerse en su lugar. El HV se forma durante la fase embrionaria y no se renueva. Debido a esto, su viscosidad se ve reducida con la edad del sujeto de manera que el 80% del HV es gel en adultos jóvenes, pero, con el tiempo, la parte líquida del HV se convierte en el 80% del total. (Noia et al., s. f.) Actualmente, la manera más eficaz de insertar un medicamento en el humor vítreo del paciente es a través de dichas inyecciones intravítreas.

Recientemente, se han desarrollado sistemas intraoculares de liberación controlada. Estos sistemas presentan una ventaja significativa en comparación con las inyecciones intravítreas, ya que con una sola administración se logra un efecto terapéutico comparable a múltiples dosis de las inyecciones. Este enfoque revolucionario permite una liberación gradual y sostenida del medicamento en el ojo. Esto se representa con una mejora de la comodidad del paciente y una disminución de la dosis necesaria para el tratamiento ocular. (Guillermo Lucas & Montoro Moreno, 2016)

#### **1.4. Objetivos**

El objetivo principal es la creación de un hidrogel de fibroína de seda que presente las características idóneas para la encapsulación de moléculas bioactivas de manera que, al inyectarse en el tejido/órgano diana, sea capaz de actuar de forma directa.

Objetivos secundarios:

- Desarrollar un hidrogel de fibroína de seda para la administración *in situ* de moléculas en el tejido/órgano dañado
- Estudiar la estabilidad de los hidrogeles en un ambiente patológico semejante al tejido diana en el que serán implantados
- Determinar las propiedades mecánicas de los hidrogeles de fibroína de seda bajo diferentes condiciones experimentales

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Obtención del hidrogel de fibroína de seda

#### 2.1.1. Obtención de la FS

El procedimiento descrito se realizó con el objetivo de preparar una muestra de FS funcionalizada para su posterior uso en experimentos. Para ello, se siguieron varios pasos. En primer lugar, la fibroína de seda funcionalizada al 0,5 se esterilizó mediante calor seco a una temperatura de 160 °C durante 2 horas.

Una vez esterilizada, se introdujo en el congelador a una temperatura de -50°C durante 2 horas. Al finalizar este tiempo, se procedió a disolver la fibroína de seda al 2% en una solución salina estéril (PBS), asegurándose de obtener una mezcla homogénea.

Posteriormente, la mezcla se centrifugó (*Hettich Centrifuge Rotina 380R*) a 4 °C durante 30 minutos a una velocidad de 5000 rpm, con el objetivo de separar los componentes y obtener una muestra más purificada.

#### 2.1.1. Creación del hidrogel de FS

Una forma de controlar el proceso de gelificación es someter la FS a un proceso de sonicación. (Lucía Meler García, 2015). Para realizar la sonicación de la muestra, se preparó un molde cilíndrico en el sonicador (*Branson Digital Sonifier 450 cell disruptor*) y se agregó agua destilada a una temperatura controlada entre 45-47 °C alrededor del molde. La muestra se introdujo en el molde y se aseguró la punta del sonicador, verificando su correcta sujeción con una llave inglesa.

A continuación, se añadió la rodamina en aquellos hidrogeles que se utilizaron para el estudio de degradación del hidrogel en los diferentes grupos experimentales. Por ello, en dichos hidrogeles se mantuvieron todo el proceso en oscuridad.

La sonicación se llevó a cabo durante 12 minutos, permitiendo una dispersión y homogeneización adecuada de los componentes.

Una vez finalizada, se utilizó una pipeta para resuspender la muestra y verter el contenido en una Placa Petri. Dicha placa fue previamente envuelta en papel de aluminio para mantener la oscuridad y evitar alteraciones en los componentes sensibles. La placa con la muestra se incubó en una incubadora (*CO2 Thermo Scientific 3111 Water Jacket*) durante 24 horas, permitiendo que los componentes se asienten y estabilicen.

Transcurrido el tiempo de incubación, la placa con la muestra se almacenó en la nevera para su posterior uso, asegurando la conservación adecuada de la muestra.

#### 2.1.2. Corte de hidrogeles de fibroína de seda

Para la obtención del hidrogel de FS, se cortó el hidrogel de laplaca p100 inicial con un sacabocados de 3mm de diámetro previamente lavado en etanol durante 30 minutos.

## **2.2. Obtención del medio activado**

En el estudio realizado, se empleó la línea celular BV2, que corresponde a una línea celular microglial inmortalizada obtenida de ratones (Timmerman et al., 2018). Deriva de la microglía neonatal murina raf/myc-inmortalizada. (Sanchez Micó, 2019) Estas células son parte del sistema inmunitario y se encuentran presentes en el cerebro y la médula espinal. La elección de la línea celular BV2 se debe a que es una línea microglial ampliamente utilizada en estudios científicos, principalmente porque presenta funciones similares a las de la microglía primaria. Las células BV2 son consideradas un sustituto adecuado este tipo de investigaciones. Su uso ha demostrado ser valioso en diferentes procesos fisiológicos y patológicos en el sistema nervioso.

### **2.2.1. Descongelar células BV2**

Para descongelar las células, se llevó a cabo un proceso de incubación en agua destilada durante 1 minuto. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 de las células utilizando medio DMEM (Dubelcco's Modified Eagle medium: Nutrient Mixture F12) (1:1, 12634010, Gibco). Esta dilución permitió obtener una concentración adecuada de células para su posterior uso.

### **2.2.2. Cultivo de la línea celular**

Se cultivó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo rico en glucosa (Dubelcco's Modified Eagle medium: Nutrient Mixture F12) (1:1, 12634010, Gibco) con un 10% de suero fetal bovino (FBS, 10100, Gibco), un 1% de penicilina/ estreptomycin (P/S)(15140122, Gibco) y un 1% de L- glutamina (Glu)(G7513, Sigma). Las células crecieron en placas p100, con cambio de medio cada 2-3 días hasta alcanzar la confluencia deseada (80%).

### **2.2.3. Siembra de células**

Una vez alcanzada la confluencia deseada, se procedió a realizar la siembra de las células en placas p24. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de extracción (*LabGard ES UN-540 Class II Type A2 biosafety cabinet*) para garantizar la esterilidad.

Para iniciar la siembra, se lavaron las células con 3 mL de solución PBS y se retiró. Luego, se añadió 1 mL de tripsina-EDTA 0,05% (25300062, Gibco) a las células y se dejó incubar 5 - 15 minutos para permitir el desprendimiento de las células de la superficie de la placa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Seguidamente, se agregaron 3 mL de medio de cultivo DMEM (1:1, 12634010, Gibco) y se resuspendió suavemente, asegurándose de cubrir toda la superficie de la placa. A continuación, el medio y las células fueron recogidos en un tubo Falcon (*10263041, Cell Culture Flask. Fisher Scientific*) y se centrifugó (*Hettich Centrifuge Rotina 380R*) durante 5 minutos a una velocidad de 1250 rpm a 4°C.

Tras la centrifugación, se retiró el medio sobrenadante y se añadió 1 mL de medio sin rojo fenol al sedimento celular, resuspendiéndolo para obtener una suspensión homogénea. Con el fin de determinar el número de células presentes en la muestra, se realizó un conteo utilizando una Cámara de Neubauer, que permite calcular la concentración celular. Se sembraron 25.000células/pocillo.

#### 2.2.4. Activación de células

Para la obtención de medio patológico, se llevó a cabo la activación de las células BV2. En primer lugar, se retiró el medio presente en la placa y se realizó un lavado celular con PBS. Seguidamente, se activaron con medio suplementado con 1% P/S, 1% Glu y 2% FBS introduciendo 500 µl de dicho medio en cada pocillo de una placa p24. Para conseguir la activación celular, se añadieron 100ng/mL de lipopolisacárido (LPS) para la estimulación del sistema inmune.

##### 2.2.4.1. Medida de la activación celular

Tras 48h, se midió la activación celular a través de la absorbancia gracias a un lector de microplacas (*Biotek 800 TS Absorbance Reader*) a una longitud de onda de 490 nm. Para ello, se realizó una recta de calibrado previa para obtener la concentración necesaria para validar como correctamente activado el medio. Se utilizó un medio activado con una absorbancia de 0.98.

### **2.3. Obtención de humor vítreo de cerdo**

#### 2.3.1. Extracción del humor vítreo

El ojo de cerdo utilizado para la extracción de HV fue cedido por el Instituto de Investigación Hospital Universitario de la Paz. En el proceso de extracción del HV, se colocó cuidadosamente el ojo en una placa Petri para eliminar cualquier rastro de grasa indeseada. Luego, se procedió a levantar la córnea y extraer el cristalino utilizando tijeras y pinzas de manera precisa. Finalmente, se logró obtener el HV ejerciendo presión sobre el ojo. Debido a su consistencia gelatinosa, fue necesario realizar múltiples resuspensiones, de 10 a 11 veces, para homogeneizar su textura antes de su uso.

### 2.3.2. Dilución de humor vitreo de cerdo

Se disolvió el HV al 25% con medio DMEM suplementado con 1% P/S, 1% Glu y 2% FBS. Se resuspendió la muestra hasta la obtención de una solución homogénea.

## 2.4. Caracterización de hidrogeles de FS en diferentes grupos experimentales

Para los diferentes ensayos con los hidrogeles de FS, se crearon 5 grupos experimentales. En primer lugar, como control positivo se utilizó una concentración de 0,6 u /mL de proteínasa K disuelta en medio DMEM suplementado con 1% P/S y 1% Glu, este grupo se denominó (E). El segundo grupo (O), se trata del control negativo en el cual se utilizó medio DMEM con 1% P/S 1% Glu y 2% FBS. En tercer lugar, se utilizó el medio activado obtenido del crecimiento de las células BV2 (P). Como cuarto grupo experimental, se disolvió el HV extraído de cerdo en medio DMEM suplementado con 1% P/S 1% Glu y 2% FBS al 23% (HVN). Por último, se disolvió el HV extraído en el medio activado obtenido anteriormente (HVP).

Todos los grupos anteriores presentaban una réplica de  $n = 8$ . Asimismo, cada réplica de cada grupo presentaba un hidrogel de FS a partir del cual se analizaban los diferentes comportamientos. Para asegurar unas condiciones de mantenimiento correctas, las muestras se mantuvieron en la incubadora hasta el momento de su análisis.

### 2.4.1. Ensayos de propiedades mecánicas y análisis de estructuras secundarias del hidrogel

#### 2.4.1.1. Preparación de los hidrogeles

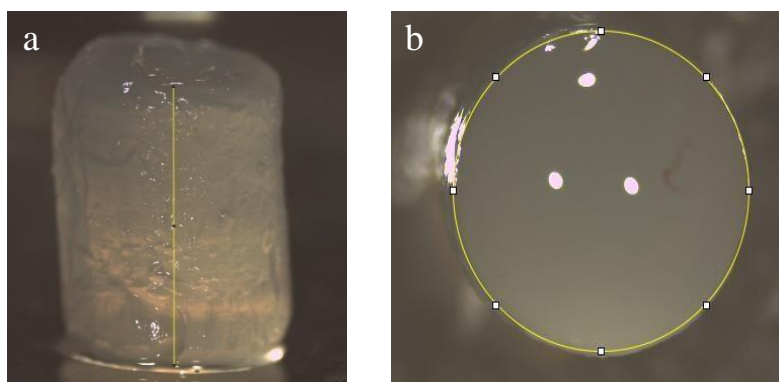
En el momento previo al tiempo de análisis, se llevó a cabo la preparación en cada muestra. En primer lugar, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente, evitando cualquier daño al hidrogel. A continuación, se agregó 1 mL de PBS a cada muestra, permitiendo un lavado durante 5 minutos. Este lavado se repitió dos veces. De esta manera, se asegura una eliminación completa de cualquier residuo. En la tercera repetición, se dejó el PBS en contacto con los hidrogeles durante 30 minutos, favoreciendo una hidratación adecuada. Finalmente, se retiró el PBS y se reemplazó con una nueva solución fresca de PBS, la cual mantendrá los hidrogeles hidratados durante el análisis. Es importante destacar que, en esta etapa del experimento, el PBS no necesita ser estéril, ya que la esterilidad ya no es un requisito necesario.

#### 2.4.1.2. Medida de las dimensiones del hidrogel

Se retiró el PBS de la muestra con el hidrogel. Seguidamente el hidrogel se introdujo en una placa Petri p1000 para poder realizar las diferentes fotografías a través de un microscopio (*Leica EZA HD Stereo Microscope*).

En primer lugar, se ajustaron los diferentes parámetros: se utilizó un brillo del 33%, una saturación del 98% y Gamma del 1%. Seguidamente, se tomaron imágenes de un calibrador con los diferentes parámetros ajustados. A continuación, se tomaron dos imágenes diferentes de cada hidrogel. Una de las imágenes se tomó de la altura del hidrogel mientras que la otra imagen se tomó de la base de esta. (**Figura 2.1**) Una vez tomadas las imágenes, cada una de ellas fue introducida en el *software imageJ* (*Wayne Rasband (NIH)*) para su análisis.

Para el análisis de la primera imagen, se trazó una línea recta vertical de la altura del hidrogel. En la segunda imagen, se midió el área de la base con un círculo. Una vez obtenidos ambos resultados, se calculó la dimensión de cada hidrogel. Las imágenes fueron tomadas tras 24 horas de contacto con los diferentes medios, tras 7 días y tras 14 días.



**Figura 2.1:** Grupo experimental P el día 7 del experimento. Figura a: Imagen tomada de la altura del hidrogel con recta trazada en *Image J* para medir la altura. Figura b: Imagen tomada de la base del hidrogel con círculo trazado en *Image J* para la medida del área de la base del hidrogel. para la determinación de sus dimensiones con microscopio.

#### 2.4.2. Análisis de la estructura secundaria y láminas beta del hidrogel de FS

Para llevar a cabo el análisis de las estructuras secundarias presentes en hidrogel, se utilizó el programa *Fourier-transform infrared spectroscopy* (fTIR) Nicolet Is5 (ThermoFisher, Estados Unidos). Este programa ofrece información relevante sobre la composición bioquímica del hidrogel y las modificaciones que sufre en un estado patológico. (Fadlelmoula et al., 2022) Este programa es capaz de medir la absorbancia infrarroja de la sustancia que se posa en el cristal.

En primer lugar, se tomaron las medidas del PBS no estéril como fondo. De esta manera, se evitó plasmar el ruido en las diferentes gráficas. Para la obtención de las diferentes gráficas se sellaron unos límites de 8 picos requeridos para el análisis. Dichos picos gaussianos se tomaron a una longitud de: 1600, 1615, 1624, 1632, 1641, 1660, 1680, 1700. Además, se limitó la región entre 1715 barra 1593 cm<sup>-1</sup>. Se colocó la muestra en la base y se aseguró con el punzón de precisión. Además, se lavó el cristal con PBS no estéril y se tomó las medidas de este como fondo cada vez que se realizaba un cambio de grupo experimental. De esta manera, se disminuyeron los errores posibles.

Una vez obtenidas las diferentes gráficas de todas las muestras, se analizaron los datos en Paquete Estadístico de las Ciencias Sociales/ *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) (IBM Corp. Released 2021. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 28.0. Armonk, NY: IBM Corp). Se analizaron las muestras en el día 0, día 7 y día 14.

#### 2.4.3. Obtención de propiedades físico-mecánicas del hidrogel de FS

Para la detección de los cambios en las propiedades mecánicas del hidrogel tras su contacto con los diferentes grupos experimentales se realizaron los ensayos mecánicos con una máquina Universal de ensayos Instron 4411 (**Figura 2.2**) junto con una balanza de precisión modelo PRECISA XT 220 A. Esta balanza, que presenta una resolución de 0,1 mg fuerza, se conectó a un ordenador con un programa para la obtención de los datos del peso frente a tiempo propios de los ensayos de tracción. Los ensayos se realizaron bajo condiciones nominales tanto de temperatura como de humedad relativa. (Perea Abarca, 2010)



**Figura 2.2:** Máquina Universal de ensayos Instron 4411. Compuesto por un bastidor, cabeza de carga, actuador, celda de carga, Software de control y dispositivo de sujeción.

Una vez realizado el ensayo de tracción en el día 0 y día 7 del experimento, se llevó a cabo el análisis de los datos obtenidos con el *Software MATLAB* (MATLAB. (2010). Versión 7.10.0 (R2010a). Natick, Massachusetts: The MathWorks Inc.).

## 2.5 Degradación de hidrogeles

Aquellos hidrogeles que presentaban un marcador fluorescente, la rodamina B, fueron utilizados para medir la degradación del hidrogel. En esta situación, se utilizaron 8 grupos experimentales. El primer grupo experimental (E), se trataba del control positivo. Un hidrogel de FS con rodamina, con 0,6 u/mL de Proteinasa K en medio DMEM suplementado con 1% P/S y 1% Glu. El segundo grupo experimental (O), fue únicamente medio DMEM suplementado con 1%P/S, 1%Glu, 2%FBS. El tercer grupo (Ofs), incluía el hidrogel de FS con rodamina en medio DMEM suplementado con 1%P/S,1%Glu Y 2%FBS. El cuarto grupo (Pfs), se trataba del hidrogel de FS con rodamina en medio activado. Además, se utilizó un grupo con medio DMEM suplementado con 23%HV, 1%P/S, 1%Glu y 2%FBS (HVN) y otro grupo (HVP) con medio activado suplementado con 23%HV. El siguiente grupo (HVNfs) se trataba del hidrogel de FS con rodamina en medio DMEM suplementado con 23%HV, 1%P/S, 1%Glu y 2%FBS. Otro grupo (HVPfs), el hidrogel de FS con rodamina en medio activado suplementado con 23%HV. Cada 1 de los grupos presentaba una replicación de n=8. Se observó la degradación en diferentes tiempos, el día 0, día 1, día 3, día 7 y día 14.

### 2.5.1 Control visual de la degradación

Se llevó a cabo un control visual de las imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51 System Microscope Ballerup, Dinamarca) equipado con los filtros U-MNU (360-370), U-MWIY (545-580) y U-MWIBA (450-480). Dicho microscopio muestra, a través de la excitación del fluorocromo (en este caso, la rodamina) la longitud de onda roja. Para la toma de las imágenes se fijaron los diferentes parámetros: exposición 764, ganancia 10%, gamma 3,75, pseudocolor 666. Se tomaron 3 imágenes aleatorias de cada pocillo. De esta manera, se obtuvo una idea global de la degradación de la fibroína de seda en los diferentes grupos experimentales en los tiempos seleccionados a partir de la fluorescencia detectada en las imágenes.

### 2.5.2 Degradación del hidrogel mediante el porcentaje de fluorescencia

Se realizó, de manera paralela, dos experimentos con similares condiciones y grupos experimentales. Se tomaron imágenes de los diferentes grupos experimentales con un fluoroscopio. Este dispositivo permite tomar imágenes en tiempo real. Para observar la degradación a través de la medida de la fluorescencia en cada uno de los grupos, una vez obtenidas las imágenes fueron introducidas en el *Software ImageJ*.

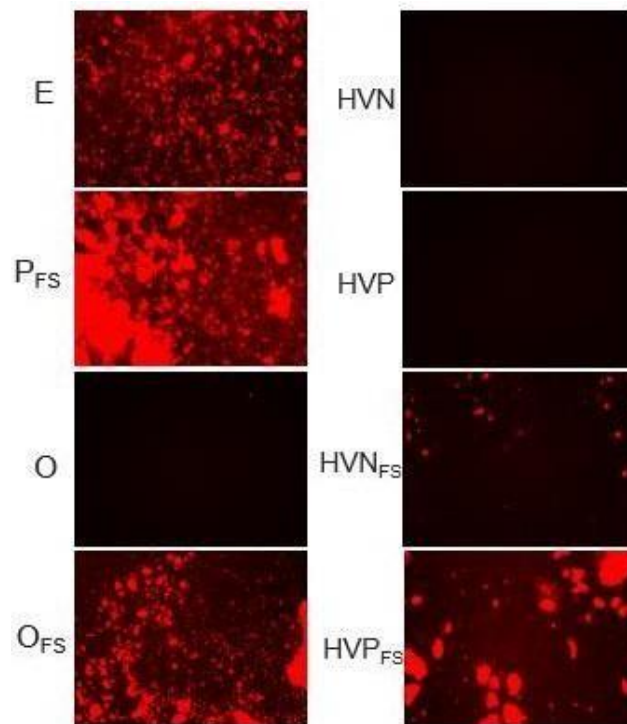
Se tomó el área del pocillo entero descartando el hidrogel de fibroína de seda. Una vez obtenido el promedio de cada grupo experimental, se restó el promedio del grupo o a los grupos experimentales E, Ofs y Pfs. Asimismo, para los grupos HVNfs y HVPfs se les restó el promedio de los grupos HVN y HVP respectivamente. A partir del resultado obtenido del porcentaje de fluorescencia de cada grupo y se realizaron las gráficas en SPSS.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Degradación hidrogel

#### 3.1.1. Evaluación visual

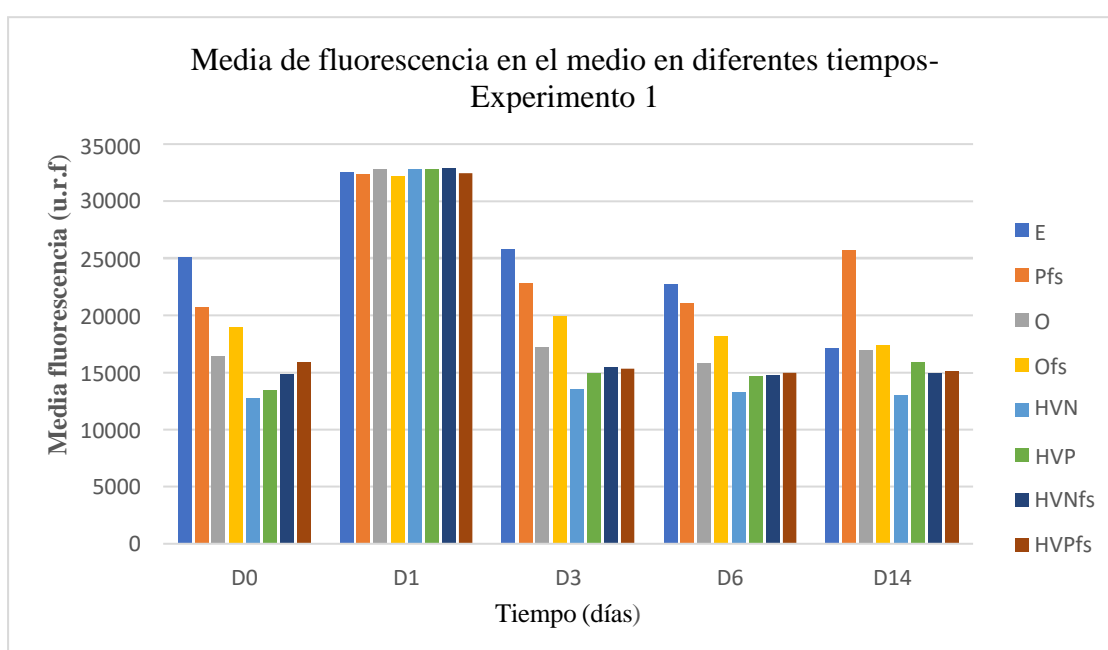
Se observó el aspecto microscópicamente de cada hidrogel con la finalidad de obtener una idea inicial de la fluorescencia en los diferentes grupos experimentales. Como se muestra en la **Figura 3.1**, el grupo que contiene la proteinasa K (E) presenta una elevada cantidad de fluorescencia. Esto indica que la enzima es capaz de degradar el hidrogel de manera que así podemos comprobar cómo reacciona ante el resto de los grupos experimentales. Si realizamos una comparativa entre el grupo Ofs y el grupo que presenta el medio activado con FS, Pfs, podemos observar cómo en este segundo aumenta la fluorescencia. Esto indicaría que existe un mayor grado de degradación del hidrogel cuando se encuentra en un ambiente patológico. Además, los grupos que presentan el medio con HV y el hidrogel presentan la misma diferencia. De manera contraria, se puede visualizar como en este caso hay menos fluorescencia en ambos grupos lo cual indica una menor degradación del hidrogel.



**Figura 3.1:** Imágenes de la fluorescencia (rojo) en el día 6 de los hidrogeles de FS en los grupos experimentales: E, HVN, Pfs, O, HVNfs, Ofs y HVPfs. Tomada con microscopio de fluorescencia.

### 3.1.2. Degradación del hidrogel de FS a través de la fluorescencia.

Tras la realización de un control visual de las muestras, se realizó el cálculo de la media fluorescencia presente en cada grupo experimental en los tiempos determinados. En la **figura 3.2** se muestra la comparativa entre los grupos experimentales y la fluorescencia debida a la degradación de los hidrogeles por día y grupo experimental del experimento 1. Los resultados revelaron un aumento en la fluorescencia en el medio activado con fibroína de seda (Pfs), mientras que se observaron niveles similares en los grupos con HV. Por otro lado, el control positivo mostró una disminución gradual en la degradación a medida que pasaba el tiempo a diferencia de otros estudios donde la variación del hidrogel presentó un aumento constante de la degradación (Yonesi et al., 2023). Esto indica que la efectividad de la enzima disminuye con el tiempo en el ambiente seleccionado.

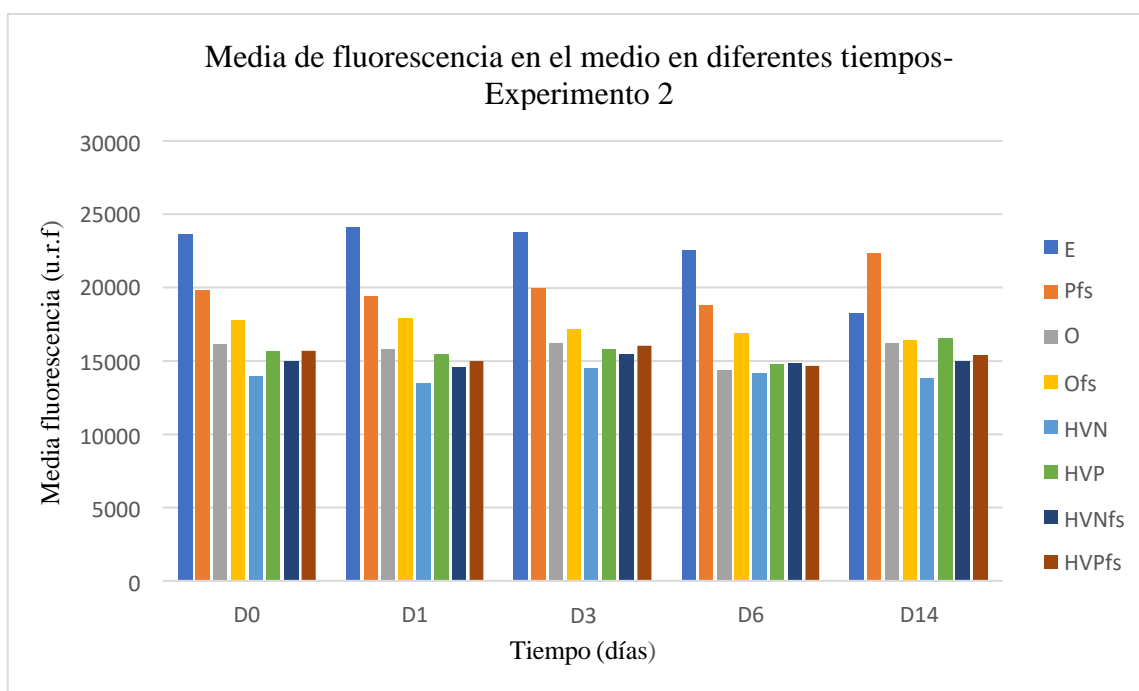


**Figura 3.2:** Representación de la media de la fluorescencia de las muestras en los diferentes tiempos y grupos experimentales en el experimento 1. Se agrupan en los tiempos (día 0, 1, 3, 6 y 14) los grupos experimentales (E, Pfs, O, OfS, HVN, HVP, HVNfs, HVPfs) para comparar la media de fluorescencia presente en cada grupo.

Se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos a través de una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar si existían diferencias significativas entre los grupos analizados. El valor de p asociado a la variación entre grupos era mayor que

el nivel de significancia predefinido ( $\alpha = 0.05$ ). Esto indica que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las diferentes medidas de los datos. Por ello, el hidrogel no sufre variación en la degradación del hidrogel si se encuentra en ambiente patológico o por lo contrario en un ambiente condicional. Por otro lado, la interpretación cualitativa de los datos nos muestran una disminución de la actividad grupo E, como se ha indicado anteriormente.

Para asegurar la reproducibilidad del experimento, se realizó un segundo experimento al mismo tiempo replicando las mismas condiciones. En la **figura 3.3** se muestra la comparativa entre los grupos experimentales y la fluorescencia debida a la degradación de los hidrogeles por día y grupo experimental del experimento 2. En este caso, el grupo E sigue presentando una disminución de la fluorescencia, aunque la caída es menos pronunciada. En el resto de los grupos, la fluorescencia se mantiene prácticamente similar con el paso de tiempo. Se realizó un análisis estadístico ANOVA para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los grupos experimentales. Al igual que en el experimento 1, el valor p asociado a la variación fue mayor que el nivel de significancia predefinido.



**Figura 3.3:** Representación de la media de la fluorescencia de las muestras en los diferentes tiempos y grupos experimentales en el experimento 2. Se agrupan en los tiempos (día 0, 1, 3, 6 y 14) los grupos experimentales (E, Pfs, O, Ofs, HVN, HVP, HVNfs, HVPfs) para comparar la media de fluorescencia presente en cada grupo.

Realizando una comparativa entre ambos experimentos, tanto en el experimento 1 como en el experimento 2 se observa un descenso de la degradación del hidrogel del FSen la proteinasa K en el transcurso de los días. A modo diferencial entre ambos experimentos, en el experimento 1 se observa una elevación de la fluorescencia en día 1. Este aumento no se observa en el experimento 2. Observando de manera más detenida el grupo

experimental E, tanto en la **figura 3.2** como en la **figura 3.3** sufre un descenso del porcentaje medio a lo largo del tiempo. De manera general, esto es el resultado esperado ya que la proteínasa K tiene la función de degradar el hidrogel dando lugar así a un aumento de la fluorescencia. Este aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de degradación. Por ello, podemos concluir que el grupo funcional de la proteínasa K no funcionaba adecuadamente.

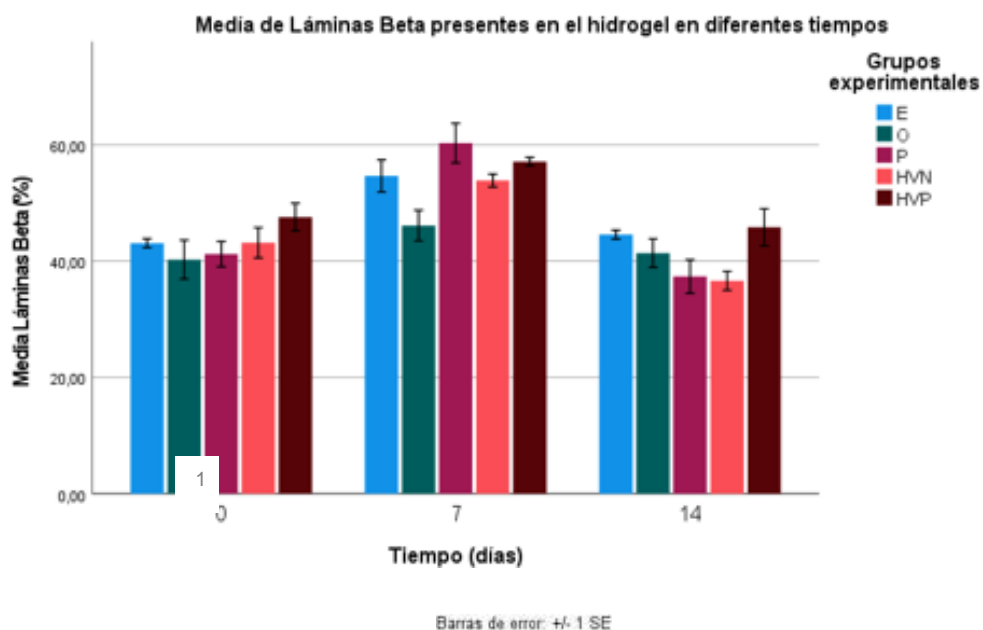
Esto puede deberse a dos factores. En primer lugar, que la cantidad de enzima sea inadecuada de manera que si la enzima es demasiado baja no podría degradar el hidrogel. Esta hipótesis fue descartada ya que en el resto de los experimentos la misma concentración de la enzima si presentaban la degradación esperada (Yonesi et al., 2023). En segundo lugar, este descenso en la actividad de la proteínasa K puede deberse a una inactivación de la enzima. Esto puede haberse llevado a cabo por compuestos presentes tanto en la muestra como en el entorno de trabajo.

Observando el grupo del medio activado con la fibroína de seda, en la **figura 3.3**, se observa un crecimiento elevado del mismo transcurridos 14 días. Si comparamos dicho grupo con el grupo que presenta las mismas condiciones con HV se observa que este segundo experimenta un crecimiento limitado. Esto nos lleva a poder concluir que uno de los efectos del HV podría ser que ralentiza la degradación del hidrogel en un ambiente patológico. De este modo, se podría llevar a cabo un control más preciso de la liberación de la molécula terapéutica.

### **3.2. Estructuras secundarias del hidrogel**

Una variación en las estructuras secundarias del hidrogel de FS indican un cambio tanto en las características como en la organización de las proteínas presentes. Estas variaciones a nivel molecular una variación en la ordenación y la estabilidad del hidrogel.

En este apartado, examinaremos la variación en las estructuras secundarias del hidrogel en función del tiempo transcurrido desde el contacto del hidrogel con los diferentes tipos de medio. Como puede observarse en la **Figura 3.4**, de manera general, el porcentaje de láminas beta en todos los grupos sufre un crecimiento entre los días 0 y 7 seguido de un descenso desde el día 7 hasta el 14. Este último porcentaje es muy similar al porcentaje inicial de láminas beta en el hidrogel.



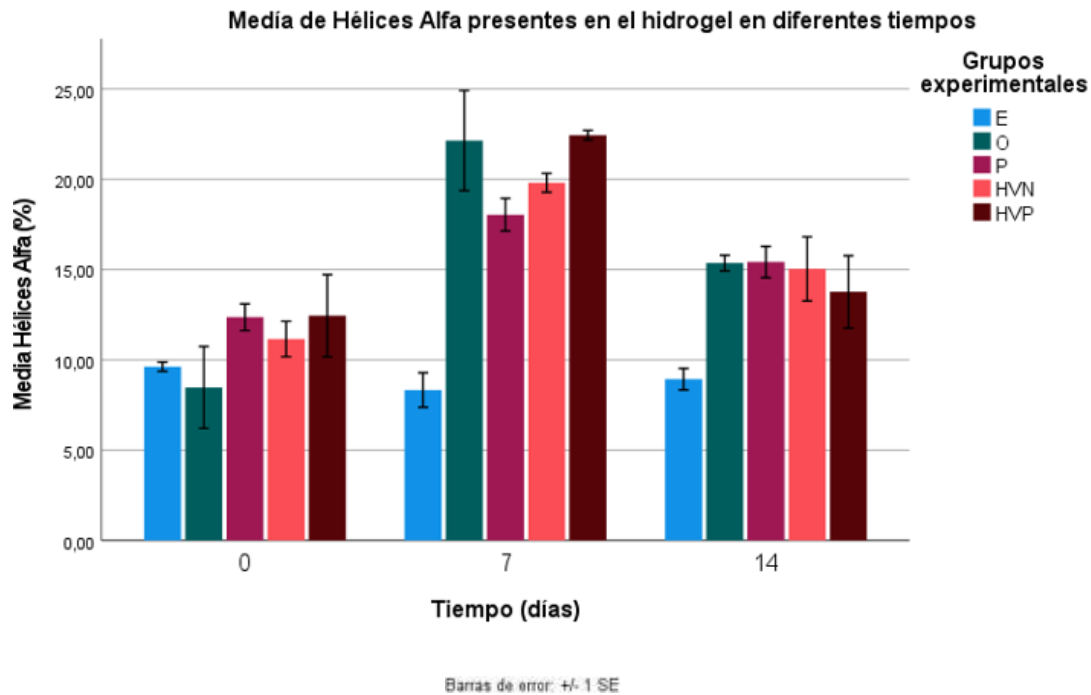
**Figura 3.4:** Porcentaje medio de láminas Beta presentes en el hidrogel en los distintos grupos y tiempos analizados. Se agrupan en los tiempos (día 0, día 7 y día 14) los grupos experimentales (E, O, P, HVN, HVP) para la medida del % medio de láminas beta presentes en cada grupo. Se decretan barras de error +/- 1 SE. Se añade leyenda con los grupos experimentales.

El caso de las hélices alfa es similar (**figura 3.5**), sufriendo un aumento seguido de un descenso. A diferencia de las láminas beta, el punto final (día 14) resulta ser mayor que el inicio (día 0). Esto ocurre en todos los grupos salvo en el grupo de la enzima donde se puede observar que la cantidad de hélices Alfa presentes nos sufre una variación elevada.

Es decir, ambos patrones de plegamiento y organización de las cadenas de proteínas sufren variaciones parecidas. Esta variación para volver a su estado normal podría indicar un proceso dinámico de reorganización de las estructuras secundarias.

La variación entre el día 0 y el día 7 puede deberse a la formación de nuevas interacciones entre las cadenas proteicas del hidrogel. Esto significaría un aumento de la ordenación asociado a la maduración del hidrogel. Sin embargo, la variación entre el día 7 y el día 14 puede indicar que se trate de un equilibrio dinámico propio del hidrogel.

En este caso, la variación del tramo inicial podría significar la capacidad de liberación que presenta el hidrogel seguida de, en el segundo tramo, una reorganización del hidrogel lo cual lo haría posible para su reutilización o regeneración.



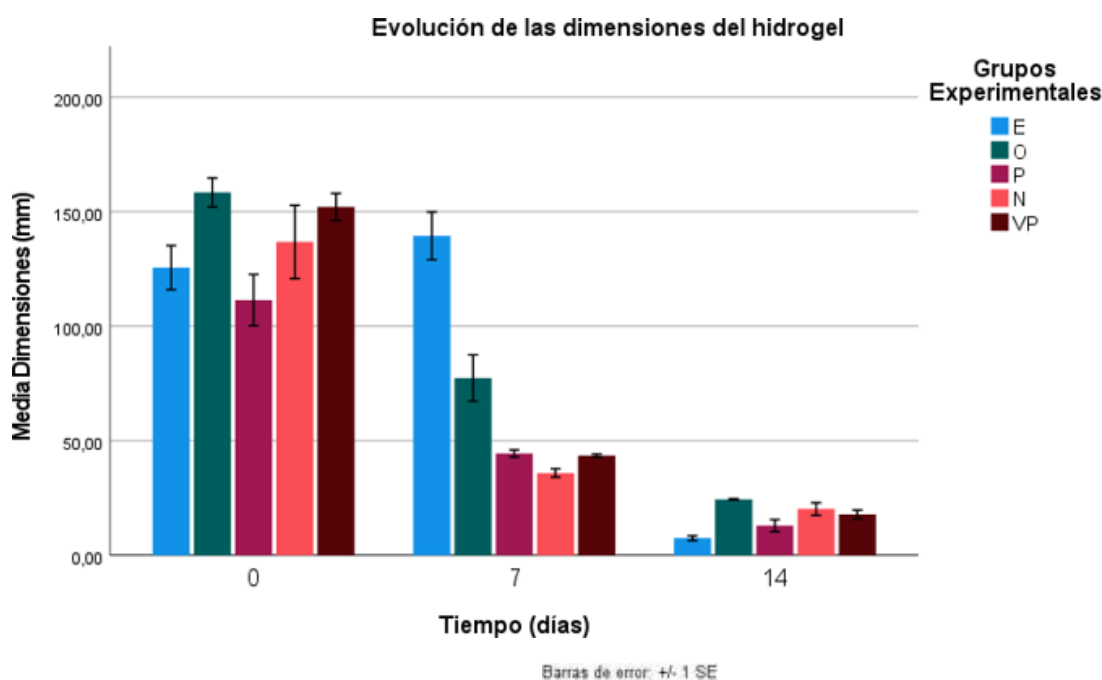
**Figura 3.5:** Porcentaje medio de hélices Alfa presentes en el hidrogel en los distintos grupos y tiempos analizados. Se agrupan en los tiempos (día 0, día 7 y día 14) los grupos experimentales (E, O, P, HVN, HVP) para la medida del % medio de láminas beta presentes en cada grupo. Se decretan barras de error +/- 1 SE. Se incluye leyenda con los grupos experimentales.

En ambos casos, se llevó a cabo un análisis estadístico ANOVA. El valor de p asociado a la variación entre grupos era mayor que el nivel de significancia predefinido ( $\alpha=0.05$ ). Al igual que en el apartado anterior, este resultado muestra que el hidrogel no se encuentra influido de manera significativa por el ambiente en el que se encuentra. (Yonesi et al., 2023) Esto indica que el proceso de reorganización que sufre el hidrogel no se encuentra determinado por el ambiente en el cual evoluciona.

### 3.3. Dimensiones del hidrogel

Un factor muy importante para el uso de hidrogeles como liberadores de fármacos es el control de su degradación. (Joon Kong et al., 2004)

En este trabajo, se puede observar cómo las dimensiones de los hidrogeles en los diferentes tiempos disminuyen de manera notable (**Figura 3.6**). En primer lugar, destaca el grupo experimental de la proteinasa K, el cual sufre un pequeño crecimiento en las dimensiones seguido de una enorme caída. Principalmente, estas variaciones pueden deberse a errores propios del análisis de las imágenes obtenidas. Otra opción podría tratarse de la efectividad de la enzima en los diferentes tiempos de estudio punto de esta manera, la enzima presentará una elevada acción cuando se encuentra en contacto con el hidrogel. Dicha acción aumenta de manera elevada tras 14 días de contacto.



**Figura 3.6:** Evolución de las dimensiones del hidrogel en los diferentes grupos experimentales y tiempos analizados. Se agrupan en los tiempos (día 0, día 7 y día 14) los grupos experimentales (E, O, P, HVN, HVP) para la medida de la media de las dimensiones del hidrogel en cada grupo. Se decretan barras de error  $\pm 1$  SE. Se incluye leyenda con los grupos experimentales.

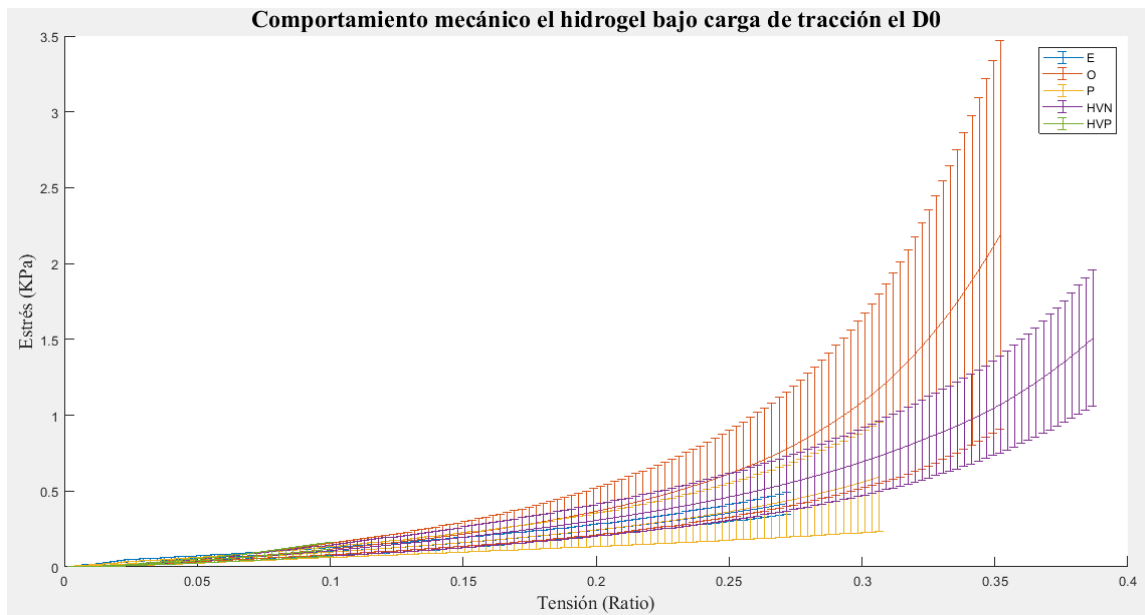
En líneas generales, no se observa ninguna variación significativa entre los grupos que presentan HV y aquellos que no. Tampoco se encuentran diferencias entre los grupos que presentan el medio condicional y aquellos que presentan el ambiente patológico, es decir, el medio activado.

La degradación del hidrogel es proporcional al tiempo transcurrido en los diferentes tipos de medio. Esto indica que, en este caso, no se observa una influencia significativa entre dichos grupos experimentales. Esto nos lleva a concluir que si el hidrogel se introdujera en el HV para la liberación del fármaco presentaría la misma degradación que si se hiciese en un medio condicional.

### 3.4. Características mecánicas del hidrogel de FS

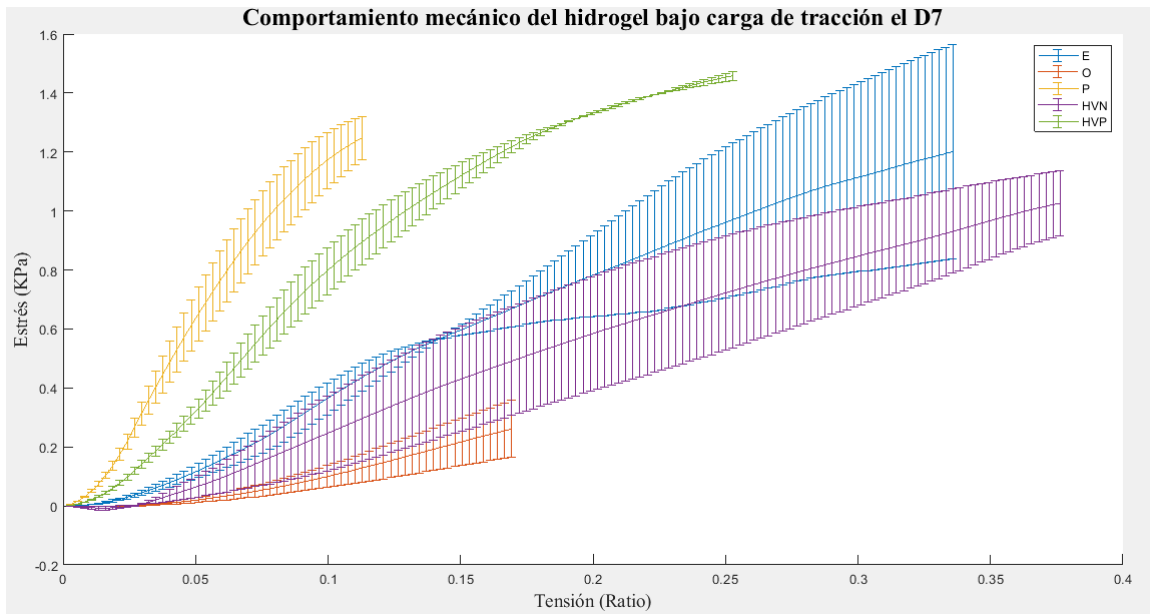
Analizar la variación de las características mecánicas del hidrogel es muy importante para asegurar que es capaz de soportar las fuerzas de tensión a las cuales estará expuesto.

Los resultados representados en las **figuras 3.7 y 3.8** muestran comportamiento mecánico de los hidrogeles de FS el día 0 y el día 7 respectivamente. En ambos resultados, se llevó a cabo un análisis estadístico ANOVA en el cual no aparecieron variaciones significativas entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, esto no se debe al comportamiento del hidrogel en diferentes ambientes.



**Figura 3.7:** Comportamiento mecánico del hidrogel de FS en los diferentes grupos experimentales (E, O, P, HVN, HVP) el día 0. Se compara la tensión con el estrés al que se somete el hidrogel. Análisis estadístico p-value ( $\alpha = 0.05$ ). Se incluye leyenda con los grupos experimentales.

Posiblemente, se deba a errores experimentales como fallos en la calibración de los equipos y sistemas utilizados o errores de ejecución como la correcta colocación del hidrogel o (calibración o errores de ejecución). También puede deberse a errores propios de las condiciones ambientales como la temperatura o la humedad.



**Figura 3.8:** Comportamiento mecánico del hidrogel de FS en los diferentes grupos experimentales (E, O, P, HVN, HVP) el día 7. Se compara la tensión con el estrés al que se somete el hidrogel. Análisis estadístico p-value ( $\alpha = 0.05$ ). Se incluye leyenda con los grupos experimentales (E, O, P, HVN y HVP).

Por ello, los resultados representados en la **figura 3.8** no muestran el comportamiento esperado del hidrogel (Yonesi et al., 2023) ya que se parte de una teoría en la cual la variación en los tiempos de incubación no debería dar como resultado una variación sin patrón. Se puede observar como el comportamiento del grupo experimental E y el grupo experimental HVN son parecidos. Además, estos presentan diferencias con los grupos P y HVP, los cuales contienen el medio activado. Esto nos lleva a concluir que transcurrido este tiempo la capacidad del hidrogel de resistencia a tracción varía notablemente.

## CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES

1. La enzima proteinasa K es capaz de degradar el hidrogel de FS, evidenciado gracias a su elevada fluorescencia. Sin embargo, se observó un descenso de la efectividad de la enzima con el tiempo.
2. Un ambiente patológico induce una mayor degradación del hidrogel. Además, la presencia de HV proporciona una disminución de la degradación del hidrogel.
3. No se encontraron diferencias significativas en la degradación del hidrogel entre un ambiente condicional y uno patológico.
4. Las estructuras secundarias del hidrogel experimentan variaciones a lo largo del tiempo. Dichas variaciones pueden relacionarse con procesos de reorganización y equilibrio dinámico del hidrogel.
5. No se encontraron variaciones significativas entre los grupos experimentales en las estructuras secundarias del hidrogel. Esto sugiere que los factores evaluados no influyen de manera directa en las estructuras secundarias del hidrogel.
6. El hidrogel de FS sufre variación en su comportamiento mecánico con el paso del tiempo, lo cual puede suponer una variación sobre la liberación de moléculas terapéuticas.
7. Con el paso del tiempo, se produce una degradación de los hidrogeles plasmada en la disminución de las dimensiones de los hidrogeles.
8. En general, el estudio demuestra que el hidrogel de FS puede degradarse de manera controlada presentando una variación en las estructuras secundarias y las dimensiones a lo largo del tiempo.

## CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA

- Álvaro Martínez, S. (2020). *Evaluación del aclaramiento lagrimal en pacientes con tratamiento para el glaucoma* [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad de Zaragoza.
- Antonia Lizarbe, M. (2007). Sustitutivo de tejidos: de los biomateriales a la Ingeniería tisular. En *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)* (Vol. 101, Número 1). Universidad Complutense.
- Aracón, C., Montaner, S., Moral, A., Peñalver, B., & Plá, B. (2014). *El ojo humano y sus defectos*.
- Aragón Fernández, J., González Santos, R., & Fuentes Esteves, G. (2010). Estudio in vitro de liberación de fármacos desde un biomaterial compuesto. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 41, 1-8.
- Awwad, S., H A Mohamed Ahmed, A., Sharma, G., S Heng, J., T Khaw, P., Brocchini, S., & Lockwood, A. (2017). Principles of pharmacology in the eye. *British Journal of Pharmacology*, 174(23), 4205-4223.
- Benítez, J. L., Lárez Velásquez, C., & Rojas de Gáscue, B. (2015). Cinética de absorción y transporte del agua en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamida y anhídrido maleico. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 35(2).
- Bourne, R. R. A., Steinmetz, J. D., Saylan, M., Mersha, A. M., Weldemariam, A. H., Wondmeneh, T. G., Sreeramareddy, C. T., Pinheiro, M., Yaseri, M., Yu, C., Zastrozhin, M. S., Zastrozhina, A., Zhang, Z. J., Zimsen, S. R. M., Yonemoto, N., Tsegaye, G. W., Vu, G. T., Vongpradith, A., Renzaho, A. M. N., ... Vos, T. (2021). Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: The Right to Sight: An analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*, 9(2), e144-e160. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30489-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30489-7)
- Caballero Méndez, L., & Gaviria Arias, D. (2019). Desarrollo y caracterización de películas de fibroina de seda para reparación condral. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 71-81. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.73137>
- Castro-Balado, A., Mondelo-García, C., Zarra-Ferro, I., & Fernández-Ferreiro, A. (2020). New ophthalmic drug delivery systems. *Farmacia Hospitalaria*, 44(4), 149-157. <https://doi.org/10.7399/fh.11388>
- Cenis, J. L. (2008). *La seda como biomaterial en medicina regenerativa*. Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA).
- D. Aznar Cervantes, S. (2013). *El gusano de seda, Bombyx mori (Linneo, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) como plataforma de producción de proteínas naturales y recombinantes. Aplicaciones en Biotecnología e Ingeniería de Tejidos*.

- Fadlelmoula, A., Pinho, D., Carvalho, V. H., O. Catarino, S., & Minas, G. (2022). Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy to Analyse Human Blood over the Last 20Years: A Review towards Lab-on-a-Chip Devices. *Micromachines*, 13(2)(187).
- Ferreruela, R. (2007). *La visión y el ojo*. Institut Nacional d'Educació Física de Catalunya.
- Fresneda García, J., & Figueroa Hernández, C. (2016). Utilización de hidrogeles como liberadores de fármacos. *Convención Científica de Ingeniería y Arquitectura*.
- Fu, X., Hosta-Rigau, L., Chandrawati, R., & Cui, J. (2018). Multi-Stimuli-Responsive Polymer Particles, Films, and Hydrogels for Drug Delivery. En *Chem* (Vol. 4, Número 9, pp. 2084-2107). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.07.002>
- Fuertes, I., Miranda, A., Millan, M., & Caraballo, I. (2006). Matrices hidrófilas. Influencia del tamaño de partícula y de la solubilidad del fármaco. *Ciencia y tecnología farmacéutica*, 16(3), 91-96.
- Gaviria Arias, D., & Cenobia Caballero Mendez, L. (2015). Uso de biomateriales a partirde la fibroína de la seda de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) Para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. En *Rev. Méd. Risaralda* (Vol.21, Número 1).
- Guillermo Lucas, N., & Montoro Moreno, I. (2016). *Nuevos sistemas de liberación intraoculares en el tratamiento de edema macular diabético* [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Complutense de Madrid.
- Hidalgo-Alvarez, V., S. Dhowre, H., Kingston, O. A., Sheridan, C. M., & Levis, H. J. (2021). Biofabrication of Artificial Stem Cell Niches in the Anterior Ocular Segment. *Bioengineering*, 8(10)(135).
- Jiang, X., Zheng, L., Zeng, J., Wu, H., & Zhang, J. (2021). Investigations into the role ofnon-bond interaction on gelation mechanism of silk fibroin hydrogel. *Mathematicalbiosciences and engineering : MBE*, 18(4), 4071-4083.
- Joon Kong, H., Alsberg, E., Kaigler, D., Yong Lee, K., & J. Mooney, D. (2004). Controlling Degradation of Hydrogels via the Size of Cross-Linked Junctions. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 16(21), 1917-1921.
- Keino, H., Horie, S., & Sugita, S. (2018). Immune privilege and eye-derived T-regulatorycells. En *Journal of Immunology Research* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/1679197>
- Lárez Velásquez, C., & Graham, T. (2019). *Sobre la confusión actual acerca del origen del término hidrogel* (Vol. 14, Número 2). [www.saber.ula.ve/avancesenquimica](http://www.saber.ula.ve/avancesenquimica)Avancesen
- Lei, Y., Zou, K., Xin, J., Wang, Z., Liang, K., Zhao, L., & Ma, X. (2021). Sedentary behavior is associated with chronic obstructive pulmonary disease: A generalized propensity score-weighted analysis. *Medicine (United States)*, 100(18), E25336. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000025336>

- Lorca Abajo, P. (2020). *Implantes intraoculares de cesión controlada para el tratamiento de patologías en el segmento posterior del ojo*. Universidad Complutense de Madrid.
- Lucía Meler García. (2015). *Preparación y Caracterización de hidrogeles de Fibroína para aplicaciones biomédicas*.
- Martínez Martínez, M. T. (2016). *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos*.
- Monteiro, Joao. P., Santos, F. M., Rocha, A. S., Castro-de-Sousa, Joao. P., Queiroz, Joao. A., Passarinha, L. A., & Tomaz, C. T. (2014). Vitreous humor in the pathologic scope: insights from proteomic approaches. *Proteomics. Clinical applications*, 9(1-9), 187-202.
- Morato, A., Narváez, I., & Toribio, C. (2004). *El futuro de los biomateriales. Tendencias tecnológicas a medio y largo plazo*.
- Nguyen, T. P., Nguyen, Q. V., Nguyen, V. H., Le, T. H., Huynh, V. Q. N., Vo, D. N., Trinh, Q. T., Kim, S. Y., & Le, Q. V. (2019). Silk Fibroin-Based Biomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Polymers*, 11(12).
- Nimazi, A. A., & Gulani, A. C. (2022). *Cataract*.
- Noia, M. A., Coll Cárdenas, F., Olivera, D., Marengo, L., De La Sota, P., Cura, S., Anconetani, M. M., & González, G. (2008). *Determinación de constantes fisicoquímicas de humor vítreo en equinos*.
- Othman, Z., Cillero Pastor, B., Sabine van Rijt, & Habibovic, P. (2018). Understanding interactions between biomaterials and biological systems using proteomics. *Biomaterials*, 167(0142-9612), 191-204.
- Peña Blaque, V. (2016). *Sistemas de liberación controlada de medicamentos. Aplicaciones biomédicas*.
- Perea Abarca, G. B. (2010). *Influencia de la radiación ultravioleta en el comportamiento mecánico y en la microestructura de las fibras de seda de araña* [Tesis Doctoral]. Universidad Politécnica de Madrid.
- Pérez, S. E. (2015). *Microencapsulación de sustancias activas para el tratamiento de patologías de la vía ocular*.
- Pino Mínguez, J., & Gelabert Gonzalez, M. (2019). *Biomateriales en cirugía ortopédica y traumatología. Una continua evaluación hacia la ingeniería tisular*.
- Ramirez, A., Benitez, J. L., Rojas de Astudillo, L., & Rojas de Gascue, B. (2016). Materiales poliméricos de tipo hidrogeles: revisión sobre su caracterización mediante ftir, dsc, meb y met. *Revista Latoniamericana de Metalurgia y Materiales*, 36 n°2, 108-130.
- Rios Osorio, A. D., Alvarez-López, C., Cruz Riaño, L. J., & Restrepo-Osorio, A. (2017). Revisión: Fibroína de seda y sus potenciales aplicaciones en empaques biodegradables para alimentos/Review: silk fibroin and their potential applications

- on biodegradable food packaging. *Prospectiva*, 15(1), 7-15. <https://doi.org/10.15665/rp.v15i1.685>
- Rodríguez Martínez, S. (s. f.). *Producción de mallas de fibroína de seda mediante Straining Flow para recrear una membrana de Bruch artificial*. Universidad Francisco de Vitoria.
- Ruiz, A. L., Ramirez, A., & McEnnis, K. (2022). Single and Multiple Stimuli-Responsive Polymer Particles for Controlled Drug Delivery. En *Pharmaceutics* (Vol. 14, Número 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14020421>
- Sanchez Micó, M. V. (2019). *Caracterización de la respuesta y función astrogial en modelos y pacientes de la enfermedad de alzheimer*. Universidad de Sevilla.
- Simões, S., Figueiras, A., & Veiga, F. (2012). Modular Hydrogels for Drug Delivery. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 03(02), 185-199. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2012.32025>
- Soheilmoghaddam, F., Madeleine, R., & Cooper-White, J. (2021). High-Throughput Routes to Biomaterials Discovery. *Chemical reviews*, 121(18), 10792-10864.
- Spiridonova, T. I., Tverdokhlebov, S. I., & Anissimov, Y. G. (2019). Investigation of the Size Distribution for Diffusion-Controlled Drug Release From Drug Delivery Systems of Various Geometries. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(8), 2690-2697.
- Sun, W., Gregory, D. A., Tomeh, M. A., & Zhao, X. (2021). Silk Fibroin as a Functional Biomaterial for Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences*, 22(3).
- Taylor, A. W. (2009). Ocular immune privilege. *Eye*, 23(10), 1885-1889. <https://doi.org/10.1038/eye.2008.382>
- Timmerman, R., Burm, S. M., & Bajramovic, J. J. (2018). An overview of in vitro methods to study microglia. En *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00242>
- Todros, S., Todesco, M., & Bagnò, A. (2021). Biomaterials and their biomedical applications: From replacement to regeneration. En *Processes* (Vol. 9, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pr9111949>
- Toribio Ruiz, D. (2021). Hidrogeles basados en polisacáridos para aplicaciones biomédicas. En *Fecha*. Universidad del País Vasco.
- Ullah, S., & Chen, X. (2020). Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. En *Applied Materials Today* (Vol. 20). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100656>
- Yonesi, M., Ramos, M., Ramirez-Castillejo, C., Fernández-Serra, R., Panetsos, F., Belarra, A., Chevalier, M., Rojo, F. J., Pérez-Rigueiro, J., Guinea, G. V., & González-Nieto, D. (2023). Resistance to Degradation of Silk Fibroin Hydrogels Exposed to Neuroinflammatory Environments. *Polymers*, 15(11), 2491. <https://doi.org/10.3390/polym15112491>
- Zhang, H., Cheng, J., & Ao, Q. (2021). Preparation of Alginate-Based Biomaterials and Their Applications in Biomedicine. *Marine drugs*, 19(5)-264.