



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Óptica y Optometría

MEMORIA TRABAJO FIN DE GRADO TITULADO

Propiedades biológicas, mecánicas y
ópticas de los polímeros de fibroína
para su uso en oftalmología.

Presentado por: Miriam Regaliza Tejedo

Tutelado por: Patricia Gallego Muñoz

Tipo de TFG: Revisión Investigación

En Valladolid, a 25 de mayo del 2021

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. METODOLOGÍA	5
2.1 Métodos de análisis de datos.....	5
2.2 Criterios de inclusión / exclusión.....	5
2.3 Estrategia de búsqueda	5
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo principal.....	6
3.2 Objetivos secundarios.....	6
4 JUSTIFICACIÓN.....	7
5 RESULTADOS	8
6 DISCUSIÓN.....	9
6.1 Propiedades de la fibroína de seda que la hacen un buen biomaterial.....	9
6.1.1 Biocompatibilidad.....	9
6.1.2 Propiedades mecánicas.....	10
6.1.3 Biodegradabilidad	12
6.1.4 Propiedades ópticas	12
7 CONCLUSIONES	16
8 BIBLIOGRAFÍA.....	17

RESUMEN

Cuando se produce un daño corneal grave, el trasplante de córnea o queratoplastia, es la opción más habitual para su reparación, pero la demanda de córneas procedentes de donantes está muy por encima de su disponibilidad.

Esto hace necesario que se planteen alternativas para reemplazar el tejido procedente de donantes. En los últimos años, la ingeniería tisular ha cobrado mucha importancia como alternativa en reparación corneal.

Para ello, se están utilizando nuevos biomateriales que favorezcan este proceso. Entre ellos, destacan los polímeros de fibroína por sus excelentes propiedades, siendo estas la buena resistencia a la tracción, procesamiento rápido y económico, fácil manejo, alta disponibilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y una de las más importantes, la transparencia.

Todas estas propiedades hacen a la fibroína de seda un biomaterial potencialmente implantable para sustituir o reparar el tejido corneal dañado, ya que se ha demostrado que es compatible con una córnea sana, explorando su potencial como andamio o matriz, destacando por su gran biocompatibilidad, ausencia de citotoxicidad; biodegradabilidad, propiedades mecánicas y su transparencia óptica en todo el rango de luz visible.

ABSTRACT

When severe corneal damage occurs, corneal transplantation or keratoplasty is the most common option for repair, but the demand for donor corneas far exceeds their availability. This makes it necessary to consider alternatives to replace donor tissue. In recent years, tissue engineering has become very important as an alternative in corneal repair. New biomaterials are being used to support this process. Among them, fibroin polymers stand out for its excellent properties, such as good tensile strength, fast and economical processing, easy handling, high availability, biocompatibility, biodegradability and one of the most important, its transparency.

All these properties make silk fibroin a potentially implantable biomaterial to replace or repair damaged corneal tissue, as it has been shown to be compatible with a healthy cornea, exploring its potential as a scaffold or matrix, standing out for its high biocompatibility, absence of cytotoxicity, biodegradability, mechanical properties, and its optical transparency in the entire range of visible light.

1. INTRODUCCIÓN

El gusano *Bombyx mori* (*B.mori*), realiza la metamorfosis para transformarse en polilla encerrándose en un capullo que construye con su saliva y que al solidificarse se transforma en seda siendo el principal productor de este material.¹⁻³

La seda está formada por dos proteínas, fibroína y sericina. La fibroína tiene la forma de dos fibras paralelas, que permanecen unidas por un recubrimiento de sericina.² La fibroína de seda (FS), es la principal proteína de la fibra de seda, y representa el 70-80% de su peso. Para obtener la fibroína, ha de eliminarse la sericina mediante un proceso denominado desgomado, obteniendo fibras de fibroína de aspecto brillante y suaves.^{1, 3}

Además de usarse como un valioso material textil, es un atractivo biomaterial^{3, 4}, que se utiliza en distintos campos como, biomedicina (ingeniería de tejidos), farmacología (liberación controlada de fármacos), óptica y generación de dispositivos de detección y diagnóstico (desarrollo de detectores de concentraciones moleculares en determinadas patologías)^{2, 3}, ya que está dotada de unas excelentes propiedades, como la fuerza, dureza, resistencia mecánica, biocompatibilidad, estabilidad térmica y biodegradabilidad.³⁻⁵

Sus excelentes propiedades mecánicas hacen que presente una gran resistencia a la rotura. Esta propiedad está muy relacionada con su estructura molecular, formada por una cadena pesada (H) y una cadena ligera (L), unidas entre sí por un único enlace disulfuro, formando así el complejo H-L.³

La buena resistencia, extensibilidad y elasticidad de la seda, además del endurecimiento por tensión, proporcionan una gran ventaja para desarrollar biomateriales.³⁻⁵

Otra de sus principales propiedades es su buena biocompatibilidad con diversos tipos celulares, ya que promueve la adhesión, proliferación y crecimiento celular^{3, 4}. También la funcionalidad de la superficie, que abarca desde cambios físicos en la superficie como por ejemplo rugosidad e hidrofobicidad que modulan la adhesión celular, hasta la activación de cascadas bioquímicas, que regulan la proliferación, diferenciación y supervivencia celular.³⁻⁵

Las características o propiedades de los diferentes biomateriales basados en fibroína de la seda van a depender del método de polimerización de cada biomaterial, y que a su vez dependerá de la aplicación para la cual se desarrollen.

La fibroína presenta una gran versatilidad, ya que puede polimerizarse en diversas morfologías como hidrogeles, películas, esponjas, micropartículas y fibras hiladas electrónicamente y en húmedo.³⁻⁵

Esta diversidad de métodos de polimerización ofrece un gran abanico de aplicaciones, las cuales serán detalladas en la discusión de la presente revisión bibliográfica.^{3, 5}

Esta revisión se centra en analizar las diferentes propiedades de los polímeros basado en fibroína y sus aplicaciones a nivel ocular, concretamente en la córnea.

2. METODOLOGÍA

La metodología escogida para este trabajo es una revisión bibliográfica.

En este trabajo se abordará conocer las propiedades que tienen los diferentes polímeros basados en fibroína para ser utilizados como biomateriales, centrándonos sobre todo en sus aplicaciones en la córnea.

2.1 Métodos de análisis de datos.

Se han consultado diferentes fuentes, para poder seleccionar los artículos científicos relacionados con las propiedades de los polímeros de fibroína para su uso en oftalmología.

La búsqueda bibliográfica se realizó desde octubre de 2020 hasta mayo de 2021. Las bases de datos utilizadas han sido Elsevier, Pubmed, Lilac, Scielo y Wiley Online Library.

Las palabras clave para llevar a cabo las distintas búsquedas en las diferentes bases de datos, han sido: "Silk fibroin", "Silk fibroin biomaterials", "Properties of silk fibroin", "Tissue engineering", "Scaffold", "Silk", "Sericin", "Biomaterials", "Biomedical applications" and "Biomaterials in corneal repair", "Silk fibroin and optic" and "Silk fibroin and ophthalmology".

2.2 Criterios de inclusión / exclusión.

En este trabajo de revisión bibliográfica, se han marcado una serie de criterios de inclusión y exclusión a tener en cuenta:

Criterios de inclusión:

- Artículos en español e inglés.
- Artículos gratuitos o accesibles a través de la plataforma de la UVa.
- Artículos publicados entre 2003 y 2021
- Artículos de texto completo.

Criterios de exclusión:

- Artículos no disponibles a texto completo.
- Artículos que no cumplan los criterios de inclusión descritos anteriormente.
- Artículos que no hablen ni hagan referencia sobre la fibroína de seda.

2.3 Estrategia de búsqueda

Tras la búsqueda realizada en las bases de datos citadas anteriormente, se procedió a la lectura de los títulos de los resultados obtenidos, seleccionando los que tuvieran un título acorde con "Propiedades de los polímeros basados en fibroína para su uso en oftalmología".

De estos, se leyó su resumen, y se descartaron aquellos considerados no relevantes, y/o con poca aportación para el estudio.

A continuación, se procedió a la lectura completa de cada uno de los artículos encontrados, y se seleccionaron valorando los criterios de inclusión y exclusión.

Finalmente, se utilizaron un total de 35 artículos para el trabajo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

-Analizar y comparar diferentes estudios sobre las propiedades que tienen los biopolímeros basados en fibroína para su aplicación en oftalmología.

3.2 Objetivos secundarios

- Analizar la biocompatibilidad que presentan los polímeros basados en fibroína para su aplicación corneal.

- Analizar las propiedades mecánicas que tiene los polímeros basados en fibroína para su aplicación corneal.

- Analizar la biodegradabilidad de los polímeros basados en fibroína para su aplicación corneal.

- Analizar las propiedades ópticas de los polímeros basados en fibroína para su aplicación corneal.

4 JUSTIFICACIÓN

La córnea es la parte anterior y transparente del globo ocular. Su transparencia es fundamental para que la luz pueda atravesarla y posteriormente focalizarse en la retina. Al ser la parte más anterior del globo ocular, es también la más expuesta al medio ambiente y por ello también a diferentes tipos de daños y agentes infecciosos.

Las enfermedades corneales representan la quinta causa de ceguera a nivel mundial y, al menos 2 mil millones de personas en todo el mundo sufre algún tipo de discapacidad visual o ceguera. Dentro de los casos de discapacidad visual, casi 4 millones son debidos a opacidades corneales no tratadas o que podían haber sido prevenidas. El reemplazo o la reconstrucción de un tejido dañado depende de una serie de procesos biológicos que acontecen durante la cicatrización y de las posibilidades terapéuticas existentes.⁶

Cuando se produce un daño corneal grave, el trasplante de córnea o queratoplastia (total o parcial), es la opción más habitual para la sustitución o reparación del tejido corneal dañado, pero la demanda de córneas es muy superior a su disponibilidad y, por lo tanto, es necesario buscar alternativas al trasplante.^{4, 7-10}

Además, se ha demostrado que, aunque la tasa de rechazo del trasplante de córnea es inferior al 10%, aumenta continuamente con el tiempo.¹⁰

Todo esto hace que se planteen nuevas alternativas al tejido procedente de donantes. En los últimos años el campo de la ingeniería tisular ha cobrado una gran importancia como alternativa en regeneración corneal en busca de tratamientos eficaces alternativos a los trasplantes de córnea.^{4, 7, 8, 10}

Entre ellas destaca el desarrollo de nuevos biopolímeros o biomateriales que sustituyan al tejido corneal o favorezcan la regeneración corneal tras un daño grave.^{4, 8}

Entre los biomateriales que se están utilizando, destacan los polímeros desarrollados a partir de fibroína de seda por sus diferentes propiedades en las cuales se basa este trabajo de revisión bibliográfica.

5 RESULTADOS

Se han encontrado 459 artículos en las bases de datos citadas anteriormente, poniendo las palabras clave para su búsqueda, de los cuales 52 fueron seleccionados por tener un título acorde con el tema del estudio. Se procedió a la lectura del resumen de cada uno de los artículos seleccionados, y a continuación se hizo una criba de aquellos que no tenían relación con el objetivo de este trabajo. En total se utilizaron 33 artículos para su discusión.

Tabla 1. Resultados. Artículos del estudio.

Bases de datos	Resultados obtenidos	Resultados seleccionados	Artículos duplicados de los seleccionados	Artículos utilizados
PubMed	128	26	8	22
Elsevier	297	14	5	4
Lilacs	5	2	1	0
SciELO	17	3	1	2
Wiley Online Library	13	7	2	5

6 DISCUSIÓN

La ceguera corneal, es una de las causas más comunes de pérdida de visión en todo el mundo y afecta a millones de personas. Para tratar a estos pacientes, se ha investigado y examinado, y se sigue haciendo, con distintos enfoques para diseñar andamios corneales que mimetizan la estructura corneal basándose en la aplicación de diferentes biomateriales.⁹⁻¹¹

En este contexto, el campo de la ingeniería tisular ofrece el potencial de diseñar y desarrollar implantes que se pueden utilizar posteriormente para reemplazar el tejido corneal gravemente dañado o ayudar a su reparación. En este contexto, se han desarrollado diferentes tipos de andamiajes a partir de materiales biocompatibles para sustituir una parte o la totalidad de la córnea en función de las necesidades del paciente.^{9, 11}

Entre estos materiales más usados en oftalmología destacan el colágeno, la fibroína de seda, la fibrina, el quitosano, la membrana amniótica, el alginato, la agarosa, el ácido hialurónico y la gelatina, además de varios polímeros sintéticos.^{8, 11, 12}

A la hora de seleccionar el biomaterial, hay que tener en cuenta una serie de propiedades, como la resistencia mecánica, la biocompatibilidad, biodegradabilidad y las características ópticas como la transparencia, ya que estas lo harían un material ideal coincidiendo con las propiedades del tejido *in vivo*.^{3, 4, 8-11}

Todas estas propiedades las cumple la fibroína de seda, por lo que se está estudiando como biomaterial potencialmente implantable, ya que tiene una buena resistencia a la tracción, procesamiento rápido y económico, fácil manejo, alta disponibilidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y transparencia.^{3, 4, 8, 12, 13}

6.1 Propiedades de la fibroína de seda que la hacen un buen biomaterial

6.1.1 Biocompatibilidad

Una de las características principales de un biomaterial ha de ser su biocompatibilidad con el tejido receptor, ya que no debe desencadenar una reacción tóxica o inflamatoria.

Cada vez más, la seda se está utilizando para desarrollar soportes o andamios sobre los que crezcan diferentes tipos celulares, por lo que la biocompatibilidad es fundamental para garantizar su supervivencia tras su implantación. Diferentes estudios indican que la seda, debidamente desgomada y esterilizada, tiene una buena biocompatibilidad.^{4, 11}

Estudios como el realizado por Banani Kundu y cols. (2013), indican que la presencia de forma conjunta de la fibroína y sericina resulta inmunogénica, por lo que es importante eliminar la sericina en el proceso de obtención de la fibroína.⁴

Santin y cols. en 1999,¹⁴ comprobaron *in vitro* que las membranas de fibroína producían un nivel más bajo de activación de macrófagos que otros materiales como el poliestireno y el poli 2-hidroxetil metacrilato en plasma humano.

Posteriormente, Panilaitis y cols. (2003), observaron que las fibras de seda sin sericina eran inmunológicamente inertes en un cultivo de macrófagos de ratón.¹⁵

Así mismo, Meinel y cols. (2005), en sus estudios llevados a cabo *in vivo e in vitro*, compararon la producción de citoquinas inflamatorias inducidas por películas de fibroína de seda, colágeno y ácido poliláctico, implantadas en ratas Lewis. *In vitro*, la producción de citoquinas inflamatorias fue similar, mientras que *in vivo*, hubo una leve respuesta inflamatoria, pero con la fibroína fue mucho menor a la observada con el colágeno y el ácido poliláctico.¹⁶

Estos resultados indicaron que la fibroína es menos inmunogénica que cualquiera de los biomateriales habituales, como el colágeno o el ácido poliláctico, cuando se encuentra purificada de sericina.

La biocompatibilidad depende también de las diferentes técnicas utilizadas para la obtención del biomaterial y la mezcla de posibles aditivos químicos.

S. Hazra y cols. (2016), estudiaron la biocompatibilidad de la fibroína polimerizada en membranas o films para soportar el crecimiento de las células corneales y la preservación de sus características, evaluando su biocompatibilidad, biodegradación y transparencia, después de la implantación intraestromal de las películas en córneas de conejo. Tras dos meses de implantación, los implantes se mostraron transparentes, limpios y libres de neovascularización dentro de la córnea.¹²

La degradación de los films de seda se puede adaptar modificando el contenido y estructura β de la fibroína, haciéndolas más adecuadas para la reconstrucción corneal, ya que brinda la opción de ajustar la degradación para que coincida con el proceso de reparación normal en la córnea.¹²

W. Abdel-Naby y cols. en 2016, demostraron que la fibroína tenía efectos favorables sobre la cicatrización de heridas. Observaron que la fibroína agregada a los medios de cultivo celular inducía un aumento en la migración de las células epiteliales límbicas humanas, contribuyendo a la aceleración del cierre de una herida epitelial en un modelo de herida *in vitro*. Estos resultados demuestran que la fibroína mejora el cierre de heridas estimulando la proliferación, migración y adhesión celular.¹³

Posteriormente, en 2017,¹⁷ demostraron *in vivo*, que la presencia de fibroína en la superficie de la córnea de conejo durante el proceso de cicatrización, administrada en forma de colirio, mejoraba la curación de las heridas epiteliales. Además, vieron que el tratamiento con la fibroína mejoraba la integridad de la barrera de la superficie ocular favoreciendo una mayor adhesión celular.

Recientemente, Bhattacharjee P y Ahearne M¹⁸ (2021), han demostrado, que la fibroína de la seda en forma de hidrogel presenta una excelente biocompatibilidad *in vitro* con células del endotelio corneal, y una buena cinética de biodegradación.

6.1.2 Propiedades mecánicas.

La seda ofrece un equilibrio entre la resistencia a la rotura y el estiramiento, lo que contribuye a su buena tenacidad y ductilidad.

Teniendo en cuenta las excelentes propiedades mecánicas que presenta la seda (elasticidad, firmeza, resistencia...), se ha estudiado en el campo de la ingeniería de tejidos para el desarrollo de andamios o estructuras de sostén y crecimiento celular.^{4,5}

Los andamiajes deben ser lo suficientemente resistentes para poder soportar las fuerzas que se le apliquen tras el implante, como por ejemplo el movimiento de los párpados, la presión intraocular y el movimiento de la película lagrimal.

Hay que tener en cuenta que la rigidez del andamio tampoco debe ser demasiado alta, ya que se reduciría la capacidad de deformación de la misma manera que el tejido cuando se somete a tensión.¹¹

Los primeros biomateriales basados en fibroína de seda eran más débiles y quebradizos que las fibras de seda en estado nativo.^{19,20} Esto se debe a la falta de estructura secundaria y molecular apropiada en los materiales polimerizados en comparación con las fibras nativas, porque las propiedades mecánicas están íntimamente relacionadas con su estructura secundaria y molecular.⁴

Estudios recientes muestran que hay posibilidades de mejorar significativamente la resistencia de los productos de seda polimerizada hasta el nivel de las fibras nativas, o incluso superior, a través de la manipulación de la estructura durante la polimerización.³⁻⁵

S.W.Ha y cols. (2005), demostraron que las propiedades mecánicas de la fibroína de seda se podían superar mejorando sus técnicas de polimerización. En este caso utilizaron un método de dibujo de alambre, donde dibujaban repetidamente los filamentos hilados de la fibroína a través de matrices progresivamente más pequeñas. De esta manera, después del hilado, las propiedades de tracción se incrementaban drásticamente y mostraban más firmeza que las fibras de seda nativa.²¹

Posteriormente, C.Jiang y cols. (2007), probaron las propiedades mecánicas de tracción y compresión sobre películas de seda finas y ultrafinas. Para fabricar las películas de seda finas, se utilizó el método tradicional de fundición por rotación, mientras que para las películas de seda ultrafinas la deposición en capas. En dicho estudio se mostraron las excelentes propiedades mecánicas en películas de seda ultrafinas, tanto en compresión como en tracción, debido a la formación de una microestructura reforzada con láminas β que actúan como rellenos de refuerzo. Sin embargo, se demostró, que las películas finas provocaban una reducción de la elasticidad, que no comprometía su resistencia mecánica.²²

Como las propiedades del biomaterial dependen directamente del método utilizado para su obtención, en 2016,²³ Applegate, M. B. y cols. publicaron un estudio en el cual desarrollaron y testaron un biomaterial basado en fibroína en forma de hidrogel. Para su obtención hacían *crosslinking* vía radiación UV de la fibroína dando lugar a un hidrogel transparente con una excelente adherencia a la superficie ocular. Recientemente, Bhattacharjee, P y cols. (2019)²⁴ observaron que los hidrogeles basados en fibroína obtenidos tras el *crosslinking* tenían además una influencia muy positiva sobre el comportamiento de las células del estroma corneal.

El *crosslinking* potencia las propiedades biomecánicas del material, desarrollando vínculos de redes intermoleculares, especialmente uniones

covalentes que regulan la actividad de las proteínas, estabilidad y ensamblaje estructural.¹⁸

6.1.3 Biodegradabilidad

La biodegradabilidad de la seda se ha probado en modelos animales comprobando las propiedades mecánicas después de su implantación, viendo cómo se ven afectadas la elasticidad, firmeza y resistencia.^{4, 5}

Los biomateriales basados en fibroína de seda se degradan mucho más deprisa que las fibras de seda en su estado nativo. La velocidad de degradación depende de la estructura de la seda, ya que puede modificarse durante su polimerización, obteniendo diferentes estructuras secundarias para manipular las propiedades del material.³⁻⁵

La secuencia de aminoácidos de la fibroína favorece la formación de estructuras en hélice β , que son estables e hidrófobas por naturaleza, por lo que, como resultado, los materiales basados en fibroína se degradan más lentamente que otros materiales, como el colágeno, el ácido poliácido (PLA) y la fibrina. También ofrece tasas de biodegradación controlables, variando la proporción de su estructura β , para promover un mayor tiempo de remodelación del tejido nativo.^{25, 26}

Wang.Y y cols. en 2008,²⁷ demostraron que al implantarse en ratas Lewis un andamio tridimensional de fibroína, se desintegraba en 8 semanas, y al cabo de un año desaparecía completamente, sugiriendo que este andamiaje tridimensional de fibroína, además de ser biodegradable, es bio-reabsorbible.^{4, 5}

Estudios posteriores llevados a cabo por Linan Guan y cols. (2013)⁹ indicaron el éxito de la implantación de armazones fabricados con fibroína de seda y quitosano en conejos, ya que no se observó ni infección ni cualquier otro signo de inflamación en los lugares de implantación durante el seguimiento. Con el tiempo, los implantes estaban intactos y no se observó fibrosis del tejido receptor. Además, las membranas implantadas en la córnea se degradaron completamente tras 3-4 meses, y las córneas recuperaron la transparencia.

6.1.4 Propiedades ópticas

La fibroína de seda es un biomaterial prometedor para una variedad de aplicaciones en el campo de la óptica. Ésta se forma fácilmente en películas, que tienen una transparencia excelente (aproximadamente 95%) en todo el espectro de la luz visible. Estas películas son de gran importancia para su uso en una variedad de estudios basados en óptica médica.²⁸

Este es un factor importante que se debe tener en cuenta a la hora de desarrollar polímeros para la reparación de la córnea, ya que deben tener características de transmisión de la luz similares a las de la córnea *in vivo*.¹¹

La transparencia de las membranas de seda también se ha demostrado en toda la gama de longitudes de onda.⁸ Se ha demostrado el potencial de este biomaterial para ser remodelado a escala micro y nanométrica, por lo que brinda la posibilidad de moldear la seda en escalas acordes con las longitudes de onda visibles, y en combinación con las propiedades ópticas de las películas de seda,

puede ofrecer una plataforma para realizar elementos ópticos de seda con micro y nanopatrones.²⁹ Por lo tanto, la transparencia es fundamental en el campo de la ingeniería tisular corneal para que el proceso de percepción visual se dé de forma adecuada.

Hannah Perry y cols. en 2008²⁸, demostraron la capacidad de crear patrones difractivos detallados basados en fibroína de seda para producir imágenes complejas y elaboradas. El empleo de una solución de seda acuosa, junto con una técnica de fundición simple, dio como resultado películas ópticamente transparentes, mecánicamente resistentes y biocompatibles.

Esta nueva técnica que se basa en producir una solución de fibroína de seda ultrapura que permite la formación de películas nano y micropatronadas ópticamente transparentes y robustas capaces de una resolución por debajo de 40nm. Aplicaciones futuras para tales películas incluyen andamios para el crecimiento celular, y experimentos en óptica difractiva.²⁸

Jason J.Amsden y cols. posteriormente (2009)²⁹, mostraron un sensor colorimétrico controlable basado en las redes cristalinas nanofotónicas en películas de fibroína pura, fabricadas para la detección de concentraciones de glucosa. Este fue el primer ejemplo de un sensor funcional basado en óptica de fibroína. Demostraron que los dispositivos de seda son biocompatibles y mantenían la actividad biológica dentro de los elementos ópticos de la seda, mediante la mezcla de dopantes biológicos como enzimas o anticuerpos, en la solución de fibroína, utilizada para formar elementos ópticos.

Eun Seok Gil y cols. (2010)⁸, realizaron un andamio laminar tridimensional que imitaba el estroma corneal, con patrones de un tripéptido formado por arginina, glicina y ácido aspártico (Arg-Gli-Asp, patrones RGD), para promover la adhesión de las células estromales y epiteliales de la córnea. Tras 7 días en cultivo, los equivalentes del estroma corneal eran transparentes, y se produjo un crecimiento tridimensional por parte de las células, lo que indicó que la estructura del polímero mantiene la proliferación celular y la integridad estructural.

Este estudio demostró la forma multilaminar orientada y la transparencia del tejido estromal corneal diseñado, para imitar el estroma corneal nativo.

Además de por su transparencia, las membranas basadas en fibroína se han investigado como biomateriales para el crecimiento de células corneales y la reconstrucción de la superficie ocular, ya que su porosidad aumenta la permeabilidad y difusión de gases, nutrientes y biomoléculas que deben ser suministradas a las células durante el proceso de regeneración tisular.

P.W.Madden y cols. (2011) publicaron el primer trabajo que indicaba el éxito del crecimiento de células endoteliales humanas sobre membranas basadas en fibroína para evaluar las características en cuanto a la adhesión celular, el crecimiento y la transparencia en membranas de este biomaterial. El estudio demostró que la fibroína de seda se podía utilizar como sustrato para el cultivo de células endoteliales corneales humanas, ya que favorece el crecimiento del endotelio corneal humano con una morfología similar a la que tiene *in vivo*, demostrando además la gran transmisión de la luz por las membranas de fibroína.³⁰

Posteriormente, Natalia Vázquez y cols. (2017)³¹ realizaron trasplantes endoteliales en conejos utilizando células endoteliales cultivadas sobre los films

de fibroína en los cuales pudieron observar cómo las córneas empezaban a recuperar la transparencia 15 días después del trasplante, y esta se mantenía hasta 6 semanas después del mismo.

Además, observaron que las películas de fibroína de seda con células endoteliales corneales de conejo eran un componente totalmente integrado en el tejido corneal, mostrando un grosor medio de la córnea similar al de la córnea contralateral sana.

J.Liu y cols. (2012)³² evaluaron la respuesta celular a películas o films de fibroína como sustrato para la proliferación, diferenciación y estratificación pero en este caso, de células epiteliales corneales tanto humanas como de conejo, y se compararon con el estándar clínico actual, la membrana amniótica humana (AM). En este estudio demostraron que la fibroína favorece el crecimiento de las células epiteliales y además mantienen la morfología epitelial y la capacidad proliferativa. La fibroína demostró ser altamente biocompatible y provocó una respuesta inflamatoria mínima, ya que no se observó ninguna respuesta citotóxica ni inhibición del crecimiento celular. Además, se observó que es altamente transparente pudiendo ser más adecuada para la restauración de la visión que la AM. Finalmente, este estudio reveló que los films de fibroína podrían servir como una alternativa prometedora a la AM para mejorar los procesos de reparación de la córnea y las aplicaciones de la misma en ingeniería tisular.

Ghezzi CE y cols. (2017)³³, crearon films de fibroína con una determinada porosidad funcionalizadas con el tripéptido RGD utilizando además polidimetilsiloxano. En su estudio demostraron como la creación de una película o film, basado en fibroína, multilaminar en 3D, servía de andamiaje para el crecimiento y la diferenciación de células del estroma corneal humano, en un esfuerzo por generar un estroma corneal funcional equivalente, y que además tenía las prestaciones ópticas y mecánicas que presenta el tejido corneal nativo lo que se tradujo en una mejora de las propiedades ópticas y mecánicas del biomaterial.

Durante el mismo año, Li Y y cols.³⁴ confirmaron también que las membranas basadas en fibroína de seda modificadas con polietilenglicol (PEG) eran unas buenas candidatas como sustitutas de la AM y portadoras de células madre epiteliales del limbo. En su estudio, se prepararon membranas de fibroína y se polimerizaron con PEG para mejorar la resistencia a la tracción y aumentar su permeabilidad, y se trasplantaron a córneas de conejo con deficiencia de células madre del limbo. Estas membranas de fibroína modificadas con PEG eran transparentes, flexibles y lo suficientemente fuertes, además de mostrar un potencial significativo como sustrato para el crecimiento de células epiteliales corneales.

J.H.Choi y cols. (2018)¹⁰, fabricaron una película de fibroína de seda polimerizada con ácido lisofosfatídico (LPA) que demostró tener beneficios sobre films de fibroína únicamente. El LPA es una molécula de señalización que estimula el crecimiento, mantiene y aumenta la función específica de las células endoteliales. Además, afecta a la unión, proliferación, migración y viabilidad de las células.

Obtuvieron que la fibroína de seda junto con el ácido lisofosfatídico, da lugar a una tasa proliferativa mayor, mejorando el crecimiento celular. También, mejora

la transparencia, y además son más rugosas favoreciendo así la adhesión celular.

Concluyeron entonces, que tanto la película de fibroína como la de ácido lisofosfatídico mostraron buenas propiedades.

7 CONCLUSIONES

La fibroína de seda polimerizada en forma de diferentes biomateriales, como películas, membranas, hidrogeles o esponjas, ha demostrado ser un biomaterial con un gran potencial por sus increíbles características adecuadas para la ingeniería de tejidos, en este caso en la córnea.

Sus excelentes propiedades como la biocompatibilidad, biodegradación, propiedades mecánicas y transparencia, hacen a la fibroína de seda un biomaterial que ha adquirido gran relevancia en estos últimos años, ya que se ha demostrado que es compatible con una córnea sana.

Todos los estudios mostrados, demuestran como los biomateriales basados en fibroína de la seda favorecen el crecimiento de los diferentes tipos celulares corneales (células epiteliales, estromales y endoteliales), la proliferación, diferenciación, y su estratificación, conservando el fenotipo característico en cada caso, y regenerando la parte de la córnea afectada.

Se ha demostrado que la fibroína de seda se puede combinar con otros biomateriales, para mejorar aún más las propiedades y favorecer en sus aplicaciones, como por ejemplo, el quitosano, que se usa ampliamente en aplicaciones oftálmicas debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad; el tripéptido RGD, que aumenta la adhesión de las células epiteliales de la córnea y fibroblastos; el ácido lisofosfatídico (LPA) para mantener y aumentar la función específica de las células endoteliales de la córnea; el polietilenglicol (PEG), que junto con la fibroína de seda muestran un potencial significativo como sustrato para el crecimiento de las células epiteliales corneales y puede sustituir a la membrana amniótica.

Finalmente, se ha demostrado que la fibroína de seda tiene unas excelentes propiedades que ayudan a reparar la superficie corneal y que son esenciales para que sea un biomaterial ideal, siendo su capacidad para promover el crecimiento celular; su biocompatibilidad provocando una respuesta mínima inflamatoria tras su implante, no es citotóxica; su biodegradabilidad; la buena resistencia a la tracción y su fácil manejo, destacando su transparencia óptica en todo el rango visible.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. García-lópez MC, Chan-navarro R, Lara-cerón JA. Fibroína y sericina de capullos de *Samia cynthia ricini drury*, 1773 (lepidoptera: saturniidae) y *Bombyx mori linnaeus*, 1758 (lepidoptera: bombycidae), y tinción intrínseca de larvas con compuestos de estaño. *Entomol Mex.* 2016;3:136–41.
2. Rios Osorio AD, Alvarez-López C, Cruz Riaño LJ, Restrepo-Osorio A. 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.* 2017;15(1):7–15.
3. Koh LD, Cheng Y, Teng CP, Khin YW, Loh XJ, Tee SY, et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Prog Polym Sci.* 2015;46:86–110.
4. Kundu B, Rajkhowa R, Kundu SC, Wang X. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(4):457–70.
5. Cejudo Palomo A. Universidad de Murcia. All rights Reserv IJES. 2015;281(4):1–30.
6. World Health Organization. World report on vision. Vol. 214, World health Organization. 2019. 1–160 p.
7. Mahdavi SS, Abdekhodaie MJ, Mashayekhan S, Baradaran-Rafii A, Djalilian AR. Bioengineering Approaches for Corneal Regenerative Medicine. *Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2020;17(5):567–93.
8. Gil ES, Mandal BB, Park SH, Marchant JK, Omenetto FG, Kaplan DL. Helicoidal multi-lamellar features of RGD-functionalized silk biomaterials for corneal tissue engineering. *Biomaterials.* 2010;31(34):8953–63.
9. Guan L, Tian P, Ge H, Tang X, Zhang H, Du L, et al. Chitosan-functionalized silk fibroin 3D scaffold for keratocyte culture. *J Mol Histol.* 2013;44(5):609–18.
10. Choi JH, Jeon H, Song JE, Oliveira JM, Reis RL, Khang G. Biofunctionalized lysophosphatidic acid/silk fibroin film for cornea endothelial cell regeneration. *Nanomaterials.* 2018;8(5):1–14.
11. Ahearne M, Fernández-Pérez J, Masterton S, Madden PW, Bhattacharjee P. Designing Scaffolds for Corneal Regeneration. *Adv Funct Mater.* 2020;30(44).
12. Hazra S, Nandi S, Naskar D, Guha R, Chowdhury S, Pradhan N, et al. Non-mulberry Silk Fibroin Biomaterial for Corneal Regeneration. *Sci Rep.* 2016;6(January):1–13.
13. Abdel-Naby W, Cole B, Liu A, Liu J, Wan P, Guaiquil VH, et al. Silk-derived protein enhances corneal epithelial migration, adhesion, and proliferation. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(3):1425–33.
14. Santin M, Motta A, Freddi G, Cannas M. In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J Biomed Mater Res.* 1999;46(3):382–9.
15. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin HJ, Karageorgiou V, Kaplan DL. Macrophage responses to silk. *Biomaterials.* 2003;24(18):3079–85.
16. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Kirker-Head C, McCool J, Gronowicz G, et al. The inflammatory responses to silk films in vitro and in vivo. *Biomaterials.* 2005;26(2):147–55.
17. Abdel-Naby W, Cole B, Liu A, Liu J, Wan P, Schreiner R, et al. Treatment with solubilized Silk-Derived Protein (SDP) enhances rabbit corneal epithelial wound healing. *PLoS One.* 2017;12(11):1–15.
18. Bhattacharjee P, Ahearne M. Significance of crosslinking approaches in the development of next generation hydrogels for corneal tissue engineering. *Pharmaceutics.* 2021;13(3):1–24.
19. Rajkhowa R, Gupta VB, Kothari VK. Tensile stress-strain and recovery behavior of Indian silk fibers and their structural dependence. *J Appl Polym Sci.* 2000;77(11):2418–29.
20. Rajkhowa R, Levin B, Redmond SL, Li LH, Wang L, Kanwar JR, et al. Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2011;97 A(1):37–45.
21. Ha SW, Tonelli AE, Hudson SM. Structural studies of *Bombyx mori* silk fibroin during regeneration from solutions and wet fiber spinning. *Biomacromolecules.* 2005;6(3):1722–31.
22. Jiang C, Wang X, Gunawidjaja R, Lin YH, Gupta MK, Kaplan DL, et al. Mechanical properties of robust ultrathin silk fibroin films. *Adv Funct Mater.* 2007;17(13):2229–37.

23. Applegate, M.B.; Partlow, B.P.; Coburn, J.; Marelli, B.; Pirie, C.; Pineda, R.; Kaplan, D.L.; Omenetto, F.G. Photocrosslinking of silk fibroin using riboflavin for ocular prostheses. *Adv. Mater.* 2016, 28, 2417–2420.
24. Bhattacharjee, P.; Fernández-Pérez, J.; Ahearne, M. Potential for combined delivery of riboflavin and all-trans retinoic acid, from silk fibroin for corneal bioengineering. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 105, 110093.
25. Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials.* 2009;30(7):1299–308.
26. Harkin DG, George KA, Madden PW, Schwab IR, Hutmacher DW, Chirila T V. Silk fibroin in ocular tissue reconstruction. *Biomaterials [Internet].* 2011;32(10):2445–58.
27. Wang Y, Rudym DD, Walsh A, Abrahamsen L, Kim H-J, Kim HS, et al. In vivo Degradation of Three-Dimensional Silk Fibroin Scaffolds. 2008;
28. Perry H, Gopinath A, Kaplan DL, Negro LD, Omenetto FG. Nano- and micropatterning of optically transparent, mechanically robust, biocompatible silk fibroin films. *Adv Mater.* 2008;20(16):3070–2.
29. Amsden JJ, Perry H, Boriskina S V., Gopinath A, Kaplan DL, Dal Negro L, et al. Spectral analysis of induced color change on periodically nanopatterned silk films. *Opt Express.* 2009;17(23):21271.
30. Madden PW, Lai JNX, George KA, Giovenco T, Harkin DG, Chirila T V. Human corneal endothelial cell growth on a silk fibroin membrane. *Biomaterials.* 2011;32(17):4076–84.
31. Vázquez N, Rodríguez-Barrientos CA, Aznar-Cervantes SD, Chacón M, Cenis JL, Riestra AC, et al. Silk fibroin films for corneal endothelial regeneration: Transplant in a rabbit descemet membrane endothelial keratoplasty. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(9):3357–65.
32. Liu J, Lawrence BD, Liu A, Schwab IR, Oliveira LA, Rosenblatt MI. Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(7):4130–8.
33. Ghezzi CE, Marelli B, Omenetto FG, Funderburgh JL, Kaplan DL. 3D functional corneal stromal tissue equivalent based on corneal stromal stem cells and multi-layered silk film architecture. *PLoS One*;12(1).
34. Li Y, Yang Y, Yang L, Zeng Y, Gao X, Xu H. Poly(ethylene glycol)-modified silk fibroin membrane as a carrier for limbal epithelial stem cell transplantation in a rabbit LSCD model. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Nov 7; 8(1)
35. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli M V., et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Heal.* 2017;5(12):e1221–34.