

Evaluación del crecimiento de fibroblastos humanos en andamios de fibroína de *Bombyx mori* L.

Evaluation of the growth of human fibroblasts on fibroin scaffolds from *Bombyx mori* L.

Duverney Gaviria Arias^{***}, Alexander Guevara Agudelo^{*}, Emmanuel Cano López^{**}

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77062

RESUMEN

La fibroína de *Bombyx mori* L., es un biomaterial que se ha utilizado por sus características físico/químicas que la hacen útil para la curación de múltiples tejidos. En el contexto de la medicina regenerativa caracterizar a nivel físico y biológico nuevos soportes preparados a partir de fibroína de seda y evaluar su capacidad para la proliferación de fibroblastos humanos, brinda una gran oportunidad para encontrar nuevos biomateriales con aplicaciones favorables en la curación de heridas. Se utilizó fibroína regenerada al 17% para la fabricación de matrices. Estas fueron caracterizadas teniendo en cuenta: estabilidad en condiciones de cultivo, ultraestructura, porosidad, ángulo de contacto y propiedades mecánicas. El grosor promedio de las matrices de fibroína fue 30,1 μm, con una estabilidad superior a 4 semanas en condiciones de cultivo, porosidad del 51% y una capacidad de retención de líquidos del 95%, un ángulo de contacto de 44,5° y un módulo de elasticidad de aproximadamente 200 MPa. Finalmente se evaluó la capacidad del andamio para soportar el crecimiento de fibroblastos humanos. Identificando que los andamios permiten la multiplicación celular, mostrando bajos índices de citotoxicidad (<5%); las células establecieron interacciones fuertes con el andamio, mediante la producción de filopodios y la producción de matriz extracelular propia. Concluyendo esto, que es un andamio compatible de fibroblastos humanos en los procesos para el crecimiento y multiplicación celular en procesos de medicina regenerativa.

Palabras clave: biotecnología, biomaterial, ingeniería tisular, medicina regenerativa, fibroína, multiplicación celular.

ABSTRACT

The fibroin of *Bombyx mori* L., has been used for its physical / chemical characteristics as a biomaterial with applications in the healing of multiple tissues. In the context of regenerative medicine, characterizing at a physical and biological level new supports prepared from silk fibroin and evaluating their capacity for the proliferation of human fibroblasts, offers a very attractive opportunity to find new biomaterials with favorable applications in the healing of wounds. 17% regenerated fibroin was used for the manufacture of matrices. The matrices constructed were characterized in aspects such as: stability under growing conditions, ultrastructure, porosity, contact angle and mechanical properties. Finally, the ability of the scaffold to support the growth of human fibroblasts was evaluated. The average thickness of the fibroin matrices was 30.1 μm, with a stability greater than 4 weeks under culture conditions, porosity of 51% and a liquid retention capacity of 95%, a contact angle of 44.5 ° and a modulus of elasticity of ± 200 MPa. It was identified that the scaffolds allow cell multiplication, showing low cytotoxicity indexes (<5%); the cells established strong interactions with the scaffold, through the production of filopodia and the production of their own extracellular matrix.

* Bacteriólogo, M.Sc en Genética Humana; Unidad de Investigación en Soportes Celulares y Medicina Regenerativa, Cromasoft LTDA. Bogotá D.C, Colombia. A1exand3r.1990@gmail.com.

** Microbiólogo Industrial; Unidad de Investigación en Soportes Celulares y Medicina Regenerativa, Cromasoft LTDA. Bogotá D.C, Colombia. emmanuelcc21@gmail.com.

*** Biólogo-Genetista, M.Sc Biología Molecular y Biotecnología, PhD (c). Autor correspondencia: duverney.gaviria@gmail.com.

Constructed scaffolds allow the multiplication of human cells with low cytotoxicity and these establish a close relationship at the cellular level with the biomaterial. This can be used as a compatible scaffold for the growth and multiplication of human cells in a regenerative medicine process of epithelial tissue.

Key words: biotechnology, biomaterial, tissue engineering, regenerative medicine.

Recibido: agosto 16 de 2018 **Aprobado:** noviembre 29 de 2018

INTRODUCCIÓN

Diferentes métodos de ingeniería de tejidos están siendo explorados como un medio para reemplazar tanto tejidos como órganos dañados (Hardy *et al.*, 2008). Este enfoque utiliza células específicas de tejido que crecen en un material de soporte o andamio para dar una estructura tridimensional con el objetivo de crear un tejido funcional (Vyas & Vasconez, 2014). Compuestos de origen diverso están siendo examinados para su uso. La fibroína del gusano de seda, *Bombyx mori* L., se ha utilizado ampliamente en el campo médico como material de sutura durante siglos. Sin embargo, problemas inmunológicos indeseables atribuidos a la presencia de la proteína sericina han limitado el uso de la fibroína en las últimas dos décadas (Vepari & Kaplan, 2007; Zhao *et al.*, 2015). Por lo tanto, la eliminación de la proteína sericina, permite que la fibroína de seda en forma de fibra o fibroína regenerada en forma de películas presenten una biocompatibilidad similar a la observada con otros materiales de sutura utilizados comúnmente (Nazarov *et al.*, 2004). Estas observaciones han despertado nuevamente el interés en el uso de la fibroína de seda como biomaterial (Gaviria & Caballero, 2015; Caballero *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016) Se ha demostrado que en material (fibroína) puede existir crecimiento de líneas celulares en placas de cultivo (Nazarov *et al.*, 2004), ejemplo de ello, la línea celular de fibroblastos de ratón, L-929, creció fácilmente en las películas hechas de fibroína (Liu *et al.*, 2010). Se ha utilizado fibroína de seda con peso molecular variado colocadas en superficies de L, D-ácido poli láctico, el cual facilitó la fijación y el crecimiento de osteoblastos *in vitro* (Chen *et al.*, 2017). Se ha notado que células similares a osteoblastos crecieron fácilmente en las películas de fibroína modificada con secuencias de reconocimiento de integrinas y se observó, adicionalmente, la inducción de marcadores de formación ósea (Melke *et al.*, 2016)

Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar las características de la fibroína como biomaterial a nivel físico/químico, mecánico y de ultraestructura. Se estudiaron sus propiedades de biocompatibilidad y citotoxicidad mediante el crecimiento de fibroblastos neonatales humanos y la interacción que las células establecen al crecer sobre el biomaterial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Producción y tratamiento de la fibroína

La fibroína de seda desgomada fue adquirida a la empresa CORSEDA Ubicada en el departamento del Cauca-Colombia (<http://corseda.com/>). La solución de fibroína de seda al 10% p/v se obtuvo con el uso del solvente iónico Bromuro de Litio (LiBr) a una concentración de 9,3 M, mediante incubación en baño de maría a 60°C durante 4 horas. Posteriormente esta solución fue dializada en tubo de diálisis (Spectra/Por MWCO 6-8000), con el fin de eliminar el LiBr, se tuvo la muestra durante 3 días en agua destilada con recambios cada 2 horas para el primer día, cada 4 horas para el segundo día y cada 6 horas para el tercer día. Finalmente, la solución obtenida fue contra-dializada con una solución de Polietilenglicol 6000-8000 al 30% (Sigma Aldrich, USA) hasta conseguir una concentración de fibroína del 17% (Caballero *et al.*, 2016).

Preparación de las películas de fibroína para el cultivo celular

Para la preparación de los soportes de fibroína se dispensaron 2,5 mL en cajas de cultivo celular de 35mm, se secaron por flujo de aire en cabina de flujo laminar durante 72 horas. Finalizado el periodo de secado, se indujo la formación de hojas- β con la adición de 0,5 mL de metanol absoluto. Finalmente, las películas fueron esterilizadas con 1 mL de etanol al 70% y almacenadas a 4°C para su uso posterior (Caballero *et al.*, 2016).

Estabilidad y porosidad de los andamios de fibroína

Con el fin de evaluar la estabilidad de las películas de fibroína regenerada, se tomaron 3 cajas de cultivo con películas de fibroína, estas fueron lavadas inicialmente con solución amortiguadora salina fosfato (PBS) 1X estéril y posteriormente incubadas durante tres semanas con 2 mL de medio completo (DMEM + SFB 10% + antibióticos). La estabilidad se basó en la liberación de proteínas, péptidos o aminoácidos desde el andamio, como blanco se usó medio completo. Esta liberación fue cuantificada mediante espectrofotometría a 280nm usando equipo NanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA). La cuantificación fue llevada a cabo los días 8, 16 y 24, para esta se tomó 1 μ L de medio de cada una de las placas, con y sin película de fibroína.

Se evaluó la porosidad de las películas de fibroína regenerada mediante el método de desplazamiento de líquido (Kim *et al.*, 2005). En este ensayo se usó hexano, en la medida que este no disuelve la fibroína y a pesar de permear a través de esta no produce una hinchazón significativa. Para la medición, las películas de fibroína fueron sumergidas en un volumen conocido de hexano (V1) en una probeta calibrada durante 5 min. Se registró el volumen total del andamio de fibroína regenerada impregnado con hexano junto con hexano (V2). Se registró el volumen de hexano residual en el cilindro después de retirar el andamio impregnado con hexano (V3). Finalmente, la porosidad (A) de la película de fibroína se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% A = (V1 - V3)/(V2 - V3) * 100$$

La capacidad de absorción de agua fue también evaluada; el peso en seco de películas de fibroína fueron registradas (Wd), luego se sumergieron 24 horas en un volumen conocido de agua y se registró su peso húmedo (Ws), el porcentaje de absorción de agua se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Contenido H}_2\text{O} = \left(\frac{W_s - W_d}{W_d} \right) * 100$$

Caracterización ultra-estructural y medición del ángulo de contacto

La evaluación de las características ultra estructurales de las películas de fibroína se llevó a cabo mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). El equipo utilizado fue un JEOL, modelo JSM 6490-LV con un haz de electrones acelerado ajustado entre 5-20 kV. Este proceso fue realizado en las instalaciones del Centro de microscopía de la Universidad de los Andes; Bogotá, Colombia. Para esto las películas de fibroína fueron fragmentadas (10-20 mm²) y observadas a aumentos de 8X, 50X, 400X, 1000X y 2000X.

Además, también se evaluaron las propiedades de histocompatibilidad de las películas de fibroína regenerada por medio de la evaluación del ángulo de contacto. Para esta medición se utilizaron 4 uL de agua, con el fin de mantener el principio de esfericidad, los cuales fueron depositados en un soporte hidrofóbico (papel *parafilm*) y sobre la superficie de la película, se realizaron 10 mediciones para la determinación del ángulo con el uso del programa de análisis de imágenes *Image J* (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Caracterización mecánica de los soportes de fibroína

Las propiedades mecánicas de los andamios de fibroína se determinaron usando un microtester Instron 5848

(Canton, MA, USA) en el Laboratorio de Mecánica de la Universidad de los Andes; Bogotá, Colombia. Se montaron tiras rectangulares de 4 x 4 mm. Todos los ensayos se realizaron a una velocidad de extensión de ensayo de 1 mm/min, tanto a 25°C como 37°C, con una humedad relativa de 50-60%. Se utilizó una celda de carga de 0,5 kN. Los resultados fueron obtenidos a partir del uso de 5 probetas de ensayo. Se registraron datos correspondientes a las siguientes variables: Factor de Ruptura, Fr (kN/m), Esfuerzo Máximo: $\sigma_{\text{máx}}$ (MPa), Esfuerzo a la ruptura: σ_{rup} (MPa), Elongación a ruptura, Lrup (%), Esfuerzo de fluencia: σ_{ys} (MPa) y Elongación en fluencia, Lys (%).

Proliferación celular sobre películas de fibroína

El crecimiento celular fue evaluado en cajas de cultivo de poliestireno de 35 mm revestidas con películas de fibroína al 17%, preparada como se describió anteriormente. El cultivo de los fibroblastos se inició con 48.000 cel/mL, el cambio de medio se llevó a cabo cada 3 días, hasta que las células alcanzaron un 80% de confluencia. Las células fueron desprendidas con el uso de 1 mL de solución de Tripsina/EDTA (Invitrogen, USA) en una proporción 3:1 (0,25%), durante 1min a 37°C, la reacción fue detenida añadiendo 2 mL de medio completo. El conteo celular y la viabilidad fueron llevados a cabo en cámara de Neubauer con el uso de la coloración supra vital azul de tripán, como control de crecimiento se usaron células (HDFn) en cajas de cultivo sin recubrimiento de fibroína en medio completo.

Interacción celular con los andamios de fibroína

Para confirmar la interacción de las células con los andamios de fibroína, se empleó MEB, inicialmente, los andamios con células fueron fijados con una solución de paraformaldehído al 4% (Merk, USA), posteriormente, deshidratados mediante lavados progresivos de alcohol etílico desde 50% hasta 100%, finalmente, secados a punto crítico (SPC) empleando el equipo SAMDRI®-795 (USA). Las películas de fibroína con células fueron fragmentadas (10-20mm²) y observadas a 8X, 50X, 400X, 1000X y 2000X en las instalaciones del Centro de microscopía de la Universidad de los Andes; Bogotá, Colombia.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como valores promedio \pm la desviación estándar para las réplicas utilizadas en cada uno de los ensayos. La significancia estadística se evaluó usando la prueba estadística t-student de una vía (sin asterisco P > 0.05; *, P < 0.1; **, P < 0.01; ***, P < 0.001), los valores indican la significancia de cada uno de los resultados. Los análisis fueron realiza-

Tabla 1. Evaluación características mecánicas películas de fibroína. Los datos mostrados representan el promedio de 5 réplicas biológicas \pm DE.

Temperatura	Factor de Ruptura Fr (kN/m)	Esfuerzo Máximo (MPa)	Esfuerzo a la ruptura (MPa)	Elongación a ruptura (%)	Esfuerzo de fluencia σ_{ys} (MPa)	Elongación en fluencia, Lys (%)
25°C	191,2 \pm 77,6	28,9 \pm 11,7	25,1 \pm 10,9	34,4 \pm 14,3	28,9 \pm 11,7	33,4 \pm 14,1
37°C	157,6 \pm 101,2	25,6 \pm 15,8	24,0 \pm 17,4	20,2 \pm 22,5	25,6 \pm 15,8	15,5 \pm 11,9

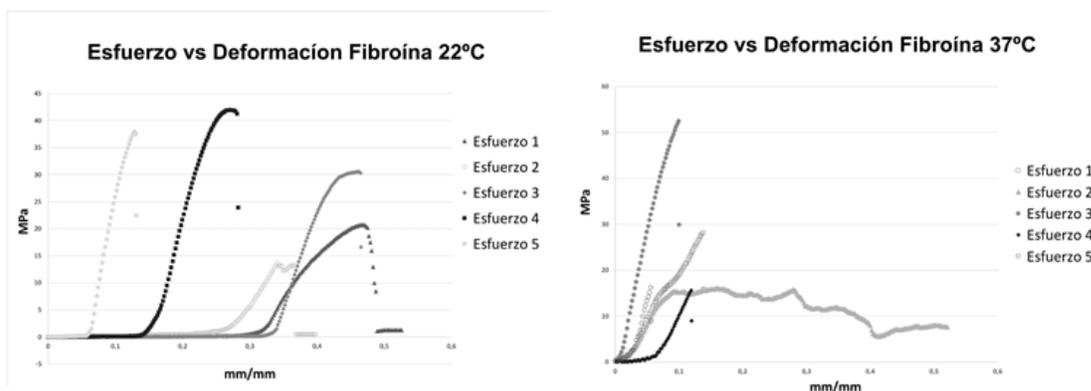


Figura 1. Evaluación de la resistencia mecánica de películas de fibroína. A) Secciones de películas de fibroína sometidas a tensión mecánica (MPa) por área (mm/mm) a temperatura ambiente 22°C; B) Secciones de películas de fibroína sometidas a tensión mecánica MPa por área mm/mm a 37°C.

dos mediante el paquete de ofimática de Microsoft, Excel versión 2017.

RESULTADOS

Producción películas de fibroína

Las películas de fibroína expusieron características de transparencia, translucidez y resistencia mecánica. Además, mostraron características de desprendimiento del soporte de polipropileno donde fueron dispuestas.

Propiedades mecánicas de los soportes de fibroína

Según los resultados obtenidos, las películas de fibroína mostraron una mayor resistencia en términos de rigidez a temperatura ambiente de 25°C, ya que se necesitó mayor fuerza de esfuerzo para su ruptura que en el caso de la evaluación de este parámetro a 37°C. Por otro lado, el porcentaje de estiramiento antes de la deformación de las probetas de ensayo fue mayor, (34,4%) a temperatura ambiente en comparación a una temperatura de 37°C, el cual fue de (20,2%) (tabla 1).

La relación entre el estado de esfuerzos inducido en películas de fibroína por la aplicación de una fuerza, y su deformación, fue representada gráficamente. Se observa una curva típica de la relación entre esfuerzo (MPa) y deformación (mm/mm) de fragmentos de películas de fibroína a temperatura ambiente (22°C) y a una temperatura de 37°C respectivamente (figura 1). El

módulo de elasticidad se calculó como la pendiente de la región lineal de las curvas obtenidas, los resultados promedio fueron de 157.91 MPa para el biomaterial a 22°C y de 245.34 para el biomaterial a 37°C.

Evaluación de la estabilidad y caracterización fisicoquímica y de los andamios de fibroína

Con el fin de verificar el nivel de estabilidad de los soportes de fibroína y su degradación en condiciones de cultivo. Las películas de fibroína regenerada fueron cultivadas y evaluadas en el tiempo. Según los resultados, las películas de fibroína regenerada mostraron un incremento en la liberación de proteínas al medio circundante; ya que se observó que la densidad óptica (OD) se incrementó hasta 3 veces con respecto al control (Medio de cultivo en ausencia de películas de fibroína). La liberación de péptidos y aminoácidos a partir de la matriz logra estabilizarse a la cuarta semana ya que se observa una reducción en la OD (figura 2).

Caracterización ultraestructural por (MEB) y medición del ángulo de contacto

La caracterización ultraestructural de las películas de fibroína regenerada se realizó mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), según los resultados, estas exhibieron estructuras rugosas distribuidas de forma aleatoria, la rugosidad solo fue visible a partir de un aumento de 400X, haciéndose más evidentes a 1000X (figura 3 a-c). Se realizaron cortes trasversa-

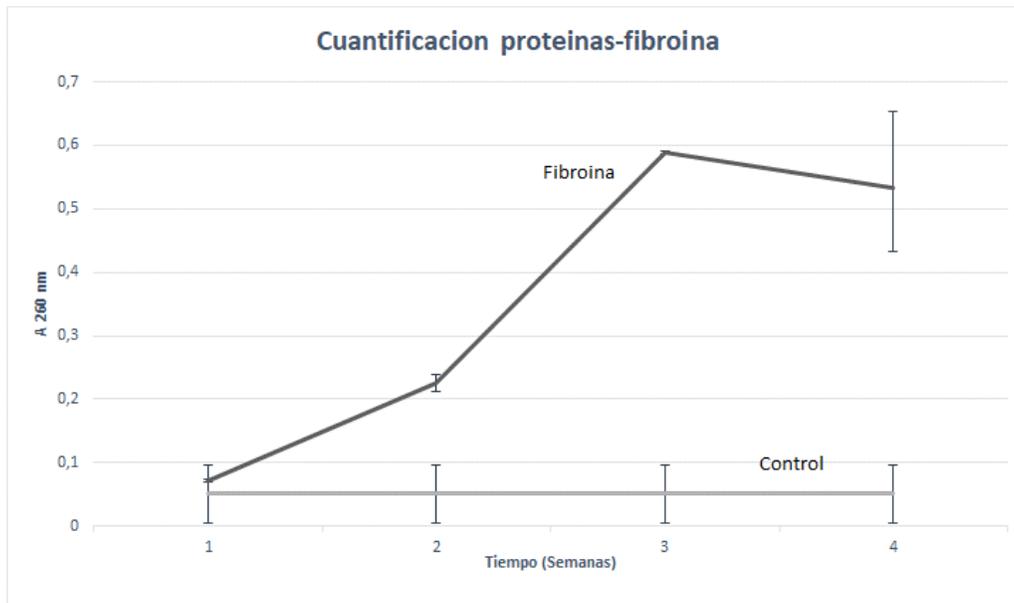


Figura 2. Estabilidad del soporte (películas de fibroína regenerada) en condiciones de cultivo. Los datos mostrados representan la media de 3 réplicas biológicas \pm DE.

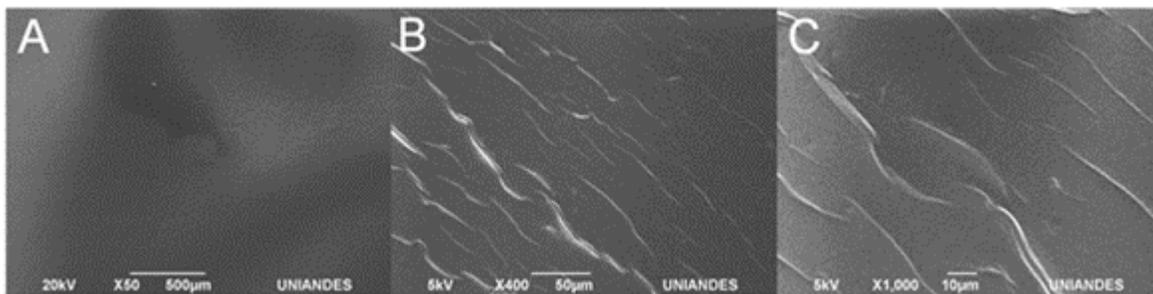


Figura 3. Microscopia electrónica de Barrido (MEB) de películas de fibroína. Cortes de películas de fibroína fueron observadas a A) 50X; B) 400X y C) 1000X. Las imágenes corresponden a observaciones de la superficie de las películas.

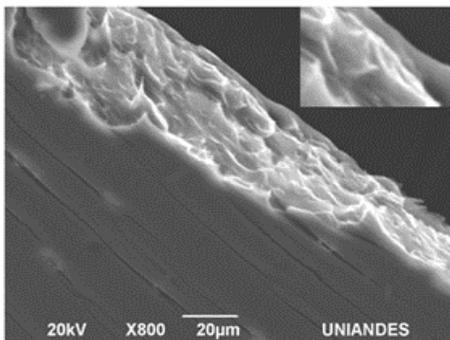


Figura 4. Microscopia electrónica de Barrido (MEB) de cortes transversales de películas de fibroína. Se realizaron cortes transversales de películas de fibroína con el fin de determinar el grosor de estas. Para ello se realizaron 5 mediciones empleando el software de análisis de imágenes *Image J*. Las imágenes fueron observadas a 800X. Se muestra un acercamiento de la corteza exterior de la película de fibroína con una longitud de aproximadamente de $3,3 \mu\text{M}$.

les de películas de fibroína para verificar, su grosor y evaluar la eficacia del tratamiento para inducir laminas- β .

Según los resultados, las películas presentan dos regiones claramente definidas, una corteza externa de menor longitud de aproximadamente $3,4 \mu\text{M}$ y una región interna de aproximadamente $30,1 \mu\text{M}$ (figura 4).

Los resultados obtenidos por análisis de ángulo de contacto muestran que las películas de fibroína presentan un ángulo inferior de $(44,5^\circ \pm 0,7)$ con respecto al ángulo que presentó una gota de agua en una superficie hidrófoba $(83,8^\circ \pm 0,3)$ (figura 5). Bajos ángulos de contacto corresponden a mayor humectabilidad; la cual generalmente indica que la superficie del material es más hidrófila, facilitando la adhesión y proliferación celular (Cwikelt *et al.*, 2010)

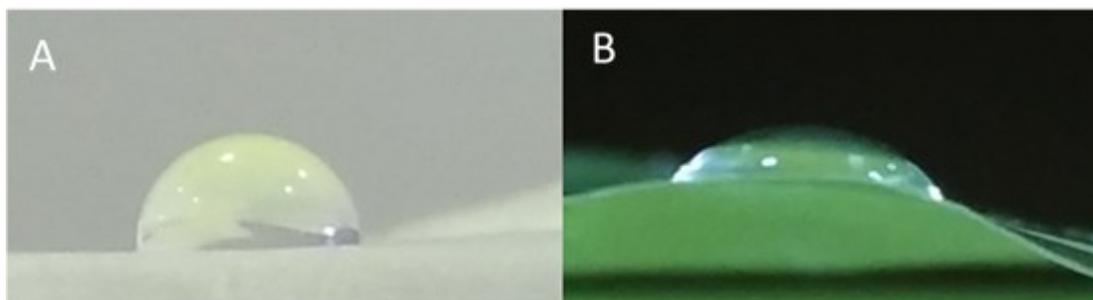


Figura 5. Ángulo de contacto películas de fibroína. A) Control gota de agua sobre superficie hidrófoba; B) gota de agua sobre película de fibroína regenerada. La determinación de los ángulos de contacto corresponde a la media de 5 mediciones independientes.

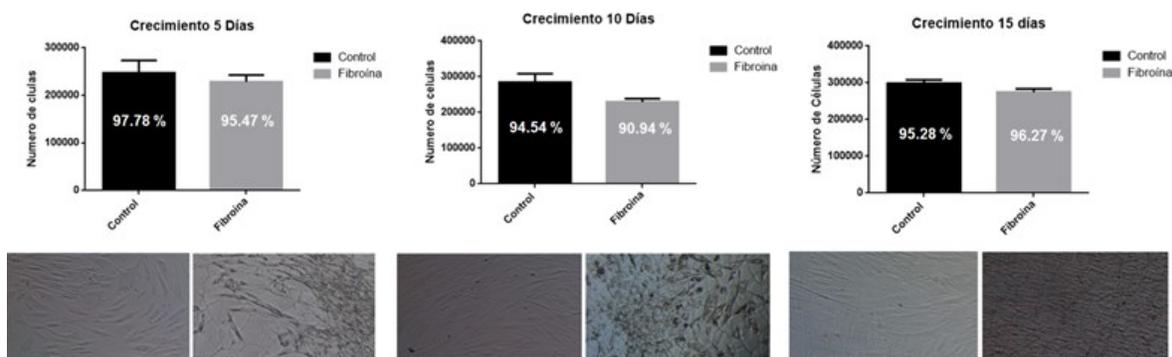


Figura 6. Crecimiento de HDFn en películas de fibroína. Fibroblastos fueron crecidos durante 5, 10 y 15 días en placas revestidas en presencia y/o ausencia de películas de fibroína. El conteo celular fue realizado en cámara de Neubauer y su viabilidad celular fue evaluada mediante la coloración supra vital azul de tripan. Los datos mostrados representan la media de 3 réplicas biológicas \pm DE. La significancia estadística se evaluó usando la prueba estadística t-student de una vía (sin asterisco $P > 0.05$; *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$)

Crecimiento de HDFn en los andamios de fibroína

El crecimiento celular no presentó diferencias significativas con respecto al control de crecimiento; se observa una distribución homogénea del crecimiento de los fibroblastos humanos adheridos a la superficie de la película de fibroína. No hubo variación en la morfología celular del crecimiento tanto en placas revestidas de fibroína como en placas control. La citotoxicidad y el recuento celular se realizaron a los 5, 10 y 15 días de cultivo. Como se observa en la figura 6, los porcentajes de viabilidad celular oscilaron entre 90-95%, evaluada por coloración supra vital, azul de tripan, tanto para fibroblastos control como fibroblastos crecidos en las películas de fibroína.

Evaluación de la interacción de células con los biomateriales fabricados de fibroína de seda

La adhesión y proliferación temprana de las células a los biomateriales son aspectos necesarios en todo proceso de regeneración. Con el fin de observar el crecimiento y los niveles de interacción de los HDFn con las matrices de fibroína, se tomaron microfotografías por

MEB de fibroblastos crecidos durante 2 días en películas de fibroína. Como se observa en la figura 7, las células, presentan un crecimiento homogéneo en el área del soporte, además estableciendo una fuerte interacción con el soporte mediante la formación de filopodios (Hoffmann & Schäfer, 2010) y la generación de una gran cantidad de matriz extracelular (figuras 7 C y D).

DISCUSIÓN

El desarrollo de nuevos productos, especialmente compuestos de materiales biológicos como matrices descelularizadas, colágeno, alginato, entre otros están surgiendo en los últimos años (Ki *et al.*, 2012; Garreta *et al.*, 2017; Stark *et al.*, 2006). Sin embargo, el desarrollo de apósitos ideales para la curación de heridas en tejido epitelial se encuentra todavía en progreso. La fibroína es un polímero de proteína natural que ha sido aprobado para uso médico por la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU (FDA) (Kundu *et al.*, 2013; Rockwood *et al.*, 2011). La fibroína de seda es procesada a partir de la seda cruda después de la eliminación

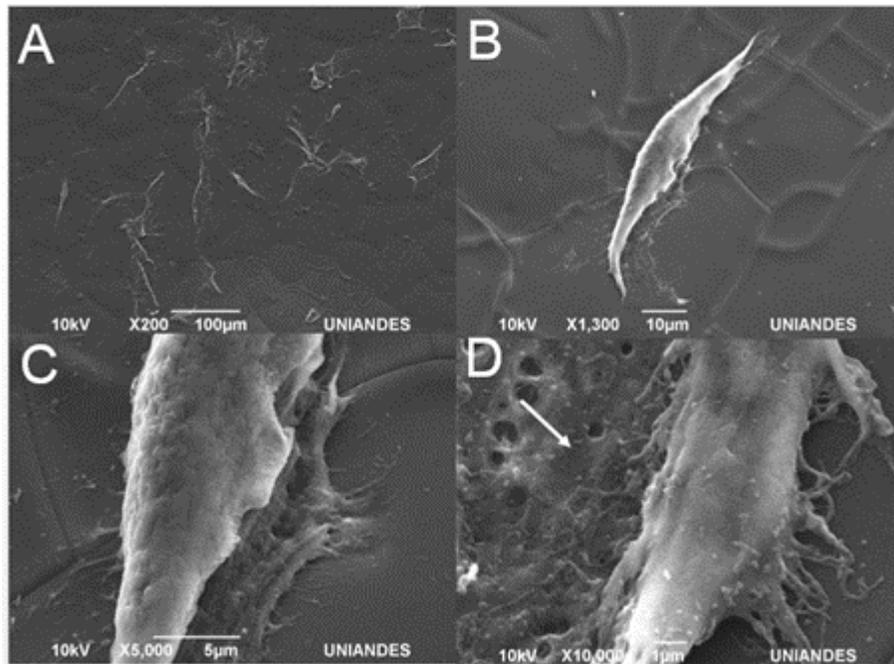


Figura 7. Micrografías electrónicas de fibroblastos dérmicos humanos neonatales. Películas de fibroína fueron cultivadas con fibroblastos humanos y observadas por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Las películas de fibroína con células fueron fragmentadas (10-20mm²) y observadas a A. 200X, B. 1300X, C. 5000X y D. 10.000X. En la figura D, la flecha indica el establecimiento de matriz extracelular propia de la célula, sobre las películas de fibroína.

de la cobertura exterior (sericina) que potencialmente podría desencadenar una reacción inmune (Aramwit *et al.*, 2009). La fibroína tiene características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, notable resistencia mecánica y baja inmunogenicidad. Por lo tanto, ha sido ampliamente utilizada en ingeniería de tejidos y aplicaciones de medicina regenerativa tales como reconstrucción de tejido óseo, cartílago y curación de heridas en tejido cutáneo (Farokhi *et al.*, 2018; Sheikh *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017). Para su utilización en la regeneración de piel, debe cumplir con características de transparencia y resistencia mecánica que permitan una buena permeabilidad al oxígeno y vapor de agua (Gil *et al.*, 2013).

Los hallazgos aquí mostrados evidencian que la metodología usada para la producción de películas de fibroína fue adecuada para generar películas con condiciones de translucidez y alta resistencia mecánica. Esta última característica se verificó mediante la evaluación de resistencia a la ruptura de las películas de fibroína a una fuerza determinada; según los resultados, las películas de fibroína mostraron un comportamiento de un biomaterial termoplástico anisótropo, en el cual la elasticidad se incrementa con el aumento de la temperatura y que su comportamiento depende de la dirección en la cual

se aplica la fuerza. Kweon y Colaboradores, describieron las características mecánicas de películas de fibroína y matrices de quitosano mostrando resultados similares a los encontrados en este trabajo (Kweon *et al.*, 2001).

La degradabilidad de los biomateriales de seda depende de las características morfológicas, los modos de procesamiento y el contenido de hojas- β (Drury & Mooney, 2003; Kundu *et al.*, 2013). La estructura de poro de los materiales de seda, el peso del andamio regenerado y la composición en contenido de hojas- β afectan su tasa de degradación (Makaya, *et al.*, 2009). Para verificar el nivel de estabilidad de las películas de fibroína en el tiempo, se realizó la medición de liberación de proteínas durante 4 semanas. Según los resultados, se observó un pico máximo de degradación de las películas de fibroína a los 21 días de cultivo ya que se presentó el incremento en la liberación de péptidos y aminoácidos reflejados por el incremento de la densidad óptica OD de 0,8. Idealmente, la tasa de degradación del andamio debe reflejar la tasa de regeneración de tejido sobre el cual este está trabajando (Kojthung *et al.*, 2008; Numata *et al.*, 2010). La tasa de degradación es deseable para las diversas necesidades de regeneración tisular; por ejemplo, un andamio para procesos de rege-

neración ósea requiere una tasa de degradación lenta, mientras que un andamio para la reparación de tejido dérmico requiere una degradación más rápida. (Lu *et al.*, 2011) muestran tasas de degradación de películas de fibroína tratadas y sin tratar con metanol para inducir estructuras de lámina- β con un tiempo de degradación similar a los resultados aquí mostrados. La estructura de lámina- β se consideró como un factor crítico que estabilizaba la fibroína de seda en entornos acuosos, pero las películas de seda, tratadas mediante metanol, muestran propiedades de degradación totalmente diferentes incluso cuando las películas tienen contenidos similares de lámina- β . Para controlar el comportamiento de degradación, es necesario explorar los factores potenciales que afectan su degradación. Trabajos previos han demostrado que las películas de seda tratadas con metanol exhiben un aumento de casi 3 veces en contenido de hoja- β en comparación con las películas de seda tratadas mediante el método de recocido con agua (*water annealing*) (Lawrence *et al.*, 2010). Por tanto, es importante entender cómo las propiedades del material de la película de seda cambian con respecto a este cambio en contenido de hoja- β . Por ejemplo, este tipo de información es importante para el diseño de un dispositivo de seda destinado a aplicaciones *in vivo*. Al comprender mejor cómo el agua influye en las propiedades de los materiales de seda, los métodos de procesamiento se pueden adaptar para diversas funciones. Además, la organización de la estructura secundaria de proteínas es importante para entender cómo la presencia de solventes, como agua o metanol afecta al material en forma de película.

El porcentaje de porosidad de preparados de fibroína se relaciona con el nivel de permeabilidad de las películas que permita la difusión de metabolitos a través del soporte. El promedio de porosidad de 5 películas de fibroína fue de 51%, esto indica que el nivel de permeabilidad de las películas de fibroína ensayadas facilita el intercambio de moléculas. De igual forma el porcentaje de absorción de agua de películas de fibroína fue superior de 95%, lo que indica el buen comportamiento de la fibroína como soporte captador de moléculas de agua o medio de cultivo. Solo unos pocos estudios se han centrado en cómo la hidratación afecta las propiedades del material de seda ya que las fibras nativas son inherentemente muy estables a la hidratación (Lawrence *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante comprender mejor cómo las propiedades físicas de estos tipos de las películas de seda se alteran en ambientes hidratados. A medida que los usos de la fibroína de seda se expanden, es importante comprender cómo las propiedades del biomaterial cambian cuando se

introducen en condiciones ambientales específicas, como, por ejemplo, el agua. La capacidad de absorción de agua y su retención son factores importantes para determinar la utilidad de los biomateriales.

Según los resultados de caracterización de ultraestructura, las películas de fibroína, presentaron superficies preferencialmente rugosas distribuidas de manera heterogénea. Este hallazgo está asociado con facilitar la adherencia celular a la superficie del andamio. Se observaron además 2 regiones definidas, las cuales podrían estar relacionadas con el proceso de cristalización llevado a cabo con el uso de metanol, el cual al parecer no alcanza a penetrar completamente la película y producir un efecto sobre toda la sección trasversal de esta. Este resultado puede asociarse con características oclusivas efectivas frente a microorganismos (Kunz *et al.*, 2016). Finalmente, la interacción entre las células y el andamio depende de las propiedades físicas y químicas del biomaterial como su topografía rugosidad, energía superficial e hidrofiliidad. Los resultados evidencian que las matrices de fibroína presentan características intrínsecas que podrían estar involucradas con facilitar la adherencia celular.

Las células pueden adherirse, crecer y multiplicarse sobre el soporte, generar una matriz extracelular que reemplazará el soporte de fibroína regenerada permitiendo consolidar un tejido con las características estructurales y bioquímicas del tejido natural. Además, con respecto a la citotoxicidad, el soporte utilizado no afectó de manera significativa el crecimiento celular mostrando resultados similares en términos de cantidad y morfología con respecto al control (cajas de cultivo sin recubrimiento de películas de fibroína) luego de 15 días de crecimiento. Por lo tanto, los resultados obtenidos sustentan la hipótesis que películas preparadas a partir de fibroína poseen características adecuadas para su utilización como biomaterial, El hecho que las células sembradas en el biomaterial hayan establecido una fuerte interacción y hallan proliferado con un alto grado de cito compatibilidad por la generación de estructuras celulares denominadas filopodios (Hoffmann & Schäfer, 2010) y lleven a cabo la deposición de grandes cantidades de matriz extracelular, indica que el soporte de fibroína regenerada será reemplazado de manera eficiente con la matriz extracelular propia de la célula sobre ella sembrada.

CONCLUSIONES

Se reporta la preparación de andamios en forma de películas de matriz extracelular de fibroína derivada de

capullos del gusano de seda, *Bombyx mori* L. Los andamios estudiados presentaron parámetros adecuados en ángulo de contacto, porosidad, fuerza mecánica, degradación y capacidad de hinchazón; cumpliendo así los requisitos de un biomaterial apto para ser usado en ingeniería de tejidos para el crecimiento, proliferación y mantenimiento células epiteliales. Los resultados de cito compatibilidad y de microscopia electrónica de barrido (MEB) del soporte de fibroína con células, lo catalogan como un biomaterial prometedor en medicina regenerativa de tejidos dérmicos basada en ingeniería tisular para el tratamiento de heridas crónicas y agudas al igual que quemaduras de primero y segundo grado.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación de este trabajo a la empresa Cromasoft LTDA, y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (COLCIENCIAS) en el marco de la convocatoria-747 para obtener deducciones tributarias por inversiones I+D+i.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aramwit, P., Kanokpanot, S., De-Eknamkul, W., & Srichana, T. (2009). Monitoring of inflammatory mediators induced by silk sericin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 107(5), 556-561.
- Caballero M.L., Rivera C.J., & Gaviria A.D. (2016). Evaluación de la fibroína de seda como biomaterial de soporte para el crecimiento de células mesenquimales estromales de pulpa dental. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, 41(1), 5-13.
- Chen, B.Q., Kankala, R.K., Chen, A.Z., Yang, D.Z., Cheng, X.X., Jiang, N.N., et al. (2017). Investigation of silk fibroin nanoparticle-decorated poly(l-lactic acid) composite scaffolds for osteoblast growth and differentiation. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1877-1890.
- Cwikelt, D., Zhao, Q., Liu, C., Su, X., & Marmun, A. (2010). Comparing contact angle measurements and surface tension assessments of solid surfaces. *Langmuir*, 26(19), 15289-15294.
- Drury, J.L., & Mooney, D.J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351.
- Farokhi, M., Mottaghitalab, F., Samani, S., Shokrgozar, M.A., Kundu, S.C., Reis, R. L., et al. (2018). Silk fibroin/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 36(1), 68-91.
- Garreta, E., Oria, R., Tarantino, C., Pla-Roca, M., Prado, P., Fernández-Avilés, F., Campistol, J.M., Samitier, J., Montserrat, N. (2017). Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Materials Today*, 20(4), 166-178
- Gaviria A.D., & Caballero M.L. (2015). Uso de biomateriales a partir de la fibroína de gusano de seda (*Bombyx mori* L.) para procesos de medicina regenerativa basada en ingeniería de tejidos. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1), 38-47.
- Gil, E.S., Panilaitis, B., Bellas, E., & Kaplan, D.L. (2013). Functionalized silk biomaterials for wound healing. *Advanced Healthcare Materials*, 2(1), 206-217.
- Hardy, J.G., Römer, L.M., & Scheibel, T.R. (2008). Polymeric materials based on silk proteins. *Polymer*, 49(20), 4309-4327.
- Hoffmann, B., & Schäfer, C. (2010). Filopodial focal complexes direct adhesion and force generation towards filopodia outgrowth. *Cell Adhesion & Migration*, 4(2), 190-193.
- Ki, S.B., Singh, D., Kim, S.C., Son, T.W., & Han, S.S. (2012). Effect of cross-linkers in fabrication of carrageenan-alginate matrices for tissue engineering application. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 60(6), 589-595.
- Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M., & Kaplan, D.L. (2005). Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials*, 26(15): 2775-2785.
- Kojthung, A., Meesilpa, P., Sudatis, B., Treeratana-piboon, L., Udomsangpetch, R., & Ookhanond, B. (2008). Effects of gamma radiation on biodegradation of *Bombyx mori* silk fibroin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(4), 487-490.
- Kundu, B., Rajkhowa, R., Kundu, S.C., & Wang, X. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(4), 457-470.

- Kunz, R.I., Costa Brancalhao, R.M., Chasko Ribeiro, L.D., & Marcal Natali, M.R. (2016). Silkworm sericin: properties and biomedical applications. *Bio-Med Research International*, 2016 (8175701), 19.
- Kweon, H., Ha, H.C., Um, I.C., & Park, Y.H. (2001). Physical properties of silk fibroin/chitosan blend films. *Journal of Applied Polymer Science*, 80(7), 928-934.
- Lawrence, B.D., Wharram, S., Kluge, J.A., Leisk, G.G., Omenetto, F.G., Rosenblatt, M., et al. (2010). Effect of hydration on silk film material properties. *Macromolecular Bioscience*, 10(4), 393-403.
- Liu, T.L., Miao, J.C., Sheng, W.H., Xie, Y.F., Huang, Q., Shan, Y.B., et al. (2010). Cytocompatibility of regenerated silk fibroin film: a medical biomaterial applicable to wound healing. *Journal of Zhejiang University Science B*, 11(1), 10-16.
- Lu, Q., Zhang, B., Li, M., Zuo, B., Kaplan, D.L., Huang, Y., et al. (2011). Degradation mechanism and control of silk fibroin. *BioMacromolecules*, 12(4), 1080-1086.
- Makaya, K., Terada, S., Ohgo, K., & Tetsuo, A. (2009). Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(1), 68-75.
- Melke, J., Midha, S., Ghosh, S., Ito, K., & Hofmann, S. (2016). Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 31, 1-16.
- Nazarov, R., Jin, H.J., & Kaplan, D.L. (2004). Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin. *BioMacromolecules*, 5(3), 718-726.
- Numata, K., Cebe, P., & Kaplan, D.L. (2010). Mechanism of enzymatic degradation of beta-sheet crystals. *Biomaterials*, 31(10), 2926-2933.
- Rockwood, D.N., Preda, R.C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M.L., & Kaplan, D.L. (2011). Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nature Protocols*, 6(10), 379.
- Sheikh, F.A., Woo J.H., Min L.J., Moon, B. M., Parks, H.J., Lee, O.J., et al. (2015). 3D electrospun silk fibroin nanofibers for fabrication of artificial skin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(3), 681-691.
- Stark, Y., Suck, K., Kasper, C., Wieland, M., Van Griensven, M., & Scheper, T. (2006). Application of collagen matrices for cartilage tissue engineering. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(4), 305-311.
- Vepari, C., & Kaplan, D.L. (2007). Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*, 32(8-9), 991-1007.
- Vyas, K.S., & Vasconez, H.C. (2014). Wound healing: biologics, skin substitutes, biomembranes and scaffolds. *Healthcare*, 2(3), 356-400.
- Wang, Y., Wang, X., Shi, J., Zhu, R., Zhang, J., Zhang, Z., et al. (2016). A biomimetic silk fibroin/sodium alginate composite scaffold for soft tissue engineering. *Scientific Reports*, 6(39477), 1-13.
- Zhao, Z., Li, Y., & Xie, M.B. (2015). Silk fibroin-based nanoparticles for drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(13), 4880-4903.
- Zhou, F., Zhang, X., Cai, D., Li, J., Mu, Q., Zhang, W., et al. (2017). Silk fibroin chondroitin sulfate scaffold with immuno-inhibition property for articular cartilage repair. *Acta Biomaterialia*, 63, 64-75.