

Desarrollo y caracterización de películas de fibroína de seda para reparación condral

Development and characterization of silk fibroin films for condral reparation

Lyda Caballero Méndez*, Duverney Gaviria Arias**

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.73137

RESUMEN

La fibroína de seda es una proteína que ha demostrado ser un biomaterial con gran potencial en medicina regenerativa, por sus características de biocompatibilidad y su amplia posibilidad de modificación estructural permite ser usada como andamio favoreciendo procesos de crecimiento, diferenciación celular y la regeneración del tejido afectado.

En este estudio se utilizaron capullos de gusano de seda *Bombyx mori* L., para la fabricación de películas de fibroína, los capullos fueron desgomados utilizando Na_2CO_3 0,02M, la fibroína obtenida se disolvió con LiBr 9,3M, el cual fue eliminado mediante diálisis y finalmente la solución de fibroína fue concentrada mediante contradiálisis. La fibroína fue servida en cajas de poliestireno, secadas a $90^\circ\text{C}/24$ horas y esterilizadas con etanol al 70%. Células madre mesenquimales fueron sembradas sobre estas películas de fibroína e inducidas a diferenciación utilizando un medio condrogénico específico. La diferenciación fue evaluada por triplicado a los 14 y 21 días mediante extracción de ARN total, síntesis de ADN copia y amplificación por PCR de un grupo de genes específicos de cartílago empleando cebadores específicos.

Se fabricaron películas de fibroína estables y resistentes que permitieron el crecimiento y la multiplicación celular, así como la diferenciación condrogénica evidenciada por la expresión de genes condrogenicos, no se afectó la viabilidad ni el recuento celular, las células interactuaron con el andamio evidenciado por el área de tapizado formado sobre la superficie de la película de fibroína. Finalmente se concluye que la fibroína de seda es un biomaterial que puede servir de andamio potencial para la regeneración de lesiones articulares.

Palabras clave: *Bombyx mori*; biomateriales; factor de crecimiento; condrogénesis; medicina regenerativa.

ABSTRACT

Silk fibroin is a protein that has been shown to be a biomaterial with great potential in regenerative medicine, due to its biocompatibility characteristics and its wide possibility of structural modification can be used as scaffold, favoring growth processes, cell differentiation and the regeneration of affected tissue. *Bombyx mori* L. silkworm cocoons were used to make fibroin films, the silk fibroin were degummed using 0.02M Na_2CO_3 , the obtained fibroin was dissolved with 9.3M LiBr, which was eliminated by dialysis and finally the fibroin solution was concentrated to 17% by counterdialysis. The fibroin was served in polystyrene boxes, dried at $90^\circ\text{C}/24$ hours and sterilized with 70% ethanol. The mesenchymal stem cells were seeded on fibroin films and induced differentiation using a specific chondrogenic medium. Differentiation was assessed in triplicate at 14 and 21 days by total RNA extraction, DNA

* Magister Biología Molecular. Centro de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Salud, Docente Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira. Colombia. Lydaccm_27@utp.edu.co. ORCID: 0000-0001-6504-3149. Datos de correspondencia: Universidad Tecnológica de Pereira. Vereda la Julita. Programa de Medicina Veterinaria (036) 3137166.

** Doctor Ciencias Básicas Biomédicas (c). Director Grupo Investigación Biotriskel. Institución Cromasoft Ltda. Bogotá. Colombia. Duverney.gaviria@gmail.com. ORCID: 0000-0001-9863-6282.

synthesis copy and PCR amplification of a group of cartilage-specific genes using specific primers. Stable and resistant fibroin films that allowed cell growth and multiplication were fabricated, as well as the chondrogenic differentiation evidenced by the expression of chondrogenic genes, the viability and the cell count were not affected, the cells interacted with the scaffolding evidenced by the area of upholstery formed on the surface of the fibroin film. Finally, it is concluded that silk fibroin is a biomaterial that can serve as a potential scaffold for the regeneration of joint injuries.

Key words: *Bombyx mori*, biomaterials, growth factor, chondrogenesis, regenerative medicine.

Recibido: octubre 15 de 2018 **Aprobado:** mayo 13 de 2019

INTRODUCCIÓN

Los biomateriales que se utilizan en ingeniería de tejidos buscan señalar al tejido con el que interactúan de manera parecida a las proteínas nativas, con el fin de regular actividades celulares favoreciendo los procesos de regeneración conllevando a restaurar la morfología y fisiología del tejido lesionado sobre los procesos de reparación que conducen a la formación de tejido cicatrizal (Sobajo *et al.*, 2008). Aunque un gran número de materiales cuentan con características como ser biocompatible con el tejido a regenerar, los resultados funcionales a menudo están limitados por la falta de estímulos suficientes que lleven a que estos induzcan la regeneración del tejido en sitios de lesión o enfermedad (Uebersax *et al.*, 2008). La seda, obtenida a partir de los capullos del gusano *Bombyx mori* L. es un material único que históricamente ha sido muy valorado en el campo textil por su fuerza y brillo (Rockwood *et al.*, 2011, Tansil *et al.*, 2011). En el campo de la medicina, ha sido utilizada durante siglos como material de sutura y recientemente ha ganado importancia como biomaterial por sus propiedades intrínsecas. (Kundu *et al.*, 2013). La fibroína de seda es una proteína compuesta por más del 75% de residuos de alanina y glicina, presenta tres cadenas, la cadena pesada (391 kDa), la cadena ligera (25.8 kDa) y P25 (25 kDa), la cadena ligera está unida a la cadena pesada por un único enlace disulfuro, mientras que P25 se asocia principalmente con la cadena pesada a través de interacciones hidrófobas siendo la cadena pesada responsable de las propiedades físicas y mecánicas de la fibra (Kundu, 2014). La fibroína de seda es secretada por las glándulas sericígenas del gusano para formar su capullo, su bioactividad, baja inmunogenicidad, gran resistencia mecánica a la tracción, flexibilidad, biodegradabilidad y superficie altamente reactiva que le permite unirse covalentemente a péptidos, hormonas y factores de crecimiento hacen que se use como materia prima en la fabricación de diferentes tipos de andamios (esponjas, películas, microfibras, hidrogeles, esferas) con aplicación en medicina regenerativa (Anadón, 2008, Yan *et al.*, 2012). Sus propiedades mecánicas únicas le permiten ser utilizada con éxito en ingeniería de tejidos entre las que se incluye la regeneración de cartílago, hueso, vasos sanguíneos, ligamentos, tejido nervioso, hepático, ocu-

lar, vejiga, tráquea, piel y tendones (Gellynck *et al.*, 2008, Sobajo *et al.*, 2008, Gaviria & Caballero, 2015). Los andamios de fibroína de seda, solos o acompañados de otros biomateriales naturales o sintéticos, sembrados con células madre mesenquimales favorecen procesos de adhesión, proliferación, diferenciación condrogénica y estimulan la acumulación de glicosaminoglicanos y colágeno, elementos primordiales en la formación de la matriz extracelular. (Gellynck *et al.*, 2008, Haider *et al.*, 2008, Jiang, 2013); este hecho es de gran importancia ya que pueden imitar la estructura nativa del tejido afectado constituyendo una alternativa terapéutica para la reparación condral.

A su vez, se ha identificado que células madre cultivadas en medio condrogénico expresan marcadores condrogénicos como colágeno tipo II, agregano, colágeno X y sox9, al igual que producen una matriz extracelular propia de células tipo condrocito (Haider *et al.*, 2008, Wray *et al.*, 2011, Kundu, 2014).

En el presente trabajo se describió la diferenciación de células madre mesenquimales obtenidas de medula ósea hacia un linaje de condrocitos sembradas sobre soportes de fibroína, su diferenciación fue llevada a cabo mediante la evaluación de la expresión de marcadores específicos de cartílago.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), todo el procedimiento se realizó en el área de Medicina Regenerativa de las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología -Cenbiotep- adscrito a la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira.

Recolección del material

Los capullos de gusano de seda utilizados se obtuvieron de la granja experimental "El Píamo" propiedad de la UTP. Se seleccionaron los capullos que no presentaban manchas, a todos ellos se les retiraron los restos sólidos de crisálida y pelusas mediante cepillado y corte.

Desgome y preparación de soluciones de fibroína

Para el desgome se siguió un procedimiento establecido por el grupo (Caballero *et al.*, 2016). Los capullos fueron cortados a la mitad y sometidos a ebullición en una solución de Na_2CO_3 0,02M por 45 a 60 minutos (5 g de capullos/1 litro de solución). La fibroína desgomada obtenida fue lavada y secada en horno a 60°C por 6 horas. Se preparó una solución al 10% (p/v) de fibroína utilizando LiBr 9,3M e incubando en baño maría a 60°C por 4 horas. La fibroína disuelta obtenida fue filtrada y centrifugada con el fin de eliminar impurezas (Wang *et al.*, 2006, Gellynck *et al.*, 2008, Garcia *et al.*, 2009, Wray *et al.*, 2011, Jiang, 2013, Kundu, 2014).

Dialisis, contradialisis y fabricacion de películas

Con el fin de remover el LiBr, la fibroína fue dializada contra agua destilada utilizando tubos de membrana para diálisis (Spectra/Por MWCO 6-8000). (Caballero *et al.*, 2016). La solución obtenida fue contradializada empleando polietilenglicol al 30% (Av. Mol Wt 8000) hasta conseguir una concentración de fibroína de 17% confirmado por el método de Bradford. De esta solución se tomaron 4 ml y se sirvieron en cajas cultivo, se secaron a 90°C por 24 horas, con el fin de estabilizar la película e inducir su cristalización e insolubilidad sugiriendo la formación de hoja β en la estructura de la fibroína. Las películas se evaluaron utilizando un microscopio de barrido de electrones (JEOL, modelo JSM 6490-LV), usando un haz de electrones acelerado ajustado entre 5-20 kV. Las cajas de cultivo fueron esterilizadas con etanol al 70%, seguido de lavados con *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* 1x pH 7.1 (DPBS). Finalmente, las películas fueron acondicionadas con 2 ml de medio de cultivo *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) + Glutamax, (4.5g/L D-Glucosa, 25mM HEPES y sin piruvato de sodio) en incubadora de CO_2 a 37°C por 48 horas.

Expansión y diferenciación celular sobre películas de fibroína

Se utilizaron células madre mesenquimales (CMMs) StemPro® (Gibco Life Technologies) provenientes de médula ósea humana de donantes anónimos en subcultivo S_4 . Las células fueron cultivadas como una mezcla de células adherentes hasta el subcultivo S_7 en incubadora al 5% de CO_2 , atmósfera húmeda, 37°C. Se empleó el medio *Mesenchymal Stem Cell Growth Medium* suplementado con 50ml MCGS y 10ml L-Glutamina (200 mM), 0.5ml de sulfato de gentamicina /anfotericina B (50mg/ml). La viabilidad celular fue evaluada con una cámara de Neubauer bajo microscopio óptico utilizando el ensayo de exclusión con azul de tripán. Las células obtenidas fueron sembradas sobre las películas de fibroína y sobre cajas sin fibroína con una densidad de siembra de 5000 células/cm². El ensayo se realizó por tripli-

cado con tiempos de incubación de 14 y 21 días. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 40-50%, se indujo el proceso de diferenciación condrogénica utilizando medio de cultivo que contenía DMEM + Glutamax con indicador de pH rojo de fenol suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v (SFB), fungizona 0.1%, penicilina/estreptomicina/neomicina 1% (PSN), ácido ascórbico 50ug/ml, dexametasona 100nM, 10ng/ml proteína morfogenética ósea recombinante humana (BMP-2), 10ng/ml BMP-4, 10ng/ml Proteína de crecimiento transformante β recombinante humana (TGF- β 3), 100ng/ml factor de crecimiento de tipo insulina recombinante humana (IGF-1), 1x de insulina, transferrina, selenio (ITS). Para los ensayos en los que se evaluaba la fibroína para soportar el crecimiento celular se utilizó Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), con indicador de pH rojo de fenol suplementado con glutamax, SFB al 10%, fungizona 0.1% y PSN al 1%. Como control positivo del proceso de diferenciación se usaron CMMs sembradas sobre cajas de poliestireno cultivadas con medio de diferenciación; como control negativo, CMMs sembradas sobre películas de fibroína incubadas con medio de expansión sin factores de crecimiento y como control general del proceso de crecimiento CMMs sembradas sobre cajas de poliestireno alimentadas con medio de cultivo sin factores de crecimiento. Las células sembradas fueron incubadas a 35°C, 5% de CO_2 y atmósfera de humedad. Todos los sobrenadantes obtenidos a partir de los recambios de medio durante el proceso de expansión y diferenciación celular fueron sembrados en agar tripticasa soya (TSA), agar nutritivo y agar papa dextrosa (PDA) e incubados durante 7 días a 35°C con el fin de descartar contaminaciones microbiológicas. Al finalizar el tiempo del ensayo (14 y 21 días), las células se disgregaron de las superficies de las cajas y de las películas de fibroína utilizando tripsina-EDTA al 0.5%, se realizó recuento de células/cm² y porcentaje de viabilidad celular en cámara de Neubauer usando el ensayo de exclusión con azul de tripán. Las células fueron suspendidas en solución de Hanks´ estéril y almacenadas a una temperatura de -70°C para su posterior extracción de ARN.

Cebadores y síntesis de ADN copia

Los cebadores se diseñaron con base en las secuencias reportadas en GenBank *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), para los genes presentados en la tabla 1. La expresión del gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue usada para normalizar la expresión de genes en cada muestra. Los cebadores se diseñaron en el programa Primer3Plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus), se alinearon a cada secuencia de la proteína utilizando el recurso *web nucleotide Blast* perteneciente a NCBI

Tabla 1. Secuencia de cebadores.

PRIMERS	SECUENCIA	% GC	Tm (°C)	Tamaño del amplicon en pb
COL II	5'-GGGAGTAATGCAAGGACCAA-3' (F)	50	54.8	175
	5'-ATCATCACCAGGCTTCCAG-3' (R)	50	54.9	
COL X	5'-CCCAACACCAAGACACAGTTC-3' (F)	70.8	56.2	158
	5'-AGGACTTCCGTAGCCTGGTT-3' (R)	70.3	58.1	
SOX 9	5'-GTACCCGCACTTCACAA-3' (F)	57.9	57.0	71
	5'-TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC-3' (R)	52.4	56.2	
AGC	5'-TGAGTCCTCAAGCCTCCTGT-3' (F)	55	57.9	188
	5'-GTCCCTCTGTCTCCTTGAC-3' (R)	60	57.3	
GAPDH	5'-CGACCACTTTGTAAGCTCA-3' (F)	55	55.3	203
	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3' (R)	50	56.6	

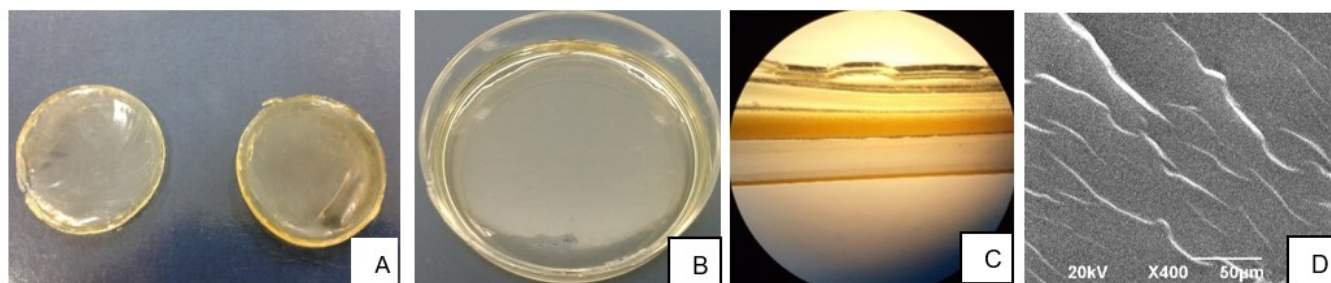


Figura 1. Películas de fibroína de seda y MEB.

A-B: Película de fibroína estabilizada con temperatura. C- Película de fibroína corte transversal, objetivo 40x. D. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB): Superficie de películas de fibroína aumento de 400x.

(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). La extracción del ARN fue llevada a cabo con el estuche RNeasy Minikit (Qiagen). La síntesis de cADN se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 9700 Applied Biosystem utilizando el estuche *OneStep RT-PCR* (Qiagen) según las recomendaciones del fabricante, los productos obtenidos fueron evaluados en geles de agarosa al 2% y observados en un transiluminador de luz UV.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis de los datos se realizó en los paquetes estadísticos GraphPad Prism 6.0 e InfoStat. Con el fin de determinar el impacto de las películas de fibroína sobre la viabilidad y recuento celular se realizó el modelo estadístico ANOVA de dos vías, previo a esto se comprobó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Bartlett. Todos los análisis estadísticos se realizaron bajo un nivel de significancia estadística del 95%.

RESULTADOS

Películas de fibroína

Se obtuvieron películas estables, transparentes y resistentes, que no se disolvieron al contacto con el medio de cultivo empleado para la alimentación de las células durante los 21 días que duró el ensayo, la película no influyó en la viabilidad ni en la multiplicación celular indicando que el uso de temperatura favoreció la cristalización de la proteína lo que sugiere la inducción en la formación de estructuras secundarias tipo hojas beta haciéndola insoluble. El proceso de esterilización con etanol al 70% demostró ser efectivo, ya que el cultivo de los sobrenadantes dio negativo a los 7 días de incubación (datos no mostrados).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Esta técnica permitió observar una superficie uniforme, continua, sin signos de fractura ni deformidad posterior al proceso de secado semejando la superficie de las ca-

jas de poliestireno utilizadas para cultivo celular, estas características son fundamentales para los cultivos *in vitro* ya que facilita la adherencia de las células y su proceso de expansión (figura 1 D).

Proceso de expansión celular

Se estableció un cultivo primario de CMMs utilizando DMEM suplementado con SFB al 10%. El seguimiento de los cultivos durante la etapa de expansión celular realizado mediante microscopio invertido y microscopio vertical, permitió observar células adheridas a la superficie de las películas de fibroína, con características morfológicas típicas de CMMs entre las que se incluye su forma fusiforme tipo fibroblastoide con formación de colonias celulares en su crecimiento inicial como lo reportan investigaciones basadas en cultivo de CMMs. (Kassem *et al.*, 2004, Csaki, *et al.*, 2008, Baugé & Boumédiene 2015).

Diferenciación celular

Durante el ensayo se logró observar cambios a nivel de la morfología de la célula con respecto al control. Al 4^º día de incubación con medio condrogénico, se observaron células con morfología redonda, formando conexiones entre células facilitando la adherencia con la película (figura 2/4^ºdía C-D), las células alimentadas con medio de crecimiento crecidas con/sin película de fibroína (control negativo) conservaron su morfología típica fibroblastoide y aumentaron en número con respecto a las células en proceso de diferenciación (figura 2/4^ºdía A-B). Al día 8^º las células crecidas en medio condrogénico aumentaron en número manteniendo un crecimiento uniforme, sin embargo, se observó que su proliferación era más lenta con respecto al control negativo, de igual manera se evidenció adherencia a la superficie del andamio, observándose la presencia de sustancias granulares alrededor de estas con la formación de conexiones entre células intentando tapizar la superficie del andamio (figura 2/8^º día C-D). Al día 12^º las células en proceso de expansión (con/sin fibroína) continuaron multiplicándose manteniendo su morfología fusiforme, mientras que las células en proceso de diferenciación (con/sin fibroína) tomaron una morfología redondeada y estrellada formando agregados celulares rodeados por una matriz, aumentó el área de enmallado formado por nuevas conexiones intercelulares unidas a un grupo central de células siendo más notorias en las células en proceso de diferenciación sembradas sobre películas de fibroína (figura 2/12^º día C-D). Al día 16^º las células en proceso de diferenciación continuaron manteniendo su morfología redonda aumentando la zona de conexiones por agregados celulares, (figura 2/16^º día C-D), las células en proceso de expansión mantuvieron su morfología fibroblastoide aumentando en número (figura 2/16^º día A-B), al día 21^º del ensayo se observó que las células en dife-

renciación aumentaron el área de tapizado por nuevas conexiones intercelulares con mayor formación de agregados celulares adyacentes, la población celular fue más homogénea, tomaron forma estrellada con presencia de una matriz, no se observaron cambios morfológicos significativos entre las células sembradas sobre el soporte y sin él (figura 2/21^º día C-D).

Análisis de expresión

No hubo amplificadas para colágeno II, colágeno X, sox9, y agregano en las muestras sembradas con/sin fibroína alimentadas con medio de expansión, (figura 3A-1 y 3C-3). Se evidenció la presencia de bandas para los amplicones Sox9, colágeno II, agregano y colágeno X en las muestras alimentadas con medio de diferenciación y factores de crecimiento (con/sin fibroína) (figura 3B-2 y 3D-4), indicando cambios en los patrones transcripcionales activos en las CMMs producto de su especialización terminando en la diferenciación hacia un linaje celular tipo condrocito.

Con respecto al análisis estadístico, el ANOVA de dos vías realizado a los datos obtenidos del recuento celular (figura 4A-1 y 4B-2) y de los porcentajes de viabilidad celular a los días 14 y 21 (figura 4C-3 y 4D-4), ambos se comportaron igual al día 14 y al día 21, no hay diferencia significativa entre los 4 subgrupos de ensayo, de igual manera se demostró que el uso de fibroína como soporte no afectó el recuento celular ni la viabilidad celular, por tanto no hay diferencia entre usar o no fibroína en términos de diferenciación celular (figura 4).

DISCUSION

El proceso inicial de selección de los capullos fue de vital importancia para obtener películas de buena calidad, como es reportado por varios ensayos en el procesamiento inicial de la fibroína. (Hardy y Scheibel, 2010, Zhang *et al.*, 2010, Kundu, 2014). La película obtenida empleando calor fue estable, resistente e insoluble, sin embargo, su cristalización puede lograrse usando otras técnicas reportadas con éxito por varios autores como lo son el uso de metanol, (Hofmann *et al.*, 2006, Marolt *et al.*, 2006, Garcia *et al.*, 2009, Zeng *et al.*, 2014), la inmersión en solventes orgánicos y el uso de recosido por vapor de agua (*water annealing*) (Hu *et al.*, 2007, Mo *et al.*, 2009, Moraes *et al.*, 2010, Kundu *et al.*, 2013). El proceso de esterilización con etanol al 70% citado en varios ensayos demostró ser efectivo, (Wang *et al.*, 2006, Bhardwaj & Kundu 2014), sin embargo, pueden emplearse otros métodos como el calor, calor húmedo o el uso de agentes esterilizadores. Al finalizar el proceso de diferenciación se pudo apreciar que las células alimentadas con medio de expansión mostraron una

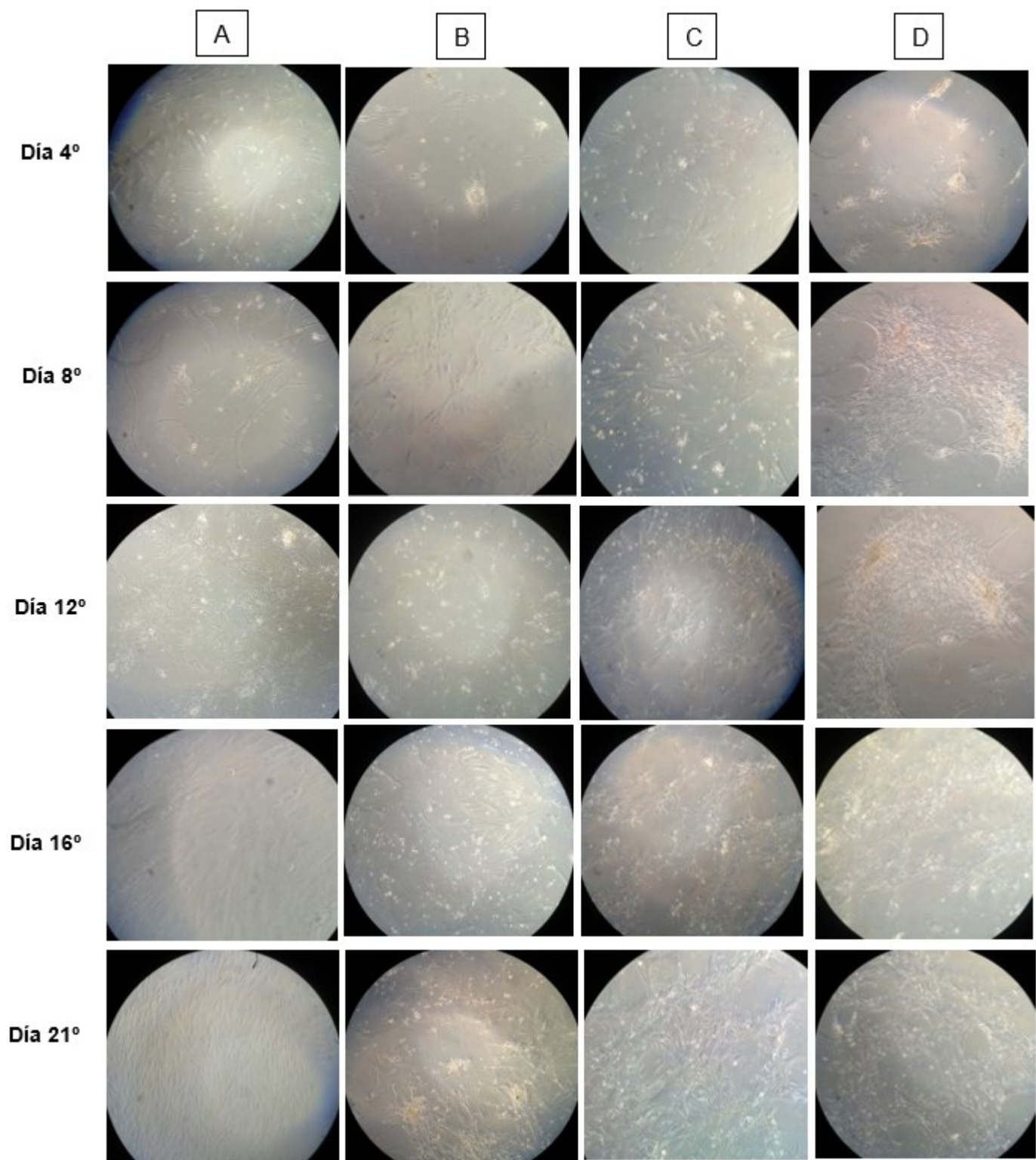


Figura 2. Proceso de diferenciación celular.

A- CMMs en proceso de expansión sin fibroína. B- CMMs en proceso de expansión con fibroína. C- CMMs en proceso de diferenciación sin fibroína. D- CMMs en proceso de diferenciación con fibroína. Microscopio invertido 20x.

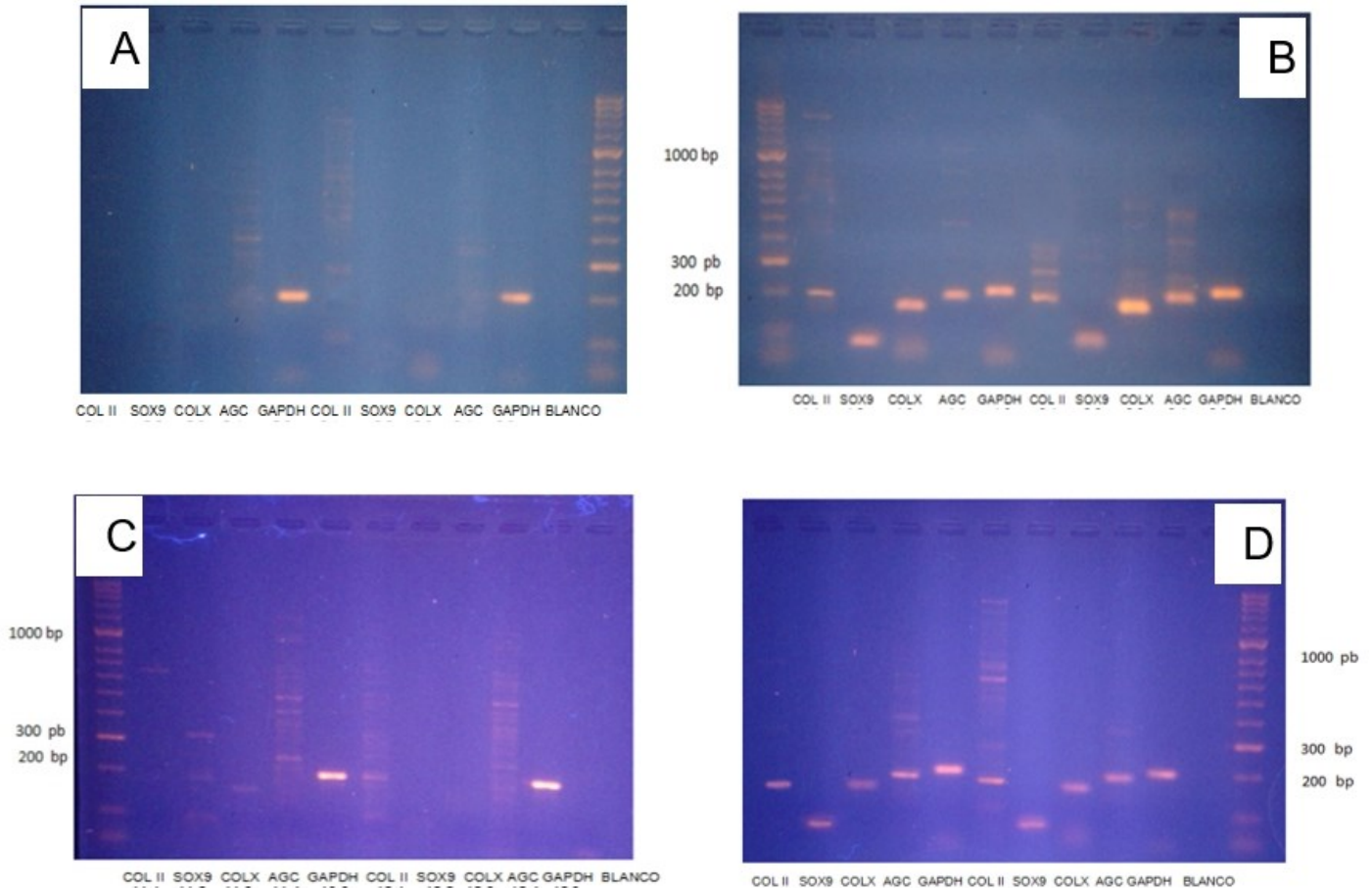


Figura 3. Patrón de expresión marcadores moleculares.

A. Muestras de células sembradas sobre fibroína con medio de expansión. B. Muestras de células sembradas sobre fibroína con medio condrogénico. C. Muestras de células sembradas sin fibroína con medio de expansión. D. Muestras de células sembradas sin fibroína con medio de condrogénico.

morfología homogénea típica a células de tipo fibroblastos, con citoplasma alargado y sin presencia de una matriz observándose la formación de colonias celulares propias de un proceso de expansión de CMMs mientras que las células alimentadas con medio de diferenciación con/sin fibroína pasaron por un proceso de transformación metabólica activa producto de su especialización evidenciado por la morfología de tipo esférica/estrellada, la formación de agregados celulares y cambios en su comportamiento (figura 2) muy similar a la reportado por otros investigadores quienes emplearon CMMs sobre combinaciones de andamios (seda, seda/quitosan, seda/ácido hialuronico, seda/colágeno y seda/agarosa) para promover procesos de condrogénesis. (Gelse *et al.*, 2003, Schmitt *et al.*, 2003, Mauck *et al.*, 2006, Garcia *et al.*, 2009, Bhardwaj & Kundu 2012, Jiang 2013, Kundu *et al.*, 2013) y similar a la morfología de condrocitos presentes en un entorno fisiológico de tejido cartilaginoso articular y de condrocitos recién aisla-

dos de tejido articular sugiriendo un proceso activo de condrogénesis (Wang *et al.*, 2006). Durante un proceso de diferenciación *in vitro* de CMMs pueden obtenerse condrocitos desdiferenciados que asumen un fenotipo con perfil de expresión de genes similar al observado en procesos de osteoartritis, perdiendo la morfología esférica y adquiriendo una morfología de fibroblasto formando un tejido de tipo fibrocartilago como lo reporta Wang y col. en su estudio basado en el crecimiento de condrocitos articulares sobre andamios de fibroína para promover la ingeniería de cartilago (Wang *et al.*, 2006). Este proceso se evitó empleando factores como el TGF- β 3, BMP-2 y BMP-4; de igual manera, el uso concomitante de miembros de la familia TGF- β con elementos tipo hormonas esteroideas humanas como la dexametasona está estrechamente relacionado en la conducción de las CMMs a un proceso de diferenciación condrogénica. (Roh *et al.*, 2001, Shintani & Hunziker 2011).

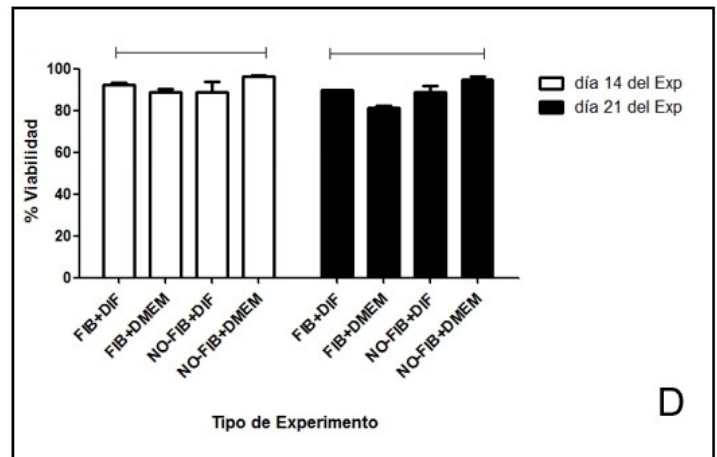
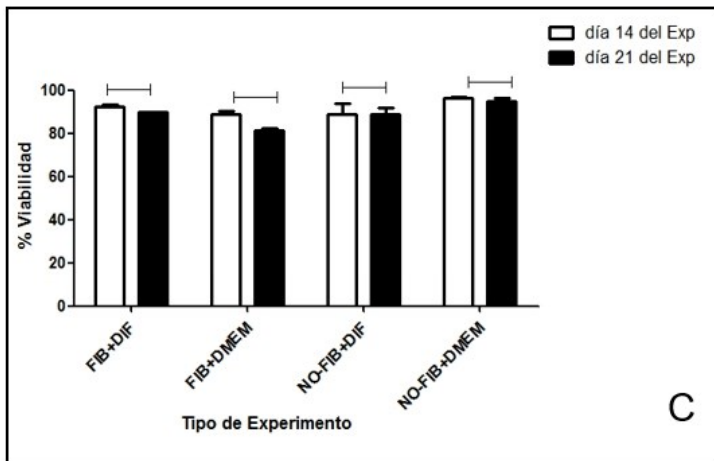
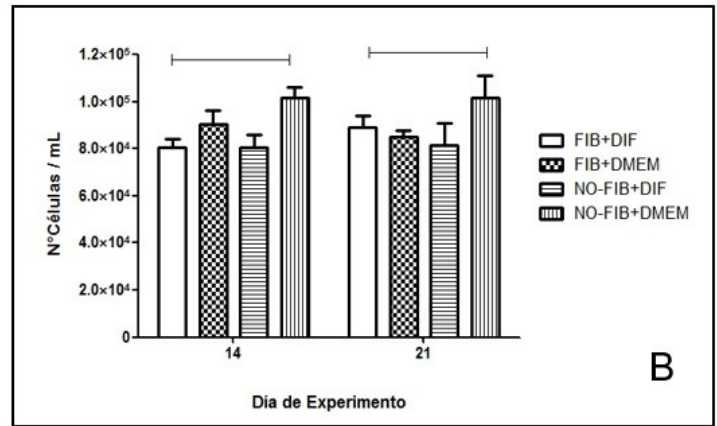
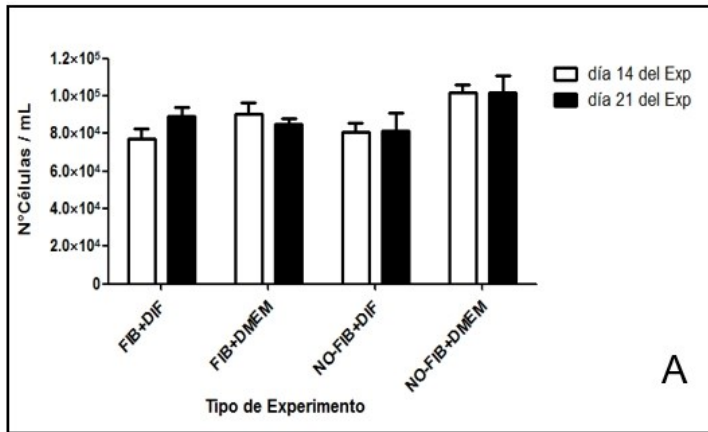


Figura 4. Recuento y viabilidad celular día 14 y día 21.

A. Recuento celular y tipo de ensayo a los 14 y 21 días. La fibroína no afectó el número de células. B. Recuento celular vs tiempo. El número de células obtenidas es similar en ambos momentos del ensayo. C. Viabilidad celular y tipo de ensayo a los 14 y 21 días. La fibroína no afectó la supervivencia de la célula. D. Viabilidad celular vs tiempo. El número obtenido de células vivas es similar en ambos momentos del ensayo.

En este estudio se demostró que el medio de cultivo condrogénico enriquecido con los factores de crecimiento BMP-2, BMP-4, IGF-1 y TGF- β 3 suplementado con dexametasona, ácido ascórbico e ITS, favoreció la especialización de una CMM hacia un linaje celular tipo condrocito (Schmitt *et al.*, 2003). Está demostrado que la estimulación condrogénica de una célula madre puede lograrse empleando alguna de las tres isoformas de la familia TGF- β ya que son consideradas potenciadores en el proceso inicial de condrogénesis (Vinardell, *et al.*, 2009, Freyria & Mallein 2012); diferentes estudios reportan que el uso de TGF- β 3 incrementa el tamaño y peso celular, los depósitos de proteoglicanos, la síntesis de glucosaminoglicanos, la expresión de colágeno II y de otros marcadores condrogénicos. (Schmitt *et al.*, 2003, Vinatier *et al.*, 2009, Yun *et al.*, 2010, Freyria & Mallein 2012), de igual forma el aumento en la expresión y síntesis de colágeno II y agregano pueden lograrse con el

uso de miembros de la familia IGF (Palmer *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2014). Además, el uso concomitante de estos factores con otras moléculas como BMP-2/BMP-4/BMP-6 conllevan a regular la expresión de COL2A1 y COL10A1, marcadores propios de un proceso condrogénico (Freyria & Mallein 2012).

La inducción de marcadores de hipertrofia como colágeno X, metaloproteínasa de matriz 13, fosfatasa alcalina y osteopontina junto con la mineralización del tejido indican que las rutas de diferenciación favorecen un proceso de hipertrofia de condrocitos asociado a procesos de osificación *in vitro*. (Diekman *et al.*, 2009, Yun *et al.*, 2010, Mahmoudifar and Doran 2012). En este estudio se demostró la expresión de colágeno X en todas las muestras bajo estimulación condrogénica, indicando que las CMMs pasaron por un proceso de condensación, proliferación, diferenciación y maduración hasta

llegar a la formación de condrocitos hipertróficos (figura 4); dicho proceso puede controlarse *in vitro* utilizando otros factores de crecimiento como el uso de factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y proteínas de la familia WNT 4-8. (Vinatier *et al.*, 2009, Mahmoudifar & Doran 2012). Finalmente, es posible afirmar que, si el ensayo se extendiera a un tiempo mayor que el utilizado en este estudio, como lo reportan otras investigaciones (Karlsson *et al.*, 2007, Murdoch *et al.*, 2007, Freyria & Mallein 2012); se observaría una mayor área de tapizado producto de células diferenciadas que pretenden formar una estructura especializada similar a un tejido. Teniendo en cuenta que un andamio ideal debe favorecer los procesos de unión, migración y diferenciación celular, así como el transporte masivo y la integridad mecánica de los tejidos con el soporte y su posterior integración *in vivo* (Marolt *et al.*, 2006); en este estudio se demostró que la fibroína de seda permitió el crecimiento, expansión y diferenciación de células madre utilizando un medio de cultivo condrogénico específico, sus propiedades mecánicas únicas junto con sus características de ser biodegradable y biocompatible la postulan como un buen andamio para la regeneración de lesiones articulares. Finalmente se recomienda realizar estudios complementarios en cuanto a la caracterización física y mecánica de la película de fibroína de seda, así como su velocidad de degradación para confirmar su uso como biomaterial en la ingeniería de tejidos, de igual manera se recomienda la tipificación por citometría de flujo de las células diferenciadas, así como la realización de ensayos que cuantifiquen la expresión de los genes estudiados.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo evidenciaron que las películas de fibroína son estructuras estables, resistentes e insolubles, que no afectaron el crecimiento y la multiplicación celular y permitieron la diferenciación celular de células madre mesenquimales hacia células de tipo condrocito. Finalmente, estos resultados abren la posibilidad de emplear andamios fabricados con fibroína de seda en el tratamiento de defectos a nivel de cartílago.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Universidad Tecnológica de Pereira y el Sistema General de Regalías de Colombia (código PBIN 2012000100050).

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de interesen en relación a este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Anadón, J. L. C. (2008). La seda como biomaterial en Medicina Regenerativa. *Eubacteria*, (20): 19-22.
- Baugé, C. and K. Boumédiene (2015). Use of Adult Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering: Current Status and Future Developments. *Stem Cells International*.
- Bhardwaj, N. and S. C. Kundu (2012). Chondrogenic differentiation of rat MSCs on porous scaffolds of silk fibroin/chitosan blends. *Biomaterials*, 33(10), 2848-2857.
- Caballero, L. C.; J., Rivera and D., Gaviria (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, J.-L.; L., Duan; W., Zhu; J., Xiong and D., Wang (2014). Extracellular matrix production *in vitro* in cartilage tissue engineering. *Stem cells*, 8, 14-15.
- Csaki, C.; P., Schneider and M., Shakibaei (2008). Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 190(5), 395-412.
- Diekman, B. O., C. R. Rowland, D. P. Lennon, A. I. Caplan and F. Guilak. (2009). Chondrogenesis of adult stem cells from adipose tissue and bone marrow: induction by growth factors and cartilage-derived matrix. *Tissue Engineering, Part A* 16(2), 523-533.
- Freyria, A.-M. and F. Mallein-Gerin (2012). Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. *Injury*, 43(3), 259-265.
- García-Fuentes, M., A. J. Meinel, M. Hilbe, L. Meinel and H. P. Merkle (2009). Silk fibroin/hyaluronan scaffolds for human mesenchymal stem cell culture in tissue engineering. *Biomaterials*, 30(28), 5068-5076.
- Gaviria Arias, D. and L. C. Caballero Mendez (2015). Fibroin from silkworm (*Bombyx mori* L) as biomaterial used in regenerative medicine process based on tissue engineering. *Revista Médica de Risaralda*, 21(1), 38-47.
- Gellynck, K., P. C. Verdonk, E. Van Nimmen, K. F. Almqvist, T. Gheysens, G. Schoukens, L. Van Langenhove, P. Kiekens, J. Mertens and G. Verbruggen (2008). Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(11), 3399-3409.
- Gelse, K., K. von der Mark, T. Aigner, J. Park and H. Schneider (2003). Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis & Rheumatism*, 48(2), 430-441.

- Haider, M., J. Cappello, H. Ghandehari and K. W. Leong (2008). *In vitro* chondrogenesis of mesenchymal stem cells in recombinant silk-elastinlike hydrogels. *Pharmaceutical research*, 25(3), 692-699.
- Hardy, J. G. and T. R. Scheibel (2010). Composite materials based on silk proteins. *Progress in Polymer Science*, 35(9), 1093-1115.
- Hofmann, S., S. Knecht, R. Langer, D. L. Kaplan, G. Vunjak-Novakovic, H. P. Merkle and L. Meinel (2006). Cartilage-like tissue engineering using silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, 12(10), 2729-2738.
- Hu, X., D. Kaplan and P. Cebe (2007). Effect of water on the thermal properties of silk fibroin. *Thermochimica Acta*, 461(1), 137-144.
- Jiang Deng, R. S., Wenliang Huang, Zhijun Dong, Gang Mo, Bin Liu (2013). A silk fibroin/chitosan scaffold in combination with bone marrow-derived mesenchymal stem cells to repair cartilage defects in the rabbit knee. *J Mater Sci: Mater Med.*, 24, 2037-2046.
- Karlsson, C., C. Brantsing, T. Svensson, H. Brisby, J. Asp, T. Tallheden and A. Lindahl (2007). Differentiation of human mesenchymal stem cells and articular chondrocytes: Analysis of chondrogenic potential and expression pattern of differentiation-related transcription factors. *Journal of orthopaedic research*, 25(2), 152-163.
- Kassem, M., M. Kristiansen and B. M. Abdallah. (2004). Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 95(5), 209-214.
- Kundu, B., R. Rajkhowa, S. C. Kundu and X. Wang. (2013). Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced drug delivery reviews*, 65(4), 457-470.
- Kundu, S. (2014). *Silk Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier.
- Mahmoudifar, N. and P. M. Doran (2012). Chondrogenesis and cartilage tissue engineering: the longer road to technology development. *Trends in biotechnology*, 30(3), 166-176.
- Marolt, D., A. Augst, L. E. Freed, C. Vepari, R. Fajardo, N. Patel, M. Gray, M. Farley, D. Kaplan and G. Vunjak-Novakovic. (2006). Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors. *Biomaterials*, 27(36), 6138-6149.
- Mauck, R., X. Yuan and R. Tuan. (2006). Chondrogenic differentiation and functional maturation of bovine mesenchymal stem cells in long-term agarose culture. *Osteoarthritis and cartilage*, 14(2), 179-189.
- Mo, C., P. Wu, X. Chen and Z. Shao (2009). The effect of water on the conformation transition of Bombyx mori silk fibroin. *Vibrational Spectroscopy* 51(1), 105-109.
- Moraes, M. A. d., G. M. Nogueira, R. F. Weska and M. M. Beppu (2010). Preparation and characterization of insoluble silk fibroin/chitosan blend films. *Polymers*, 2(4), 719-727.
- Murdoch, A. D., L. M. Grady, M. P. Ablett, T. Katopodi, R. S. Meadows and T. E. Hardingham (2007). Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells in Transwell Cultures: Generation of Scaffold-Free Cartilage. *Stem cells*, 25(11), 2786-2796.
- Palmer, G. D., A. Steinert, A. Pascher, E. Gouze, J.-N. Gouze, O. Betz, B. Johnstone, C. H. Evans and S. C. Ghivizzani. (2005). Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells *in vitro*. *Molecular Therapy*, 12(2), 219-228.
- Rockwood, D. N., R. C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M. L. Lovett and D. L. Kaplan (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature protocols*, 6(10), 1612-1631.
- Roh, J., L. Xu, T. Hering, J. Yoo and B. Johnstone (2001). Modulation of bone morphogenetic protein-2 expression during *in vitro* chondrogenesis. Orthopaedic Research Society 47th Annual Meeting Abstract.
- Schmitt, B., J. Ringe, T. Häupl, M. Notter, R. Manz, G. R. Burmester, M. Sittinger and C. Kaps (2003). BMP2 initiates chondrogenic lineage development of adult human mesenchymal stem cells in high-density culture. *Differentiation*, 71(9-10), 567-577.
- Shintani, N. and E. Hunziker. (2011). Differential effects of dexamethasone on the chondrogenesis of mesenchymal stromal cells: influence of microenvironment, tissue origin and growth factor. *Eur Cell Mater*, 22, 302-320.
- Sobajo, C., F. Behzad, X.-F. Yuan and A. Bayat (2008). Silk: a potential medium for tissue engineering. *Eplasty* 8.
- Tansil, N. C., Y. Li, C. P. Teng, S. Zhang, K. Y. Win, X. Chen, X. Y. Liu and M. Y. Han (2011). Intrinsically colored and luminescent silk. *Advanced Materials*, 23(12), 1463-1466.
- Uebersax, L., H. P. Merkle and L. Meinel (2008). Insulin-like growth factor I releasing silk fibroin scaffolds induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of controlled release*, 127(1), 12-21.
- Vinardell, T., S. Thorpe, C. Buckley and D. Kelly (2009). Chondrogenesis and integration of mesenchymal stem cells within an *in vitro* cartilage defect repair model. *Annals of biomedical engineering*, 37(12), 2556-2565.

- Vinatier, C., D. Mrugala, C. Jorgensen, J. Guicheux and D. Noël (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in biotechnology*, 27(5), 307-314.
- Wang, Y., D. J. Blasioli, H.-J. Kim, H. S. Kim and D. L. Kaplan (2006). Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials*, 27(25), 4434-4442.
- Wray, L. S., X. Hu, J. Gallego, I. Georgakoudi, F. G. Omenetto, D. Schmidt and D. L. Kaplan (2011). Effect of processing on silk-based biomaterials: Reproducibility and biocompatibility. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 99(1), 89-101.
- Yan, L.-P., J. M. Oliveira, A. L. Oliveira, S. G. Caridade, J. F. Mano and R. L. Reis (2012). Macro/microporous silk fibroin scaffolds with potential for articular cartilage and meniscus tissue engineering applications. *Acta biomaterialia*, 8(1), 289-301.
- Yun-feng, R., D. Lin, W. You, W. Yang, L. Pauline po-yee, T. Ting-ting, C. Kai-ming and D. Ke-rong (2010). Bone morphogenetic protein 2 promotes transforming growth factor beta 3-induced chondrogenesis of human osteoarthritic synovium-derived stem cells. *Chinese medical journal*, 123(21), 3040-3048.
- Zeng, C., Q. Yang, M. Zhu, L. Du, J. Zhang, X. Ma, B. Xu and L. Wang (2014). Silk fibroin porous scaffolds for nucleus pulposus tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C* 37, 232-240.
- Zhang, Q., S.-Q. Yan and M.-Z. Li (2010). Porous materials based on Bombyx mori silk fibroin. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 3(1), 1-8.