

LA SEDA COMO BIOMATERIAL EN MEDICINA REGENERATIVA

José Luis Cenis

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA)

E-mail: josel.cenis@carm.es

Los grandes avances producidos en la última década mediante la aplicación de las herramientas de la biología molecular y celular han hecho posible el desarrollo de nuevos conceptos terapéuticos en biomedicina, que han abierto nuevos campos como son la Medicina Regenerativa y la Ingeniería de Tejidos. Estos conceptos se basan en la posibilidad real de aislar células troncales (*stem cells*) indiferenciadas, desarrollarlas en soportes (*scaffolds*) adecuados y favorecer su diferenciación a diversos tejidos mediante la acción de factores de crecimiento celular específicos. Ello abre la posibilidad de producir tejidos humanos nuevos capaces de reemplazar a tejidos lesionados, evitando el riesgo de rechazo del sistema inmune. El componente principal de la Medicina Regenerativa es sin duda el conocimiento detallado de la biología y manejo de las células troncales. Estas investigaciones han captado la atención del público y tienen un gran perfil mediático. Sin embargo, hay otro componente de la ingeniería de tejidos mucho menos conocido como son los biomateriales en los que esas células han de crecer, diferenciarse e integrarse en los lugares adecuados del organismo receptor. Las características de estos materiales tienen una influencia decisiva en el éxito del proceso.

Afortunadamente se dispone de una gran variedad de biomateriales adecuados para estas aplicaciones. Gran parte de ellos son sintéticos (biopolímeros, cerámicas, biovidrio, etc.) en tanto que otros son de origen natural (colágeno, alginatos, etc.). Curiosamente, desde hace unos años, uno de los materiales más antiguos producidos por la humanidad se está mostrando como uno de los biomateriales de mayor calidad y potencial para ingeniería de tejidos. Se trata de la seda. La aplicación de la seda como biomaterial, a través de su uso en suturas quirúrgicas, fue temprana, y data del siglo XIII. Sin embargo, los nuevos conocimientos adquiridos sobre las propiedades y estructura de este producto, han abierto su uso a nuevas aplicaciones que vamos a tratar brevemente en este trabajo.

Estructura y cualidades de la seda como biomaterial

La seda, es segregada por las glándulas sericígenas del gusano de seda (*Bombyx mori* L.), que la utiliza para elaborar el capullo, una estructura cerrada de protección en la que realiza la metamorfosis de larva a adulto. Tal como es segregado el hilo de seda, que es continuo y puede medir hasta 1.500 metros, consta de dos proteínas. Una de ellas es la fibroína, que es una proteína polimérica y lineal, que alterna do-

minios amorfos y otros de lámina beta. Constituye el 70 % del peso del capullo. La otra proteína es la sericina, hidrosoluble y de estructura globular, que mantiene unidos los filamentos de fibroína. La sericina es normalmente desechada en el proceso textil, aunque tiene diversas aplicaciones en medicina y cosmética. La fibroína en cambio, presenta características que la hacen muy interesante como biomaterial:

- a) Es un material de naturaleza proteica, altamente biocompatible. No se verifica rechazo ni respuesta inflamatoria en los tejidos donde se injerta. El rechazo ocasional que se ha reportado con algunas suturas, se atribuye a la contaminación de la fibroína con sericina (11).
- b) Presenta una gran resistencia mecánica a tracción, junto a una gran flexibilidad.
- c) Es biodegradable, pero a un ritmo más lento que en otros biomateriales orgánicos, lo que permite una mejor consolidación de los tejidos. En dos años se reabsorbe totalmente y no se encuentran rastros de la misma en los tejidos (1).
- d) Puede elaborarse en diferentes configuraciones, según las necesidades: geles, films, matrices porosas 3D, microfibras y microesferas.
- e) Su producción es sencilla, y sostenible. La cría del gusano de seda es sencilla y de bajo coste, si se dispone de moreras, y la elaboración de los materiales se hace predominantemente en medio acuoso con técnicas relativamente simples.
- f) Presenta la interesante propiedad de tener una superficie altamente reactiva. Su superficie presenta grupos carboxilo terminal a los que se pueden unir de forma covalente péptidos tales como el motivo RGD (8), hormonas, tales como la PTH (8), y factores de crecimiento, tales como la BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*) (4, 5, 7). Estas proteínas favorecen de forma muy significativa tanto la adhesión como el desarrollo de los cultivos celulares implantados sobre la matriz.

Presentaciones y elaboración de la seda como biomaterial

Una de las ventajas de la fibroína de la seda como biomaterial es la gran versatilidad de sus presentaciones junto con su facilidad de fabricación. El punto de partida para la utilización de la seda como biomaterial, al igual que se hace para su utilización en la

industria textil, es la eliminación de la sericina. Ello se hace mediante ebullición en una solución jabonosa, o en carbonato sódico. Tras un filtrado, se obtiene una madeja de textura similar al algodón, constituida en su totalidad por fibroína. La fibroína es insoluble en agua y los disolventes habituales, y se solubiliza únicamente en bromuro de litio concentrado o en una mezcla de cloruro cálcico y etanol. Una vez solubilizada, la solución se dializa y se obtiene así una solución acuosa de fibroína regenerada a partir de la cual se fabrican las diversas presentaciones.

La presentación más sencilla de la fibroína es en forma de film y recubrimientos de otros materiales. Para ello, se parte de una solución acuosa de fibroína al 10 %, que se vierte en un molde o superficie adecuada y se deja evaporar. Posteriormente, se trata con una solución de metanol, que induce la transición de una estructura proteica parcialmente amorfa a una estructura totalmente cristalina e insoluble. Este film puede actuar también como recubrimiento de otros biomateriales (poliuretanos, policaprolactonas, etc.) o actuar combinado en diversas mezclas con dichos biomateriales (celulosa, polietileno, colágeno, etc.). El efecto obtenido es una mejora de las cualidades de los materiales por separado. Por ejemplo, el recubrimiento con fibroína de una matriz de policarbonato-uretano favorece la adhesión y el crecimiento de fibroblastos en el mismo por un factor de 2.5 veces, respecto al material no recubiertos (2). Por otra parte, el film de fibroína ha demostrado un efecto positivo muy significativo en la regeneración de piel. Usado como vendaje en dermatotomías, el film de fibroína produce una mayor regeneración del colágeno y menor reacción inflamatoria, que se traduce en tiempos de cicatrización más cortos con respecto a los materiales habitualmente empleados (9). Una propiedad muy importante de los films de fibroína es que su superficie presenta una gran variedad de residuos aminoácidos que permiten la posibilidad de decorar su superficie con distintos tipos de ligandos y factores de crecimiento. A través de una modificación química con carbodiimidas, es posible obtener un acoplamiento covalente del motivo peptídico RGD, lo que favorece la adhesión, proliferación y diferenciación de osteoblastos, fibroblastos y células estromales (8). También se ha demostrado que es posible decorar film de fibroína con BMP-2 unida al mismo mediante enlace covalente (4). En estas condiciones, la proteína se retiene en la superficie del film durante un tiempo superior, en relación a la proteína que es simplemente adsorbida a la superficie. Ello se traduce en una mejora significativa en la adhesión y diferenciación de osteoblastos en la formación de tejido óseo (4,5).



Figura 1. Cilindro sólido de matriz porosa tridimensional de fibroína

Un segundo tipo de presentación de la fibroína es en forma de matrices o armazones porosos tridimensionales (*3D scaffolds*, Figura 1). Estas matrices porosas se forman añadiendo granos de CaNa de una granulometría conocida a una solución de fibroína, de concentración entre el 4 y el 10 %. El efecto de la sal es el de captar el agua de la solución y crear huecos. Tras la evaporación del agua, tratamiento con metanol y el lavado de la sal el resultado es una estructura altamente porosa y esponjosa, con espacios del orden de 100 micras, muy adecuada para el crecimiento celular. Este tipo de matriz porosa se ha ensayado ampliamente, en combinación con la adición de BMP-2, para la regeneración de tejido óseo y cartílago a partir de células mesenquimales de la médula ósea (5). En conjunto, la conclusión que se desprende de los trabajos realizados es que la matriz porosa de fibroína constituye un medio muy adecuado para el crecimiento de células mesenquimales, y la posibilidad adicional de decorar el material con factores de crecimiento se traduce en un crecimiento y diferenciación de dichas células significativamente más rápido y eficiente que el obtenido con materiales convencionales, tales como el colágeno. Por otra parte, la fibroína se biodegrada a una tasa más lenta que el colágeno (1), lo que supone que el nuevo tejido regenerado sobre la misma tiene un mejor soporte estructural en su proceso de formación.

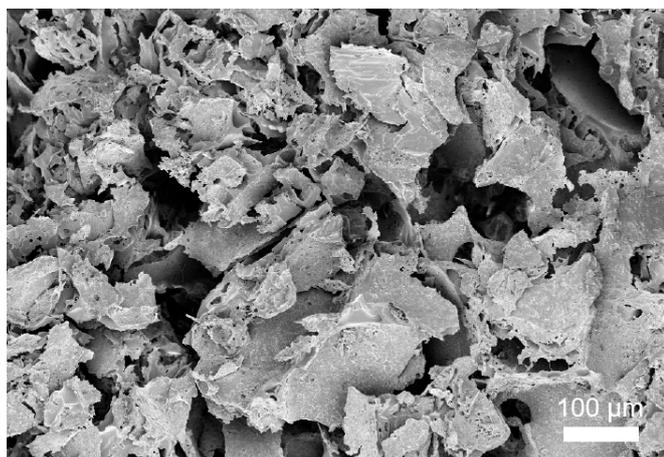


Figura 2. Vista al microscopio de barrido del material anterior, donde se aprecia su estructura superficial. (Cortesía S. Hofman y L. Meinel, ETH, Zurich)

Un tercer tipo de presentación de la fibroína son las esponjas de nanofibras (*Non-woven mats*, Figura 3). En este caso, a través de un proceso conocido como electrohilado que consiste en pulverizar a presión una solución de fibroína sometida a un campo eléctrico (30 Kv) sobre un tambor metálico conectado a tierra, se obtienen nanofibras de fibroína de un diámetro comprendido entre 100 y 300 nanómetros. Estas nanofibras, entrelazadas entre sí, tienen una dimensión y configuración muy similar a la de la matriz extracelular de los tejidos, y por tanto, constituyen un sustrato muy adecuado para el crecimiento de células humanas (6). Además, se ha comprobado que el proceso de electrohilado no es tan agresivo como para degradar proteínas, por lo que incorporando BMP-2 y gránulos de hidroxapatito a la solución acuosa de fibroína se produce un armazón electrohilado activo y óptimo para el crecimiento y diferenciación de células mesenquimales a tejido óseo (7).

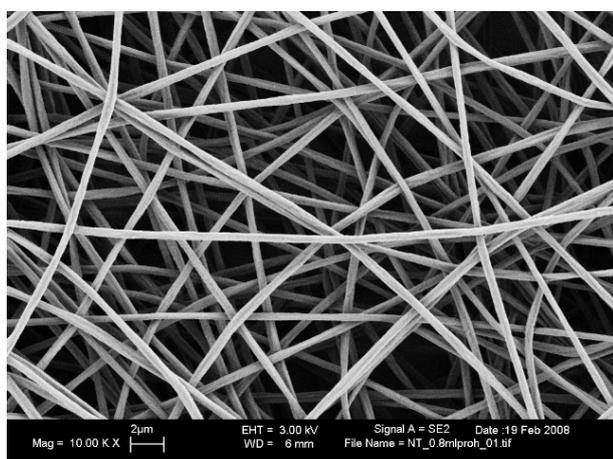


Figura 3. Vista al microscopio de barrido de una red de microfibras de fibroína de seda obtenida mediante electrohilado. (Cortesía S. Hofman y L. Meinel, ETH, Zurich)

Por último, la fibroína también puede presentarse en forma de microesferas (Figura 4) para la liberación controlada de fármacos. Este es un campo de un enorme interés para la industria farmacéutica. A través del tratamiento de la fibroína con metanol, es posible modular el grado de cristalinidad de la estructura proteica en lámina beta de la superficie, configurando la capacidad del material para retener y liberar de forma controlada enzimas y proteínas terapéuticas. Normalmente se observa una pauta de liberación de las mismas caracterizada por una liberación inicial ráoida seguida por una liberación lineal y progresiva a lo largo de un período prolongado (3).

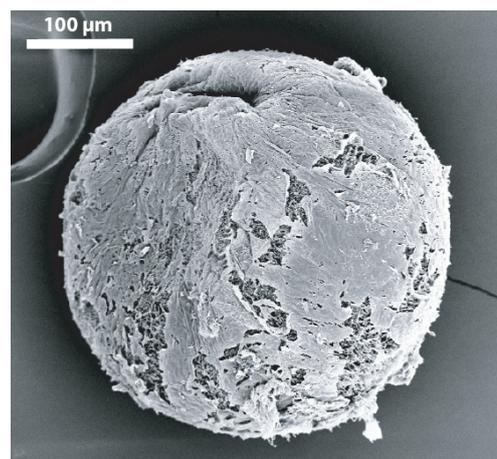


Figura 4. Vista al microscopio de barrido de una microesfera de fibroína de seda. (Cortesía S. Hofman y L. Meinel, ETH, Zurich)

Aplicaciones de los biomateriales de seda

La versatilidad de la fibroína como biomaterial la hace apta para cualquier tipo de aplicación en Ingeniería Tisular. Sin embargo, las aplicaciones que están más maduras y cercanas a su aplicación final lo son en el campo de la regeneración de hueso, cartílago y ligamentos. En este sentido, una aplicación muy interesante es la reconstrucción de ligamento cruzado de la rodilla mediante la elaboración de un cordón de fibras de seda que posteriormente, se siembran con células mesenquimales de la médula ósea que se diferencian a tejido de ligamento, ofreciendo una resistencia mecánica muy superior a la de otros materiales orgánicos y una gran biocompatibilidad (1). Esta aplicación está ya en fase comercial en Estados Unidos, por parte de una compañía especializada en el desarrollo de biomateriales basados en fibroína de seda (Serica,). A través de esta compañía también se dispone de hidrogeles y armazones de fibroína utilizables en cirugía estética y reconstructiva. Otras aplicaciones relacionadas con regeneración de tejido óseo y cartílago no están disponibles todavía, pero los buenos resultados descritos en la literatura científica (1, 4-9) invitan a pensar que su aplicación clínica no está lejana. Otra de las áreas en las que se trabaja activamente es en regeneración axonal en tejido

nervioso. Ya se ha demostrado que la fibroína es altamente biocompatible con tejido nervioso, y se han desarrollado construcciones de configuración tubular destinadas a guiar el crecimiento axonal de nervio periférico, que a la vez liberan factores de crecimiento de nervio (NGF) para estimular dicho desarrollo (10).

Aparte de las aplicaciones mencionadas, hay otras muchas en desarrollo en este momento, y otras muchas posibles que todavía no se han comenzado a explorar. La entrada de la fibroína en el repertorio de armazones para crecimiento y diferenciación celular es relativamente reciente, alrededor de una década, por lo que aún no se ha aprovechado todo su potencial. El desarrollo de este material ha sido liderado por el Departamento de Ingeniería Química y Centro de Biotecnología, de la Tufts University (Medford, Massachusetts, EE.UU), liderado por David Kaplan. Hay también grupos de investigación muy productivos en este campo en Japón, China y Corea. Por lo que respecta a Europa, destaca el grupo de Lorenz Meinel, en la Escuela Politécnica de Zurich (Suiza), y también hay grupos muy activos en diversas universidades de Alemania e Italia.

Por lo que respecta a nuestro país, los estudios sobre la seda, en cualquiera de sus aspectos, son muy escasos, a pesar de la gran importancia que tuvo su producción en siglos pasados. Que sepamos, únicamente el Departamento de Ciencia de Materiales de la ETSI de Caminos, Canales y Puertos de la UPM ha mantenido durante bastantes años una línea activa y competitiva de investigación sobre seda, en su vertiente de material estructural y resistente. Más recientemente, desde hace tres años, el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) se ha incorporado al campo de la investigación sobre aprovechamientos biotecnológicos de la seda en el campo específico de los biomateriales. Este interés es lógico y obligado, si se considera que las instalaciones del IMIDA constituyeron la Estación Sericícola de Murcia, fundada en 1892, y que fue el centro de referencia español en todas las actividades relacionadas con la producción y elaboración de la seda. Esta actividad sericícola finalizó en 1976, cuando la competencia de la seda asiática y las fibras sintéticas expulsaron la seda española del mercado textil.

El hacer una revisión completa de este tema superaría el espacio permitido, por lo que puede obte-

nerse información adicional consultando la revisión más reciente, de Wang et al. (11), que revisa 271 referencias. En cualquier caso, la conclusión que se extrae tras consultar la abundante bibliografía sobre el tema es que la fibroína de la seda ofrece una gran versatilidad en su presentación, resistencia mecánica, biocompatibilidad, y reactividad química en la superficie que permite la adhesión de todo tipo de moléculas bioactivas. Todo ello lo convierte en un sustrato casi ideal para el crecimiento y diferenciación de células humanas. Por tanto, una vez realizados los ensayos clínicos y los procesos de validación correspondientes, los biomateriales de fibroína van a ser de gran utilidad en el campo de la Ingeniería Tisular.

Bibliografía

1. Altman, G.H., Díaz, F., Jakuba, C., et al. (2003). Silk based biomaterials. *Biomaterials* 24: 401-416.
2. Chiarini, A., Petrini, P., Bozzini, D., et al. (2003). Silk fibroin/poly(carbonate)-urethane as a substrate for cell growth: in vitro interactions with human cells. *Biomaterials* 24: 789-799.
3. Hofmann, S., Wong Po Foo, CT., Rossetti, F., Textor, M., Meinel, L. (2006). Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* 111: 219-227.
4. Karageorgiu, V., Meinel, L., Hofmann, S., et al. (2004). Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *J. Biomed. Mater. Res.* 71: 528-537.
5. Karageorgiu, V., Tomkins, M., Fajardo, R., et al. (2006). Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 78: 324-334.
6. Kim, KH., Jeong, L., Park, HN., et al. (2005). Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J. Biotechnology* 120: 327-339.
7. Li, C., Vepari, C., Jin, H-J., Kim, HJ., Kaplan, D. (2006). Electrospun silk-BMP-2 scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27: 3115-3124.
8. Sofia, S., McCarthy, MB., Gronowicz, G., Kaplan D. (2001). Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J. Biomed. Mater. Res.* 54:139-148.
9. Sugihara, A., Sugiura, K., Morita, H., et al. (2000). Promotive effects of a silk film on epidermal recovery from full-thickness skin wounds. *Proc.Soc.Exp. Biol. Med.* 225: 58-64.
10. Uebersax, L., Mattotti, M., Papaloizos, M., et al. (2007) Silk fibroin matrices for the controlled release of nerve growth factor (NGF). *Biomaterials* 28: 4449-4460.
11. Wang, Y., Kim, H-J., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D. (2006). Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials. *Biomaterials* 27: 6064-6082.